

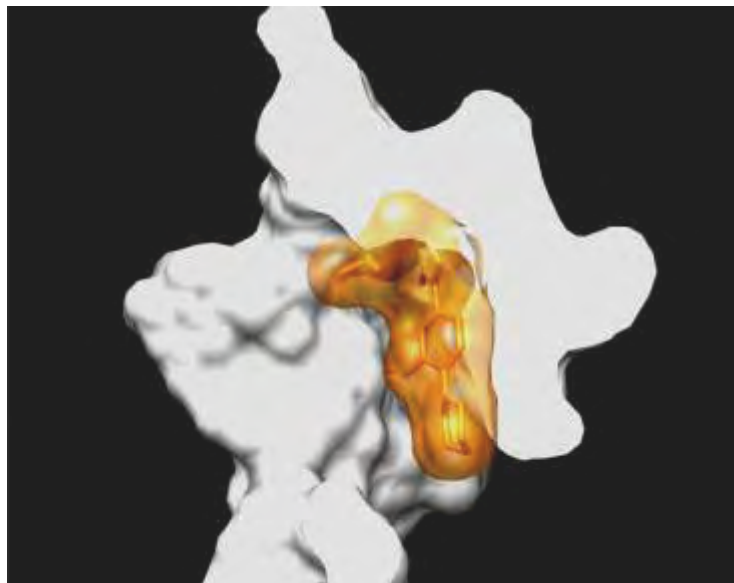


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας**

**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,  
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

***ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ  
ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ *Enterococcus  
faecium* ΚΑΙ *faecalis* ΚΑΙ *Staphylococcus epidermidis*.***



**ΝΤΟΚΟΥ ΕΛΕΝΗ**

***Λάρισα, Σεπτέμβριος 2010***

***Μελέτη των μηχανισμών αντοχής στη λινεζολίδα σε κλινικά  
στελέχη *Enterococcus faecium* και *faecalis* και  
*Staphylococcus epidermidis*.***

*Μέλη τριμελούς επιτροπής:*

- Πουρνάρας Σπυρίδων, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Μόσιαλος Δημήτριος, Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Μπαλατσός Νικόλαος, Λέκτορας Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας

## Περιεχόμενα

<b>1</b>	<b><u>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</u></b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b><u>Περίληψη</u></b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b><u>Summary</u></b>	<b>8</b>
<b>4</b>	<b><u>Εισαγωγή</u></b>	<b>9</b>
4.1	Σταφυλόκοκκοι	10
4.1.1	Ιστορικά στοιχεία των Σταφυλοκόκκων	10
4.1.2	Ταξινόμηση	10
4.1.3	Ανατομία του Σταφυλοκόκκου	11
4.1.4	Επιδημιολογία	12
4.1.5	Coagulase- Αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι	13
4.2	Εντερόκοκκοι	15
4.2.1	Ταξινόμηση	15
4.2.2	Φυσιολογία	18
4.2.3	Βακτηριοσίνες	19
4.2.4	Οικολογία και Επιδημιολογία	20
4.2.5	Ποσοστά μόλυνσης	21
4.3	Οξαζολιδινόνες και Λινεζολίδη	22
<b>5</b>	<b><u>Πειραματικό Μέρος</u></b>	<b>27</b>
5.1	Βακτηριακά στελέχη	27
5.2	Καλλιέργεια - Απομόνωση	27
5.3	Ταυτοποίηση	27
5.4	Έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά	28
5.4.1	Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας ( <i>Minimum Inhibitory Concentration, MIC</i> ) με τη μέθοδο του <i>E-test</i>	28
5.4.2	Προσδιορισμός της MIC στη λινεζολίδη με τη μέθοδο των αραιώσεων	29
5.5	Μοριακές Μέθοδοι	29
5.6	Εξαγωγή του μικροβιακού DNA	30
5.7	Σταφυλόκοκκοι	31
5.7.1	Εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR για την ανίχνευση του 16S rRNA των σταφυλοκόκκων	31
5.7.2	Εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR για την ανίχνευση του 23S rRNA των σταφυλοκόκκων	33
5.8	Εντερόκοκκοι	37

5.8.1	Σχεδιασμός εκκινητών με δυνατότητα ενίσχυσης ολόκληρου του γονιδίου 23S rRNA σε 4 αλληλοεπικαλυπτόμενα ζεύγη .....	37
5.8.2	Εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την ενίσχυση του γονιδίου 23S rRNA των εντεροκόκκων .....	39
5.9	Καθαρισμός των προϊόντων της PCR και αλληλούχιση τους .....	40
5.10	Γενετική συσχέτιση των στελεχών με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE) .....	42
<b>6</b>	<b><u>Αποτελέσματα</u></b> .....	<b>45</b>
6.1	Προέλευση και είδος των δειγμάτων .....	45
6.2	Αποτελέσματα προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (MIC) στη λινεζολίδη, βανκομυκίνη και τεϊκοπλανίνη με τη μέθοδο του E-test .....	47
6.3	Αποτελέσματα προσδιορισμού της MIC στη λινεζολίδη με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων .....	49
6.4	Ανίχνευση του 16S rRNA με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) .....	50
6.5	Ενίσχυση του 23S rRNA των σταφυλοκόκκων .....	51
6.6	Προσδιορισμός αλληλουχίας βάσεων (DNA sequencing) των αντιγράφων του γονιδίου 23S rRNA των σταφυλοκόκκων .....	52
6.7	Ενίσχυση του 23S rRNA των εντεροκόκκων .....	54
6.8	Μελέτη της γενετικής συσχέτισης των στελεχών σταφυλοκόκκου και εντεροκόκκου ανθεκτικών στη λινεζολίδη με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE) .....	59
<b>7</b>	<b><u>Συζήτηση-Συμπεράσματα</u></b> .....	<b>63</b>
<b>8</b>	<b><u>Βιβλιογραφία</u></b> .....	<b>66</b>

## 1 ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη του κ. Νικολάου Μπαλατσού, Λέκτορα Βιοχημείας και του κ. Μόσιαλου Δημήτριου, Λέκτορα Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας του διαγνωστικού τμήματος του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

Η βασική εκπαίδευση, το πειραματικό μέρος και η ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης έγιναν υπό την επίβλεψη του κ. Σπύρου Πουρνάρα, Επίκουρου Καθηγητή Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπεύθυνου του εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας τον οποίο και ευχαριστώ για την άριστη συνεργασία μας, την πολύτιμη καθοδήγησή του, τις υποδείξεις και διορθώσεις του σε όλες τις φάσεις διεκπεραίωσης της συγκεκριμένης εργασίας. Τον ευχαριστώ θερμά για την καθημερινή επίβλεψη, τον χρόνο που μου αφιέρωσε και την αμέριστη συμπαράστασή του όλο αυτό το διάστημα . Χωρίς τη βοήθειά του η εκπόνηση αυτής της εργασίας δε θα ήταν δυνατή.

Τέλος, η παρούσα διπλωματική εργασία δεν θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς τη βοήθεια του κ. Τσακρή Αθανάσιου, Καθηγητή Μικροβιολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών για την ευγενική παραχώρηση δειγμάτων *Staphylococcus epidermidis* από το Τζάνειο Νοσοκομείο. Τον ευχαριστώ θερμά.

## 2 Περίληψη

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν είκοσι πέντε κλινικά στελέχη *Enterococci* που απομονώθηκαν από ασθενείς της μονάδας εντατικής θεραπείας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και εβδομήντα δύο κλινικά στελέχη *Staphylococci* που απομονώθηκαν από ασθενείς της μονάδας εντατικής θεραπείας του Τζάνειου Νοσοκομείου Αθηνών. Τα στελέχη βρέθηκαν να είναι ανθεκτικά στη λινεζολίδα και εντοπίστηκαν με PCR οι υπεύθυνες μεταλλάξεις. Επίσης μελετήθηκε η κλωνική συσχέτιση των στελεχών αυτών. Τα στελέχη *Staphylococci* ήταν κλωνικά σχετιζόμενα σε αντίθεση με τα στελέχη *Enterococci* που φέρονταν να είναι σποραδικά. Τα αποτελέσματα της μελέτης αποτελούν την πρώτη ευρεία μελέτη της αντοχής αυτής σε κλινικά στελέχη του ελληνικού χώρου.

## 3 Summary

The current study included twentyfive clinical *Enterococci* isolates that were isolated from the intensive care unit of the General University Hospital of Larissa and seventy-two clinical *Staphylococci* isolates from the intensive care unit of the Tzaneio Hospital of Athens, Greece. The isolates were found to be resistant to linezolid and by the use of PCR the responsible mutations were spotted. We also studied the clonal relationship of the isolates. The *Staphylococci* isolates were found to be clonally related in contrast to the *Enterococci* isolates that were random. The results of the study are the first wide study of this resistance in clinical isolates of the Greek region.

## 4 Εισαγωγή

Η πτυχιακή εργασία έχει ως απώτερο στόχο την εκμάθηση και την πρακτική αφομοίωση των τεχνικών του εργαστηρίου, καθώς επίσης και την εξοικείωση με την συλλογή πληροφοριών, την πειραματική διαδικασία, την εξαγωγή αποτελεσμάτων αλλά και την συγγραφή ενός επιστημονικού κειμένου. Η εργασία αυτή, λοιπόν, δίνει την ευκαιρία στο άτομο που την επιτελεί να αποκτήσει την απαραίτητη εργαστηριακή εμπειρία αλλά και την ευκαιρία να συνεργαστεί, και φυσικά να μάθει να συνεργάζεται σωστά, με άλλα άτομα. Μπορεί, δηλαδή, να αφομοιώσει πλήρως τους κανόνες σωστής συμπεριφοράς και καλής συνεργασίας μέσα από την καθημερινή επαφή με άλλα άτομα. Του δίνεται η ευκαιρία να εργαστεί σε ένα κανονικό εργαστήριο και να αποκτήσει αυτό που λέμε καθημερινή τριβή σε προβλήματα ρουτίνας, να μπορέσει να τα λύσει και να συνεχίσει έτσι την έρευνα του. Ακόμη η καθημερινή επαφή με άτομα που το γνωστικό τους επίπεδο είναι πολύ υψηλό, μέσα στο χώρο του εργαστηρίου, μπορεί να αποδειχθεί ωφέλιμο για τον φοιτητή. Μπορεί να λύσει απορίες και προβλήματα με την βοήθεια των συνεργατών του, αλλά και να αποκτήσει την αίσθηση της ευγενούς άμιλλας και φυσικά όχι του ανταγωνισμού.

Ο οργανισμός καθημερινά εκτίθεται σε πολλά μικρόβια, τα οποία και αντιμετωπίζει με την ανοσιακή του απάντηση. Όταν όμως το ανοσοποιητικό σύστημα είναι επηρεασμένο, όπως συμβαίνει σε περιπτώσεις συγγενών ή επίκτητων ανοσοανεπαρκειών, ανοσοκαταστολής ή συχνότερα μετά από βαριές επεμβάσεις ή παρατεταμένες νοσηλείες σε μονάδες εντατικής θεραπείας, ο οργανισμός δεν μπορεί να αντιμετωπίσει την έκθεση σε μικρόβια ακόμη και μικρής λοιμογόνου δυνάμεως, οπότε και προκαλείται βακτηριακή λοίμωξη. Από τα συχνότερα Gram θετικά παθογόνα του Ελληνικού χώρου είναι τα γένη Εντερόκοκκοι και Σταφυλόκοκκοι. Για την αντιμετώπιση λοιμώξεων που προκαλούνται από τα γένη αυτά οι θεράποντες ιατροί χορηγούν στους ασθενείς τους αντιμικροβιακά φάρμακα.



## 4.1 Σταφυλόκοκκοι

### 4.1.1 Ιστορικά στοιχεία των Σταφυλοκόκκων

Οι σταφυλόκοκοι παρατηρήθηκαν και καλλιεργήθηκαν πρώτα από τους Pasteur και Koch αλλά οι πρώτες εκτεταμένες μελέτες έγιναν από τον Ogston το 1881<sup>1</sup> και τον Rosenbach το 1884.<sup>2</sup>

Το γένος σταφυλόκοκκος ονομάστηκε έτσι από τον Ogston το 1881 όταν παρατήρησε συσσωματώματα που ομοίαζαν με σταφύλια από βακτήρια που εδράζονταν σε ανθρώπινα αποστήματα με πύο.<sup>1</sup> Τρία χρόνια αργότερα, ο Rosenbach<sup>2</sup> κατόρθωσε να απομονώσει και να μεγαλώσει αυτούς τους μικροοργανισμούς σε καθαρή καλλιέργεια. Τους έδωσε το συγκεκριμένο επίθετο *Staphylococcus aureus* λόγω των αποικιών τους των οποίων το χρώμα είναι κίτρινο, σχεδόν πορτοκαλί.<sup>2</sup> Ο Rosenbach έδειξε ότι ο *S. aureus* είναι υπεύθυνος για μολύνσεις τραυμάτων και ότι ο *S. epidermidis* ήταν φυσικός αποικιστής του δέρματος. Από τότε που ο Rosenbach περιέγραψε την ανάπτυξη αυτού του ‘χρυσού’ κόκκου, οι χειρουργοί φοβούνται τις μετεγχειρητικές μολύνσεις τραυμάτων.<sup>3</sup> Οι σταφυλόκοκκοι επίσης προκάλεσαν ασθένειες απειλητικές για τη ζωή μετά από τραυματισμούς και θανατηφόρα πνευμονία κατά τη διάρκεια της επιδημίας γρίπης, σκοτώνοντας έτσι νέους ανθρώπους.<sup>4</sup> Έτσι στην εποχή πριν από τα αντιβιοτικά, ο *S. aureus* ήταν γνωστός σαν ένα ιδιαίτερος επικίνδυνο παθογόνο.

Λόγω της σημαντικής συνεισφοράς της πενικιλίνης στον αγώνα ενάντια στη λοίμωξη από *S. aureus*, η περίοδος ανάμεσα στο 1946 και το 1950 αναφερόταν σαν η ‘χρυσή εποχή’ στην θεραπεία της σταφυλοκοκκικής λοίμωξης. Ωστόσο, η ταχύτατη διασπορά των ανθεκτικών σταφυλοκόκκων οδήγησε στην επιστροφή αυτού του σημαντικού παθογόνου.

### 4.1.2 Ταξινόμηση

Η οικογένεια των Micrococcaceae αποτελείται από τέσσερα γένη:

- *Planococcus*
- *Stomatococcus*
- *Micrococcus*, και

- *Staphylococcus*.<sup>5</sup>

Οι πλανόκοκκοι δεν βρίσκονται στους ανθρώπους, ενώ οι στοματόκοκκοι και οι μικρόκοκκοι μπορούν να αποικίσουν ανθρώπους αλλά σπάνια προκαλούν λοιμώξεις.

Οι σταφυλόκοκκοι είναι Gram θετικοί μη κινητοί κόκκοι που χωρίζονται χαρακτηριστικά σε διαφορετικά πρότυπα για να σχηματίσουν ακανόνιστα συσσωματώματα που ομοιάζουν με σταφύλια. Συνήθως παράγουν καταλάση. Είναι προαιρετικά αναερόβια αλλά μεγαλώνουν καλύτερα κάτω από αερόβιες συνθήκες από ότι σε αναερόβιες. Παραδοσιακά έχουν διαχωριστεί σε coagulase-θετικούς και coagulase-αρνητικούς σταφυλοκόκκους. Οι coagulase-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι μπορούν να υποκατηγοριοποιηθούν προς το παρόν σε 32 διαφορετικά είδη. Από τον τεράστιο αυτό αριθμό σταφυλοκόκκων, μόνο τρεις συσχετίζονται συχνά με ανθρώπινες λοιμώξεις:

- *S. aureus*
- *S. epidermidis*, και
- *Staphylococcus saprophyticus*

Επίσης, πρέπει να αναφερθούν τα είδη *Staphylococcus lugdunensis* και *Staphylococcus schleiferi* γιατί είναι σχετικά επιθετικοί και μπορούν να προκαλέσουν μία ποικιλία λοιμώξεων, όπως σωματικές λοιμώξεις, βακτηριαμία, ενδοκαρδίτιδα, λοιμώξεις των οστών και αποστήματα σε διάφορα όργανα.

Στο επίπεδο του γονιδιώματος οι σταφυλόκοκκοι είναι μία ομοιογενής ομάδα βακτηρίων. Στο επίπεδο του υβριδισμού του DNA με το rRNA και την ολιγονουκλεοτιδική ανάλυση συσχέτισης του 16S rRNA φαίνεται να συσχετίζονται με τα γένη *Bacillus*, *Enterococcus* και *Listeria*.

#### 4.1.3 Ανατομία του Σταφυλοκόκκου

- **Καψιδικοί πολυσακχαρίτες**

Οι σταφυλόκοκκοι συνήθως περιβάλλονται από μία χαλαρή κάψα πολυσακχαριτών. Η κάψα αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ταυτοποιηθούν οι ορότυποι. Οι ορότυποι 5 και 8 είναι οι πιο κοινοί και πολλοί *S. aureus* ανθεκτικοί στην μεθικιλίνη (MRSA) ανήκουν σε αυτούς τους οροτύπους.<sup>6</sup>

Όταν απομονώνεται από μολύνσεις, ο *S. aureus* εκφράζει υψηλά επίπεδα πολυσακχαριτών αλλά γρήγορα τα χάνει λόγω των ανακαλλιεργειών στο εργαστήριο.

Η λειτουργία της κάψας δεν είναι ακόμη ξεκάθαρη. Μπορεί να εμποδίζει την φαγοκύτωση και έτσι να προσφέρει στον διεισδυτικό χαρακτήρα του *S. aureus*.

- **Πεπτιδογλυκάνη**

Το πεπτιδογλυκανικό στρώμα είναι το κύριο μακρομόριο που βρίσκεται διαδοχικές υπομονάδες N-ακετυλομουραμικού οξέος και N-ακετυλογλυκοζαμίνης. Πενταπεπτιδικές πλευρικές αλυσίδες προσδένονται στις υπομονάδες N-ακετυλομουραμικού οξέος. Οι αλυσίδες γλυκάνης κατόπιν διασταυρώνονται με πεπτιδικές γέφυρες ανάμεσα στις πλευρικές αλυσίδες.

- **Πρωτεΐνη A**

Η επιφάνεια όλων των στελεχών του *S. aureus* περιέχει πρωτεΐνες που προεξέχουν από το πεπτιδογλυκανικό στρώμα και αγκυροβολούν ομοιοπολικά. Μία από αυτές τις πρωτεΐνες, η πρωτεΐνη A, έχει την ικανότητα να προσδένεται στο τμήμα Fc των ανοσοσφαιρινών υποτάξεων IgG1, IgG2 και IgG4.<sup>7</sup> Η πρωτεΐνη A δεν παράγεται από coagulase-αρνητικούς σταφυλοκόκκους.

- **Τειχοϊκό οξύ**

Τα τειχοϊκά οξέα είναι μακρομόρια πολυσακχαριτών που περιέχουν φώσφορο. Το τειχοϊκό οξύ είναι προσδεμένο και στο πεπτιδογλυκανικό τοίχωμα και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Οι πολυσακχαρίτες είναι ειδικοί για κάθε είδος, δηλαδή τα τειχοϊκά οξέα ριβιτόλης είναι παρόντα στον *S. aureus* και τα τειχοϊκά οξέα γλυκερόλης στον *S. epidermidis*.<sup>8</sup>

#### **4.1.4 Επιδημιολογία**

Κάθε ανθρώπινος οργανισμός είναι αποικισμένος από *S. epidermidis*. Οι φυσιολογικοί βιότοποι αυτών των σταφυλοκόκκων είναι το δέρμα και οι βλεννώδεις μεμβράνες. Οι κύριοι βιότοποι των πιο παθογενών ειδών *S. aureus*, είναι anterior nares και το περίνεο.

Τα νεογνά είναι ήδη αποικισμένα από *S. epidermidis* και συχνά και από *S. aureus*. Τα νεογνά συνήθως προσλαμβάνουν πρώτα *S. aureus* στο δέρμα και κατόπιν στη μύτη.<sup>9,10</sup> Λίγο μετά την νεογνική περίοδο μερικά άτομα γίνονται μόνιμοι φορείς,

συχνά με το ίδιο στέλεχος. Αν και μερική διασπορά *S. aureus* μπορεί να εμφανιστεί μέσα σε μία οικογένεια, γενικά η φυσιολογική χλωρίδα της μύτης αποτρέπει την απόκτηση νέων στελεχών.<sup>11</sup> Ωστόσο, αποικισμός με άλλα στελέχη μπορεί να συμβεί όταν λαμβάνεται αντιβιοτική θεραπεία που οδηγεί στην αποβολή του ευαίσθητου στελέχους φορέα. Επειδή αυτή η περίπτωση συμβαίνει σε νοσοκομεία, οι ασθενείς μπορεί να αποικιστούν από ανθεκτικούς σταφυλοκόκκους. Η συχνότητα φορείας του *S. aureus* σε μυκτήρες ατόμων εκτός νοσοκομείου ποικίλει από 10% έως 40%. Οι ασθενείς νοσοκομείων και το προσωπικό έχουν υψηλότερες συχνότητες φορείας. Οι συχνότητες φορείας των ασθενών μπορεί να αυξηθεί κατά τη διάρκεια της παραμονής τους στο νοσοκομείο μέσω αποικισμού και νοσοκομειακής μετάδοσης. Οι συχνότητες είναι ιδιαίτερα υψηλές σε ασθενείς που κάνουν αιμοδιάλυση και επίσης σε διαβητικούς, χρήστες ναρκωτικών και ασθενείς που έχουν μία ποικιλία από δερματικές καταστάσεις.<sup>12,13</sup>

Η κατάσταση φορείας είναι κλινικά σημαντική γιατί οι φορείς έχουν περισσότερες μολύνσεις μετεγχειρητικά από αυτούς που δεν είναι φορείς. Αυτό έχει οδηγήσει στην εφαρμογή mupirocin (τοπικό αντιβιοτικό) στο ανώτερο αναπνευστικό σε μερικά κέντρα πριν από τις εγχειρήσεις ανοιχτής καρδιάς για να μειωθούν οι περιπτώσεις μετεγχειρητικών μολύνσεων των τραυμάτων.<sup>14</sup> Οι διασπορές ανάμεσα στους φορείς είναι πολύ σημαντικοί γιατί μεταδίδουν τους σταφυλοκόκκους όχι μόνο με απευθείας επαφή αλλά και με αερομεταφορά. Σοβαροί περινεϊκοί μεταφορείς σχεδόν πάντοτε διασπείρουν μεγάλες ποσότητες σταφυλοκόκκων. Οι σταφυλόκοκκοι μπορεί να συσσωρευθούν στα ρούχα και στο κρεβάτι των διασπορέων και μπορεί να διασπείρουν όταν αυτά μετακινηθούν. Μόρια σκόνης που φέρουν σταφυλοκόκκους μπορούν να μεταφερθούν για σημαντικές αποστάσεις.

#### 4.1.5 Coagulase- Αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι

Η υψηλή επικράτηση των coagulase αρνητικών σταφυλοκόκκων στο δέρμα και η συχνή εμφύτευση ξένων συσκευών κατά τη διάρκεια της νοσηλείας παρέχουν σε αυτά τα βακτήρια μία ιδανική ευκαιρία να προκαλέσουν μολύνσεις. Κοινά χαρακτηριστικά των μολύνσεων από coagulase αρνητικούς σταφυλοκόκκους είναι:

- Είναι συνήθως νοσοκομειακοί
- Ο *S. epidermidis* είναι το πιο κοινό είδος που συμμετάσχει

- Συσχετίζονται με εμφυτευμένες ξένες συσκευές όπως ενδοαγγειακοί καθετήρες ή προσθετικές βαλβίδες καρδιάς.

Η αξιολόγηση της νοσοκομειακής δεξαμενής coagulase-αρνητικών σταφυλοκόκκων παραμένει προβληματική επειδή αυτά τα βακτήρια αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος. Αν και πολλά συστήματα ταυτοποίησης έχουν βοηθήσει στη διαλεύκανση της επιδημιολογίας τους,<sup>15</sup> στην αξιολόγηση της μετάδοσης τους και τον προσδιορισμό των επιδημιών νοσοκομειακών λοιμώξεων, λίγα είναι γνωστά για τη νοσοκομειακή δεξαμενή των coagulase-αρνητικών σταφυλοκόκκων, περιλαμβάνοντας τα μεθικιλίνη ανθεκτικά στελέχη (methicillin resistant, MR coagulase-negative staphylococci). Αυτά τα στελέχη λειτουργούν ως δεξαμενή γονιδίων αντιμικροβιακής αντοχής που μπορούν να μεταφερθούν σε άλλους Gram-θετικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων στελεχών *S.aureus*. Η Εθνική Έρευνα Νοσοκομειακών Λοιμώξεων (National Nosocomial Infection Survey, NNIS) των ΗΠΑ ανακάλυψε ότι, ανάμεσα στο 1980 και στο 1989, η εμφάνιση των coagulase-αρνητικών σταφυλοκόκκων σαν αιτία των νοσοκομειακών βακτηριαιμιών αυξήθηκε από 9% στο 27% και έγινε η πιο κοινή αιτία αυτών των λοιμώξεων. Επιπλέον, στοιχεία του NNIS αποκαλύπτουν ότι κατά τη διάρκεια εκείνης της περιόδου η αναλογία των MR coagulase-αρνητικών σταφυλοκόκκων αυξήθηκε από 20% στο 60%. Στοιχεία από την παγκόσμια μελέτη SENTRY υποδεικνύουν ότι ανεξάρτητα από γεωγραφική προέλευση, 70-75% των coagulase-αρνητικών σταφυλοκόκκων είναι ανθεκτικοί στη μεθικιλίνη. Τα περισσότερα από αυτά τα στελέχη ήταν ανθεκτικά και σε πολλούς άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες.<sup>16</sup> Υπάρχει, λοιπόν, μία συσχέτιση ανάμεσα στη δραματική αύξηση των coagulase-αρνητικών σταφυλοκόκκων σαν αιτία των νοσοκομειακών λοιμώξεων και στην αντοχή των παθογόνων αυτών σε αντιμικροβιακούς παράγοντες.<sup>17</sup>



Εικόνα 1. Καλλιέργεια coagulase-αρνητικού σταφυλοκόκκου σε αιματούχο τρυβλίο

## 4.2 *Εντερόκοκκοι*

Για πολλά χρόνια το είδος του εντεροκόκκου θεωρείται αβλαβές για τους ανθρώπους και όχι ιδιαίτερα σημαντικό από ιατρικής απόψεως. Επειδή παράγει βακτηριοσίνες, το είδος του εντεροκόκκου έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς την τελευταία δεκαετία στη βιομηχανία τροφίμων σαν προβιοτικά ή σαν καλλιέργειες εκκινητές.<sup>18</sup> Πρόσφατα, οι εντερόκοκκοι έχουν γίνει ένα από τα πλέον κοινά νοσοκομειακά παθογόνα, με ασθενείς να αγγίζουν ποσοστό θνησιμότητας έως και 61%.<sup>19</sup>

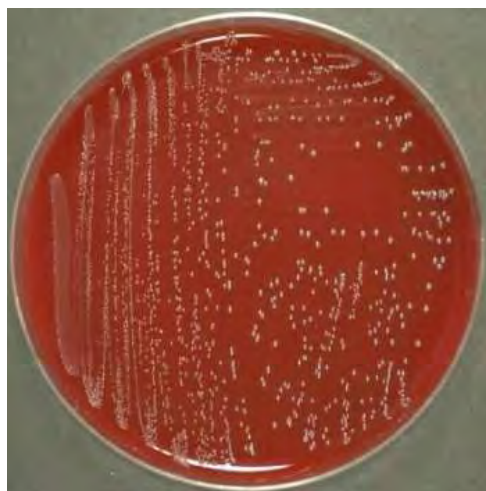
Το 2005 αναφέρθηκαν 7066 περιπτώσεις βακτηριαμίας που είχαν προκληθεί από το είδος του εντεροκόκκου στο Ηνωμένο Βασίλειο, μία αύξηση της τάξεως του 8% από το 2004, με την Αντιπροσωπεία Προστασίας Υγείας (2007) να δηλώνει ότι 'μία αύξηση στις βακτηριαμίες που προκαλούνται από παθογόνα δεν έχει παρατηρηθεί για αρκετό διάστημα. Εικοσιοκτώ τις εκατό από όλες τις περιπτώσεις εμφάνιζαν αντοχή σε αντιμικροβιακά (Health Protection Agency, 2007).<sup>20</sup> Ο κίνδυνος θανάτου από εντεροκόκκους ανθεκτικούς στη βανκομυκίνη (vancomycin-resistant enterococci, VRE) είναι 75%, συγκριτικά με το 45% από εκείνους που έχουν μολυνθεί από ευαίσθητα στελέχη.<sup>21</sup> Αυτοί οι αριθμοί αντανακλώνται στις ΗΠΑ. Κατά τη διάρκεια μιας περιόδου 15 ετών έχει καταγραφεί μία αύξηση 20-fold σε εμφάνιση VRE συσχετιζόμενη με νοσοκομειακές λοιμώξεις από την Παγκόσμια Επιτήρηση Νοσοκομειακών Λοιμώξεων του CDC (National Nosocomial Infections Surveillance, 2004).<sup>22</sup>

Αυτή η δραματική αύξηση στην αντιμικροβιακή αντοχή στο είδος του εντεροκόκκου τονίζει παγκοσμίως την ανάγκη για μεγαλύτερη κατανόηση αυτού του γένους, συμπεριλαμβανομένης της οικολογίας του, της επιδημιολογίας του και της παθογένειας του.

### 4.2.1 Ταξινόμηση

Το γένος των εντεροκόκκων αποτελείται από Gram-θετικά, καταλάση-αρνητικά, που δεν σχηματίζουν σπόρια, προαιρετικά αναερόβια βακτήρια που μπορούν να υφίστανται ως μονοί κόκκοι ή και αλυσίδες. Οι εντερόκοκκοι ανήκουν σε μία ομάδα

οργανισμών γνωστών και ως λακτικά οξέα βακτήρια (lactic acid bacteria, LAB) που παράγουν βακτηριοσίνες (Health Protection Agency, 2005).<sup>23</sup>

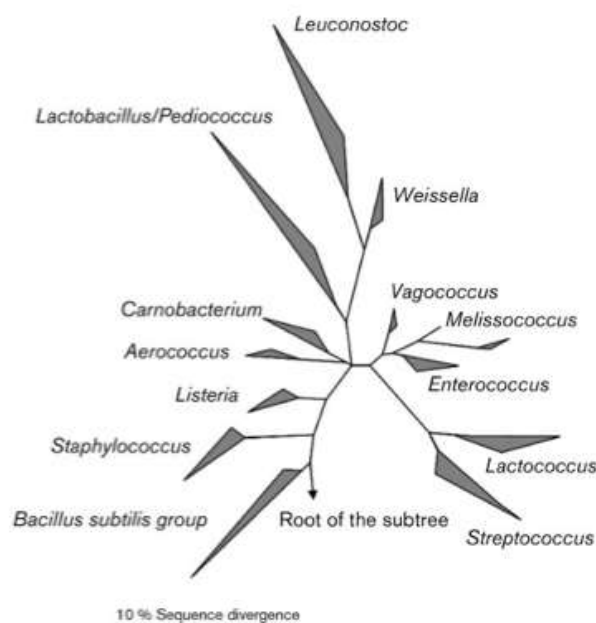


Εικόνα 2. Καλλιέργεια εντεροκόκκου σε αιματούχο τρυβλίο

Τα γένη των LAB με τα οποία ομαδοποιούνται οι εντερόκοκκοι προσδιορίζονται από χαμηλό G+C περιεχόμενο της τάξεως του 0.50 mol%.<sup>24</sup> Δεν υπάρχουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που να διαχωρίζουν τους εντεροκόκκους από τα υπόλοιπα Gram-θετικά είδη, καταλάση-αρνητικά κοκκοβακτήρια, έτσι η αναγνώριση γίνεται συνήθως με αντίστροφη μεθοδολογία (αποβολή γνωρισμάτων άλλων ειδών πρώτα). Σαν γένος ο εντερόκοκκος έχει αναγνωριστεί από το 1899, όταν ο Thiercelin το αναγνώρισε σαν εντερικό οργανισμό,<sup>25</sup> η ταξινόμιά του και η οικολογία του αποδίδονται στον Klein (2003).<sup>26</sup> Πολλές προσπάθειες είχαν γίνει για να διαχωριστεί το είδος των εντεροκόκκων από το είδος των στρεπτοκόκκων. Το 1937, ο Sherman ταξινόμησε τα είδη των Στρεπτοκόκκων σε 4 υποκατηγορίες: περιττωματικοί στρεπτόκοκκοι (εντερόκοκκοι), στρεπτόκοκκοι των γαλακτοκομικών, ομάδες των viridans και pyrogenous στρεπτοκόκκων (Klein, 2003).<sup>26</sup> Ο Sherman σημείωσε ότι η υποκατηγορία των εντεροκόκκων συμπεριλάμβανε την ομάδα Lancefield των D στρεπτοκόκκων και πρότεινε ότι η τελευταία μπορούσε να διαφοροποιηθεί λόγω αιμολυτικών και πρωτεολυτικών αντιδράσεων, αν και κάτι τέτοιο δεν θα ήταν πρέπον αφού η αιμόλυση προσδιορίζεται από ένα πλασμίδιο.<sup>25</sup> Κλασσικές μέθοδοι όπως η οροτυπία και τυποποίηση φάγων αφήνουν αναπάντητα ερωτήματα για το ποιά είδη Στρεπτοκόκκων ανήκουν στο γένος των Εντεροκόκκων.<sup>27</sup>

Το 1984, μέσω της χρήσης του υβριδισμού του DNA και της αλληλούχησης του 16S rRNA, εδραιώθηκε ότι τα είδη του *Streptococcus faecium* και *Streptococcus*

*faecalis* ήταν αρκετά διαφορετικά από τους υπόλοιπους στρεπτοκόκκους και τους αποδόθηκε ένα διαφορετικό γένος: εντερόκοκκοι.<sup>18</sup> Αυτό σημαίνει ότι το αντιγόνο της ομάδας D βρίσκεται και στους στρεπτοκόκκους και στους εντεροκόκκους. Εννέα είδη μεταφέρθηκαν από την ομάδα των στρεπτοκόκκων και τώρα ο εντερόκοκκος περιέχει 28 είδη.<sup>18</sup> Οι μοριακές πληροφορίες που συλλέχθηκαν από την χρήση της αλληλούχισης του 16S rRNA του στρεπτοκόκκου επέτρεψαν την κατασκευή ενός δενδρογράμματος 16S rRNA που υποδεικνύει την σχέση μεταξύ των στρεπτοκοκκικών, εντεροκοκκικών και λακτοκοκκικών ειδών (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. 16S rRNA δενδρόγραμμα της φυλογενετικής θέσης του είδους Εντερόκοκκος.

Αυτή η μέθοδος επίσης επέτρεψε την ομαδοποίηση των ειδών των εντεροκόκκων. Η ομάδα ειδών *Enterococcus faecalis* περικλείει τα *E. faecalis*, *Enterococcus haemoperoxidus* και *Enterococcus moraviensis* ενώ στην ομάδα των ειδών *Enterococcus faecium* περικλείει τα *E. faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus porcinus* και *Enterococcus villorum*.<sup>26</sup> Ο διαχωρισμός των εντεροκόκκων από τους στρεπτοκόκκους έχει καθιερωθεί κυρίως λόγω του Lancefield αντιγόνου D, μιας και μόνο οι *Streptococcus bovis*, *Streptococcus alactolyticus* και *Streptococcus equinus* είναι ορότυπος D. Αυτές οι ομάδες μπορούν να διαχωριστούν από το είδος των εντεροκόκκων λόγω της ελλιπούς ανάπτυξης σε 6.5 % (w/v) χλωριούχο νάτριο στους 10<sup>0</sup> C. Είναι δυσκολότερο να διαχωρίσεις το είδος των εντεροκόκκων από άλλους κόκκους που δεν εκφράζουν το



αντιγόνο D όπως οι Πεδιόκοκκοι, οι λακτόκοκκοι και τετραγονόκοκκοι γιατί δεν έχουν αναφερθεί άλλες φαινοτυπικές διαφορές που να επιτρέπουν τη διάκριση. Κατά συνέπεια τα πρότυπα ζύμωσης, οι ενεργότητες ενζύμων όπως η πυρογλουταμινική αμινοπεπτιδάση (pyroglutamyl aminopeptidase, PYRase),<sup>28</sup> η ανάπτυξη σε καθορισμένες θερμοκρασίες και τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά είναι απαραίτητα για τον προσδιορισμό του είδους του εντεροκόκκου.<sup>29</sup> Οι διαφορές στα γονιδιώματα των *E. faecalis* and *E. faecium* αξιολογήθηκαν σε μία μελέτη χρησιμοποιώντας ανταγωνιστικό DNA υβριδισμό.<sup>29</sup> Εξειδικευμένες αλληλουχίες για τον *E. faecalis* συγκρινόμενες με εκείνες του *E. faecium* κωδικοποιούν κυρίως πρωτεΐνες της επιφάνειας. Συνολικά 6.4% του γονιδιώματος του εντεροκόκκου συσχετίζεται με πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας και 22.6% των διαφορών ανάμεσα στα δύο είδη εντοπίζεται σε αυτά τα γονίδια. Αυτή η παραλλαγή θεωρείται ότι έχει επιπτώσεις στα είδη που αποφεύγουν διαφορετικές ανοσοαποκρίσεις ξενιστών.<sup>29</sup>

#### 4.2.2 Φυσιολογία

Το είδος του εντεροκόκκου αναπτύσσεται σε ένα θερμοκρασιακό εύρος από 5 έως 50°C. Η βέλτιστη, ελάχιστη και μέγιστη θερμοκρασία, σύμφωνα με το μοντέλο του Rosso είναι 42.7, 6.5 και 47.8°C αντίστοιχα, σε brain heart infusion (BHI) άγαρ σε αερόβιες συνθήκες,<sup>30</sup> αν και ανάπτυξη θα εμφανιστεί και σε αναερόβιες συνθήκες.<sup>28</sup> Και τα *E. faecalis* αλλά και τα *E. faecium* μπορούν να επιβιώσουν θέρμανση στους 60°C για 30 λεπτά, κάνοντας έτσι το είδος των εντεροκόκκων διακριτό από άλλα στενά σχετιζόμενα γένη όπως ο στρεπτόκοκκος.<sup>18</sup> Trypticase soy άγαρ ή Columbia άγαρ με 5% (v/v) αίμα προβάτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αξιολογηθεί η αιμόλυση που προκαλείται από τους εντεροκόκκους. Εάν χρησιμοποιηθεί αίμα ανθρώπου ή αλόγου, η αιμόλυση βασίζεται στην δραστικότητα της κυτολυσίνης και προκαλεί μία β-αιμολυτική αντίδραση.<sup>28</sup> Οι *E. faecalis* και *E. faecium* αναπτύσσονται σε ένα μεγάλο εύρος pH (4.6-9.9), με το βέλτιστο να είναι 7.5.<sup>30</sup> Είναι επίσης ανεκτικά στην ανάπτυξη παρουσία 40% (w/v) χολικών αλάτων. Ο *E. faecalis* μπορεί να αναπτυχθεί σε 6.5% NaCl και έχει μία αιμόσταση κατιόντων που πιθανολογείται ότι συμβάλλει στην αντοχή στο pH, στα άλατα, στα μέταλλα και στην αποξήρανση. Όταν αξιολογείται η ανάπτυξη του είδους των Εντεροκόκκων χρησιμοποιώντας οπτικές πυκνότητες η πιο σημαντική μεταβλητή των συνθηκών

ανάπτυξης είναι το pH, με την θερμοκρασία και την συγκέντρωση των αλάτων να έχουν μικρότερη επίδραση.<sup>31</sup> Κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής φάσης, η θερμοκρασία είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας ανάπτυξης, ενώ κατά τη στατική φάση η θέρμανση.<sup>31,32</sup> Η αντοχή του *E. faecalis* σε ένα εύρος τιμών pH θεωρείται ότι οφείλεται στην ανθεκτικότητα και τη μη διαπερατότητα σε οξέα και αλκάλια, αν και ορισμένες έρευνες προτείνουν ότι μπορεί να σχετίζεται με τη δράση μιας μεμβρανοσυνδεδεμένης  $H^+$ -ΑΤΡάσης.<sup>33</sup> Η αντοχή στη θερμοκρασία επίσης συσχετίζεται με τη δομή της μεμβράνης και το περιεχόμενο της σε λιπίδια και λιπαρά οξέα. Η μεμβράνη παρουσιάζεται πιο σταθερή κοντά στην ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, που είναι ένας μηχανισμός που συσχετίζεται με τους εντεροκόκκους.<sup>34</sup> Σε υψηλότερες θερμοκρασίες οι εντερόκοκκοι είναι λιγότεροι ελαστικοί, με το περιεχόμενο της μεμβράνης να αυξάνει σε λιπαρά οξέα και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα να μειώνονται. Η αντοχή στη θέρμανση των εντεροκόκκων δεν εξαρτάται μόνο από την θερμοκρασία αλλά και από την φάση ανάπτυξης.<sup>32</sup>

Όταν ο *E. faecalis* αναπτύσσεται σε μη στρεσογόνες θερμοκρασίες, κατά συνέπεια τα καλλιεργημένα κύτταρα δεν έχουν την ελαστικότητα σε θερμά ή ψυχρά περιβάλλοντα που θα προέκυπταν αν η πρώτη γενιά είχε αναπτυχθεί σε στρεσογόνες θερμοκρασίες.<sup>34</sup> Τρεις ευδιάκριτες θερμοκρασιακές ομάδες (10-13<sup>o</sup> C, 17-22<sup>o</sup> C και 42-47<sup>o</sup> C) έχουν καθιερωθεί για τον *E. faecalis* στις οποίες η διαπερατότητα της μεμβράνης σε 3% NaCl είναι διαφορετική. Αυτό έχει σημαντικές επιπτώσεις στη βιοτεχνολογία και στην επιστήμη τροφίμων.<sup>34</sup>

Η παραγωγή αμινών είναι επίσης στενά σχετιζόμενη με την θερμοκρασία ανάπτυξης και το pH. Η παραγωγή αποκαρβοξυλασών είναι βέλτιστη σε όξινο pH, ενώ η παραγωγή βιογενών αμινών στον *E. faecalis* EF37 μειώνεται σε χαμηλό pH. Η θερμοκρασία δεν έχει ιδιαίτερη επίδραση στην ίδια την παραγωγή αμινών, αλλά το φαινόμενο που έχει η θερμοκρασία στην κυτταρική παραγωγή τροποποιεί την ποσότητα των αμινών που παράγονται.<sup>31</sup> Άλλα προϊόντα του είδους των εντεροκόκκων που επηρεάζονται από το pH είναι οι βακτηριοσίνες.

#### 4.2.3 Βακτηριοσίνες

Οι βακτηριοσίνες είναι ριβοσωμικά συντεθειμένα, εξωκυτταρικά απελευθερούμενα αντιμικροβιακά πεπτίδια που επιδεικνύουν δραστηριότητα ενάντια

σε στενά σχετιζόμενα βακτηριακά είδη. Τέσσερα γονίδια είναι απαραίτητα για την παραγωγή βακτηριοσινών: ένα δομικό γονίδιο που κωδικοποιεί ένα προπεπτίδιο, ένα γονίδιο αφιερωμένο στην ανοσοαπόκριση, ένα γονίδιο αφιερωμένο στην ABC ανοσοαπόκριση και ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη απαραίτητη για την εξαγωγή της βακτηριοσίνης. Οι βακτηριοσίνες σχηματίζονται ως προπεπτίδια μέσα στο κύτταρο και ωριμάζουν κατά την έξοδό τους από το κύτταρο. Αυτό προκύπτει με την ενζυμική αποκοπή του N-τελικού πεπτιδίου οδηγού σε ένα σημείο αποκοπής διπλής γλυκίνης και εξαγωγή μέσω ενός Sec-εξαρτώμενου μονοπατιού. Οι βακτηριοσίνες είναι κατιονικές, αμφοφιλικές πρωτεΐνες που περιέχουν λίγη και καθόλου κυστεΐνη, και η δομή τους συνήθως λαμβάνει χώρα σαν τυχαία πηνία κάτω από υδατικές συνθήκες.<sup>35</sup> Η παραγωγή των βακτηριοσινών ευνοείται σε στρεσογόνες συνθήκες ανάπτυξης, το οποίο πιθανολογείται ότι συμβαίνει λόγω των χαμηλότερων ποσοστών ανάπτυξης, που καταλήγει σε καλύτερη χρήση της ενέργειας και μεγαλύτερη διαθεσιμότητα σε μεταβολίτες για την σύνθεση των βακτηριοσινών. Κάτω από βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης και κατά συνέπεια υψηλότερα ποσοστά ανάπτυξης υπάρχει έλλειψη αμινοξέων για την παραγωγή των βακτηριοσινών.<sup>30</sup> Οι εντερόκοκκοι είναι γνωστό ότι παράγουν ένα εύρος εντεροκινών που συμπεριλαμβάνουν τις εντεροκίνες A, B, I, L και P, που είναι δραστικές ενάντια στα είδη της *Listeria*, *Clostridium* και *Staphylococcus aureus*.<sup>36</sup>

#### 4.2.4 Οικολογία και Επιδημιολογία

Η προέλευση του είδους του εντεροκόκκου ποικίλει από περιβαλλοντικές σε ζωικές και ανθρώπινες πηγές. Εφόσον οι εντερόκοκκοι είναι απαραίτητο τμήμα της μικροχλωρίδας τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων η διασπορά τους είναι παρόμοια σε αυτές τις πηγές. Το *E. faecium* και το *E. faecalis* είναι τα πιο κοινά στη γαστροεντερική διαδρομή, το *E. faecium* σε παραγωγικά ζώα και τα *E. mundtii* και *E. casseliflavus* σε φυτικές πηγές.<sup>26</sup> Ο αριθμός των *E. faecalis* σε ανθρώπινα κόπρανα κυμαίνεται από  $10^5$  έως  $10^7$  ανά γραμμάριο και των *E. faecium* από  $10^4$  έως  $10^5$  ανά γραμμάριο. Η απομόνωση των *E. faecium* και *E. faecalis* είναι λιγότερο επικρατής στα ζωικά από ότι στα ανθρώπινα κόπρανα.<sup>37</sup>

Μελέτες της οικολογίας και της επιδημιολογίας του εντεροκόκκου έχουν αναφέρει ότι τα *E. faecalis* και *E. faecium* απομονώνονται συχνά από τυρί, ψάρι,

λουκάνικα, κομματιασμένο βόειο και χοιρινό κρέας.<sup>18,26</sup> Φαγητά όπως τα λουκάνικα και το τυρί που είναι ζωικής προέλευσης συσχετίζονται συχνά με επιμολύνσεις από εντερόκοκκο, μιας και είναι δυνατόν να επιβιώσει στη διαδικασία θέρμανσης. Σε μία μελέτη στην Αγγλία, δείγματα που είχαν συλλεχθεί από αστικούς υπονόμους και από καλλιεργήσιμο έδαφος στο οποίο χρησιμοποιείται κοπριά χοίρων και παράγονται σοδειές, βρέθηκαν να είναι 100% θετικά για εντερόκοκκο. Σε σοδειές που δεν χρησιμοποιούνται ζωικά λιπάσματα, το ποσοστό των εντεροκόκκων μειώθηκε στο 33%.<sup>38</sup> Μία παρόμοια έρευνα στη Γερμανία απομόνωσε 416 στελέχη εντεροκόκκου από 155 δείγματα φαγητού ζωικής προέλευσης, 72% των οποίων ήταν *E. faecalis* και το 13% *E. faecium*.<sup>39</sup>

Η διασπορά των εντεροκόκκων ποικίλει κατά μήκος της Ευρώπης. Στην Ισπανία και την Αγγλία, *E. faecalis* και *E. faecium* είναι τα πιο συνήθη απομονωμένα είδη και από κλινικά και από περιβαλλοντικά δείγματα. Η Σουηδία έχει χαμηλότερο ποσοστό εμφάνισης *E. faecium* και μεγαλύτερο ποσοστό απομόνωσης *E. hirae*, ενώ στη Δανία το *E. hirae* είναι το κυρίαρχο είδος και απομονώνεται κυρίως από σφάγια.<sup>38</sup>

Τα κλινικά στελέχη εντεροκόκκου εμφανίζουν μικρότερη ποικιλομορφία συγκριτικά με εκείνα που λαμβάνονται από το περιβάλλον και από ανθρώπινες πηγές, με το *E. faecalis* να είναι το κυρίαρχο είδος.<sup>38</sup> Ο λόγος αυτής της έλλειψης ποικιλομορφίας πιθανόν να συνδέεται με τους παράγοντες της παθογονικότητας που συσχετίζονται με το είδος αυτό. Το γεγονός ότι ο εντερόκοκκος είναι ένα καιροσκοπικό παθογόνο επισημάνθηκε από μία μελέτη στη Δανία η οποία έδειξε ότι νοσοκομειακοί ασθενείς έχουν 57% ρυθμό απομόνωσης *E. faecalis* ενώ υγιή άτομα εμφανίζουν μόνο 39-40% περιστατικά.<sup>40</sup> Οι νοσοκομειακοί ασθενείς έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες εμφάνισης εντεροκοκκικών λοιμώξεων όχι μόνο εξαιτίας της λοιμογονικότητας, αλλά και επειδή το ίδιο το νοσοκομείο είναι ένα κέντρο. Αυτό διευκρινίζεται από μία αναφορά του Τμήματος Υγείας της Αγγλίας, που επισημαίνει το γεγονός ότι οι εντερόκοκκοι μπορεί να μολύνουν και να επιβιώσουν γύρω από τον ασθενή για αρκετές ημέρες.<sup>41</sup>

#### 4.2.5 Ποσοστά μόλυνσης

Οι εντεροκοκκικές λοιμώξεις συμπεριλαμβάνουν λοιμώξεις της ουροποιητικής

οδού, ενδοκαρδίτιδες, μολύνσεις χειρουργικών τραυμάτων, βακτηριαμιές και νεογνική σήψη.<sup>42</sup> Στην Ευρώπη, οι μολύνσεις από εντεροκόκκους θεωρούνταν ακίνδυνες για τους ανθρώπους για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα. Παρολαυτά, την τελευταία δεκαετία οι εντερόκοκκοι αναφέρονται ως η δεύτερη πιο κοινή αιτία λοιμώξεων τραυμάτων και της ουροποιητικής οδού και η τρίτη πιο κοινή αιτία βακτηριαμίας.<sup>19</sup> Το 2005 στο Ηνωμένο Βασίλειο υπήρξαν 7066 αναφορές περιστατικών εντεροκοκκικής βακτηριαμίας, το 63% των οποίων ήταν λόγω *E. faecalis* και το 28% λόγω *E. faecium*, όπου και οι δύο έχουν αυξανόμενη αντοχή στα αντιβιοτικά.<sup>20</sup> Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής περίπου το 12% των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων οφείλονται σε εντεροκόκκους. Ο *E. faecalis* είναι το πιο κοινό είδος που συσχετίζεται με κλινικές λοιμώξεις ενώ ο *E. faecium* θέτει την απειλή της μεγάλης αντιβιοτικής αντοχής.<sup>43</sup>

#### 4.3 Οξαζολιδινόνες και Λινεζολίδη

Από την πρώτη αναφορά ανθεκτικών στην πενικιλίνη στελεχών *Staphylococcus aureus*,<sup>44</sup> οι Gram-θετικοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει μία πληθώρα μηχανισμών για να αποφεύγουν τους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Ιδιαίτερη ανησυχία προκαλεί η εμφάνιση σταφυλοκόκκων ανθεκτικών στην οξακιλλίνη και στα γλυκοπεπτίδια,<sup>45,46</sup> εντεροκόκκων ανθεκτικών στα γλυκοπεπτίδια<sup>47</sup> και στρεπτοκόκκων *viridans*<sup>48</sup> και *Streptococcus pneumoniae* ανθεκτικών στην πενικιλίνη.<sup>49</sup> Αυτή η αυξανόμενη αντοχή ανάμεσα στα Gram-θετικά είδη συνοδεύεται από την αυξανόμενη υπεροχή τους ως αιτίες νοσοκομειακών λοιμώξεων. Ο *S. aureus*, οι coagulase-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (coagulase-negative staphylococci, CoNS) και ο *Enterococcus* spp. αντιπροσωπεύουν τις 3 από τις 5 βασικές αιτίες βακτηριαμίας σε νοσηλευόμενους ασθενείς στις ΗΠΑ και τον Καναδά.<sup>50,51</sup> Η ευρεία εμφάνιση αντοχής στα γλυκοπεπτίδια μεταξύ των *Enterococcus* spp., και ειδικά στους *E. faecium*, είναι ιδιαίτερα ενοχλητική, μιας και μερικά στελέχη είναι ανθεκτικά σε όλους σχεδόν τους διαθέσιμους αντιμικροβιακούς παράγοντες.<sup>52</sup> Σαν αποτέλεσμα αυτού δημιουργήθηκαν νέοι αντιμικροβιακοί παράγοντες – και ορισμένοι παλιοί επαναξιολογούνται – σαν πιθανές εναλλακτικές για τη διαχείριση των λοιμώξεων εξαιτίας πολυανθεκτικών Gram-θετικών μικροοργανισμών.

Για να μειωθεί η πιθανότητα εμφάνισης αντοχής σε ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό, οι θεραπείες συνδυασμού αντιβιοτικών είναι κοινή πρακτική. Σε αυτές τις περιπτώσεις, αντιβιοτικά που εμφανίζουν διαφορετικές δράσεις ενάντια σε συγκεκριμένα παθογόνα υιοθετούνται. Η λογική είναι ότι η πιθανότητα εμφάνισης αντοχής ενάντια σε δύο αντιβιοτικά είναι δραματικά χαμηλότερη από ότι σε ένα μόνο φάρμακο; για παράδειγμα, αν ένα στα  $10^{-6}$  παθογόνα είναι ανθεκτικό ενάντια σε μεμονωμένα φάρμακα, τότε η χρήση δύο φαρμάκων με διαφορετική δράση αναστολής θα αυξήσουν την πιθανότητα κατά  $10^{-12}$ . Αυτό φυσικά δεν αποτελεί λύση του προβλήματος, γιατί αν και μειώνει την πιθανότητα αντοχής, δεν το εξαλείφει εντελώς. Έτσι, υπάρχει μία επείγουσα ανάγκη για εντατική έρευνα για νέες τάξεις αντιβιοτικών, μία διαδικασία η οποία έχει μεγάλο κόστος, απαιτεί μόχθο και είναι μερικές φορές πολύ κουραστική.

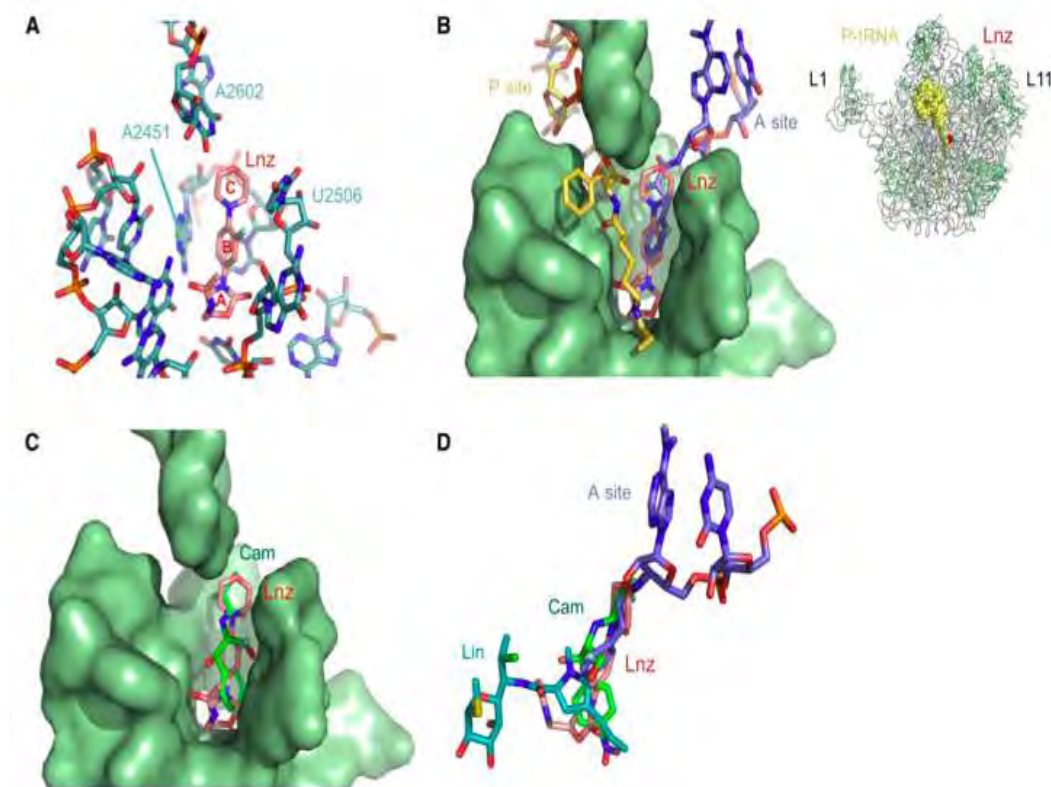
Η σημαντικότητα της μετάφρασης κάνει το ριβόσωμα έναν από τους κύριους στόχους των αντιβιοτικών μέσα στο κύτταρο. Επίσης το ριβόσωμα ανήκει σε μία από τις πιο πολύπλοκες κυτταρικές μηχανές και έτσι προσφέρει πολλά σημεία παρέμβασης. Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, μόνο μία νέα τάξη αντιβιοτικών παρουσιάστηκε στο χώρο της ιατρικής θεραπείας, επονομαζόμενη τάξη οξαζολιδινών, με τη λινεζολίδα σαν κύριο εκπρόσωπο. Η λινεζολίδα είναι ενεργή ενάντια σε gram-θετικά παθογόνα όπως επίσης και σε πολυανθεκτικά βακτηριακά στελέχη. Παρά την πληθώρα των ριβοσωμικών δομών στις οποίες επιδρούν τα αντιβιοτικά και έχουν λυθεί τα τελευταία 7 χρόνια, η τάξη των οξαζολιδινών έχει παραμείνει ανεξιχνίαστη.<sup>53,54</sup> Πάραυτα χρησιμοποιώντας μια *in vivo* τεχνική crosslinking, ο Mankin και οι συνεργάτες του κατόρθωσαν να αποδείξουν πως οι οξαζολιδινόνες προσδένονται στο ενεργό κέντρο δημιουργίας των πεπτιδικών δεσμών στη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα, δηλαδή το κέντρο της πεπτιδυλοτρανσφεράσης (peptidyltransferase center, PTC). Επιπρόσθετα στα βακτηριακά ριβοσώματα, οι οξαζολιδινόνες προσδένονται και στα μιτοχονδριακά 70S, αλλά όχι στα κυτταροπλασματικά 80S ριβοσώματα, γεγονός που εξηγεί τις παρενέργειες που παρατηρούνται σε ασθενείς που υποβάλλονται σε παρατεταμένη θεραπεία με το φάρμακο αυτό.<sup>55</sup>



σε διάφορα συστατικά στο PTC: στο νουκλεοτίδιο A2606 του 23S rRNA, στο tRNA και στην N-τελική περιοχή της ριβοσωμικής πρωτεΐνης L27. Χαρακτηριστικά, ένα επιπλέον crosslink αναγνωρίστηκε στη LepA, μία πρωτεΐνη που πρόσφατα αποδείχτηκε ότι είναι ένας παγκόσμιος βακτηριακός παράγοντας επιμήκυνσης που είναι παρόν και σε όλα τα μιτοχόνδρια.<sup>61</sup> Η LepA μεταφέρει τα 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 και έτσι αποτρέπει τα μεταφραστικά λάθη. Εφόσον ο παράγοντας αυτός προσδένεται κατά προτίμηση σε POST ριβοσώματα (Y. Qin και KHN, unpublished data),<sup>62</sup> το crosslink της LepA μπορεί να αντικατοπτρίζει ότι οι οξαζολιδινόνες παγιδεύουν τα λειτουργικά ριβοσώματα στην κατάσταση POST.

Σε ένα πρόσφατο τεύχος του Molecular Cell, ο Mankin και οι συνεργάτες του έχουν για άλλη μία φορά εφαρμόσει την in vivo τεχνική crosslinking για να αποσαφηνίσουν καλύτερα το σημείο πρόσδεσης των οξαζολιδινών,<sup>58</sup> όχι μόνο στα βακτηριακά ριβοσώματα του *Staphylococcus aureus* αλλά επίσης και σε ευκαρυωτικά μιτοχονδριακά ριβοσώματα.<sup>55</sup> Χρησιμοποιώντας φωτοδραστικές ομάδες μηδενικού μήκους και στα δύο άκρα του οξαζολιδινικού παραγώγου, ήταν εφικτό να προσδιορίσουν τη θέση της λινεζολίδης στη θέση A του PTC έτσι ώστε ο τελικός C δακτύλιος να προσανατολίζεται προς το κατάλοιπο A2606, ενώ ο δακτύλιος B εδράζεται ανάμεσα στη βάση του καταλοίπου A2451 και στη ριβόζη του καταλοίπου U2506 και ο δακτύλιος A εδράζεται προς το ριβοσωμικό τούνελ (Εικόνα A, 5). Η τοποθέτηση αυτή υποδεικνύει ότι το φάρμακο παρεμβαίνει με την ορθή τοποθέτηση του αμινοακυλιωμένου (aa)-CCA άκρου του A-tRNA, αλλά όχι με το υπόστρωμα της θέσης P (Εικόνα B, 5) και εξηγεί γιατί οι οξαζολιδινόνες ανταγωνίζονται με τα PTC προσδενόμενα φάρμακα λινκομυκίνη και χλωραμφενικόλη (Εικόνα C και D, 5). Υποδεικνύει επίσης ότι μία συγκεκριμένη διαμόρφωση του PTC απαιτείται για την πρόσδεση των οξαζολιδινών και αυτό μπορεί να προκαλείται από την παρουσία του προσδέτη της θέσης P (P-tRNA). Όντως, το κατάλοιπο A2606 είναι πολύ ευέλικτο και υιοθετεί πολλαπλές διαμορφώσεις εξαρτώμενες από τους προσδέτες του PTC.<sup>63</sup>





Εικόνα 5. Δομή λινεζολίδης και πρόσδεση της στο PTC.

## **5 Πειραματικό Μέρος**

### **5.1 Βακτηριακά στελέχη**

Η συλλογή των βακτηριακών στελεχών διεξήχθη σε δύο νοσοκομεία. Τα στελέχη εντεροκόκκων συλλέχθηκαν από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, το μεγαλύτερο νοσοκομείο τριτογενούς φροντίδας στην Κεντρική Ελλάδα με περισσότερες από 400 κλίνες (415). Τα στελέχη αυτά συλλέχθηκαν από τον Ιανουάριο του 2007 έως και το Δεκέμβριο του 2008. Τα στελέχη σταφυλοκόκκων συλλέχθηκαν από το Γενικό Νοσοκομείο << Τζάνειο >>, Πειραιά, από το Νοέμβριο του 2008 έως και τον Οκτώβριο του 2009. Στη μελέτη αυτή, επίσης, χρησιμοποιήθηκαν σαν στελέχη ελέγχου τα πρότυπα στελέχη *E. faecalis* ATCC 29212 και *S. aureus* ATCC 29213. Τα στελέχη αποθηκεύτηκαν στους -80<sup>0</sup> C σε brain heart infusion broth με συμπλήρωμα 15% glycerol πριν από την περαιτέρω εξέταση τους.

### **5.2 Καλλιέργεια - Απομόνωση**

Η απομόνωση των στελεχών έγινε στα κατάλληλα κοινά στερεά θρεπτικά υλικά, όπως: Αιματούχο άγαρ, Mueller Hinton άγαρ και σε κοινούς θρεπτικούς ζωμούς. Η επώαση των εμβολιασθέντων θρεπτικών υλικών έγινε σε αερόβιες συνθήκες στους 37<sup>0</sup> C για 24 ώρες.

### **5.3 Ταυτοποίηση**

Η ταυτοποίηση των στελεχών στηρίχθηκε στη μορφολογία των αποικιών, στη χρώση κατά Gram και στον προσδιορισμό των βιοχημικών ιδιοτήτων με το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK 2 (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France), χρησιμοποιώντας την κάρτα GP και ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επίσης, ο προσδιορισμός και η αρχική δοκιμή ευαισθησίας των εντεροκοκκικών και σταφυλοκοκκικών στελεχών έγινε για διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες με το σύστημα αυτό.

## 5.4 Έλεγχος της εναισθησίας σε αντιβιοτικά

### 5.4.1 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) με τη μέθοδο του E-test

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου E-test αποικίες καθαρού μικροβίου εναιωρήθηκαν σε θρεπτικό ζωμό και έγινε εναιώρημα πυκνότητας ισοδύναμης με 0.5 της πρότυπης κλίμακας McFarland. Το εναιώρημα με τη βοήθεια ενός βαμβακοφόρου στειλεού επιστρώθηκε σε θρεπτικό υλικό Mueller Hinton Agar σε τρεις διευθύνσεις και στην περιφέρεια του τρυβλίου ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη σπορά του υλικού. Μετά την παραμονή 5'-15 σε θερμοκρασία δωματίου τοποθετήθηκαν ταινίες εμποτισμένες με αντιβιοτικό. Κάθε ταινία αποτελείται από μία λεπτή πλαστική λωρίδα χωρίς πόρους πλάτους 5 mm και μήκους 60 mm. Στη μία πλευρά της λωρίδας αναγράφονται οι υποδιπλάσιες αραιώσεις του αντιβιοτικού σε  $\mu\text{g/ml}$  και μπορούμε να διαβάσουμε την MIC, ενώ στην άλλη πλευρά είναι προσροφημένο το αντιβιοτικό με την αντίστοιχη διαβάθμιση στις συγκεντρώσεις του. Τα τρυβλία επωάζονται σε αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C}$  και η ανάγνωση των αποτελεσμάτων γίνεται μετά από 18 έως 24 ώρες. Η MIC του φαρμάκου, που ορίζεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα που δεν επιτρέπει την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού στους  $37^{\circ}\text{C}$  μετά από 18-24 h επώασης, διαβάζεται στο σημείο που η αναστολή της ανάπτυξης του μικροβίου, υπό μορφή έλλειψης, συναντάει την ταινία.

Για τα στελέχη των εντεροκόκκων και των σταφυλοκόκκων προσδιορίστηκε η MIC για τα αντιβιοτικά λινεζολίδη, τεϊκοπλανίνη και βανκομυκίνη με την χρήση E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden). Επίσης, για τα στελέχη των εντεροκόκκων εξετάστηκε και η MIC της κουνιουπριστίνης/νταλφοπριστίνης με E-test, όπως ορίζεται από τις οδηγίες και τα ερμηνευτικά κριτήρια του Ινστιτούτου Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) και χρησιμοποιώντας ένα τελικό ενοφθάλμισμα των  $10^4$  cfu/spot. Τα στελέχη κατηγοριοποιήθηκαν ως ευαίσθητα και ανθεκτικά βάση των CLSI κριτηρίων (Ιανουάριος 2010). Για τους εντεροκόκκους το σημείο αναστολής για την βανκομυκίνη ήταν  $\leq 4$   $\mu\text{g/ml}$ , για την κουνιπριστίνη/νταλφοπριστίνη  $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$ , για την τεϊκοπλανίνη  $\leq 8$   $\mu\text{g/ml}$  και για τη λινεζολίδη ήταν 2  $\mu\text{g/ml}$  και για τους coagulase

αρνητικούς σταφυλοκόκκους το σημείο αναστολής για την βανκομυκίνη ήταν  $\leq 4$   $\mu\text{g/ml}$ , για την τεϊκοπλανίνη  $\leq 8$   $\mu\text{g/ml}$  και για τη λινεζολίδα ήταν  $\leq 4$   $\mu\text{g/ml}$ , για τα οποία ακολουθήσαμε τα κριτήρια που εγκρίνονται από το CLSI.<sup>64</sup>

#### **5.4.2 Προσδιορισμός της MIC στη λινεζολίδα με τη μέθοδο των αραιώσεων**

Σε όλα τα στελέχη σταφυλοκόκκου προσδιορίστηκε η MIC της λινεζολίδης με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων του αντιβιοτικού σε άγαρ σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο στέλεχος *S. aureus* ATCC 29213. Μετά την παρασκευή του μητρικού διαλύματος όπου προτυποποιημένη καθαρή σκόνη λινεζολίδης διαλύθηκε σε  $\text{H}_2\text{O}$  ώστε η τελική συγκέντρωση της λινεζολίδης να είναι 2  $\text{mg/ml}$ , παρασκευάστηκαν τρυβλία Mueller Hinton άγαρ (Biolife) που περιείχαν υποδιπλάσιες συγκεντρώσεις λινεζολίδης από 0.25 έως 256  $\mu\text{g/ml}$ . Συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις ήταν 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256  $\mu\text{g/ml}$ . Η ετοιμασία του ενοφθαλμίσματος των στελεχών έγινε με την εναιώρηση αποικιών από πρόσφατη καλλιέργεια 24 ωρών σε MH άγαρ, σε  $\text{H}_2\text{O}$  έως ότου επιτευχθεί πυκνότητα ισοδύναμη με της κλίμακας McFarland 0.5 McF η οποία αντιστοιχεί σε  $<3 \times 10^8$  cfu/ml. Στα τρυβλία ενοφθαλμίστηκε εναιώρημα που περιείχε περίπου  $10^4$  cfu/ml με τη βοήθεια ειδικού διανεμητή (Denley Instruments, Sussex, UK) που μεταφέρει 10  $\mu\text{l}$  του μικροβιακού εναιωρήματος. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους  $37^\circ\text{C}$  για 24 ώρες. Η μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν επέτρεπε την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού καθόρισε την MIC στη λινεζολίδα.

### **5.5 Μοριακές Μέθοδοι**

#### **Εισαγωγή**

Μοριακές μέθοδοι εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση των αντιγράφων του γονιδίου 23S rRNA των εντεροκόκκων και των σταφυλοκόκκων, αλλά ακολουθήθηκε διαφορετική προσέγγιση στα δύο διαφορετικά είδη. Το πρωτόκολλο της μοριακής μελέτης περιελάμβανε:

Για τους σταφυλοκόκκους

- εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση του γονιδίου 16S rRNA των σταφυλοκόκκων για τη μοριακή ταυτοποίηση με την ανεύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας βάσεων
- εφαρμογή της μακριάς (long) PCR για ενίσχυση τμήματος από 4358 έως 7362 bp που εσωκλείει ολόκληρο το γονίδιο που κωδικοποιεί για το 23S rRNA
- εφαρμογή της PCR φωλιάς (nested) για ενίσχυση της περιοχής V (419 bp) κάθε αντιγράφου του γονιδίου που κωδικοποιεί για το 23S rRNA ξεχωριστά
- καθαρισμός των προϊόντων της PCR και αλληλούχισή τους
- ανεύρεση της αλληλουχίας βάσεων των προϊόντων της PCR (του DNA sequencing)
- εφαρμογή της ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE)

Για τους εντεροκόκκους:

- σχεδιασμός εκκινητών που να έχουν την δυνατότητα ενίσχυσης ολόκληρου του γονιδίου 23S rRNA σε 4 αλληλοεπικαλυπτόμενα ζεύγη
- εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση όλων των αντιγράφων του γονιδίου 23S rRNA ταυτόχρονα
- καθαρισμός των προϊόντων της PCR και αλληλούχισή τους
- ανεύρεση της αλληλουχίας βάσεων των προϊόντων της PCR (του DNA sequencing)
- εφαρμογή της ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE)

## **5.6 Εξαγωγή του μικροβιακού DNA**

Η απομόνωση βακτηριακού DNA έγινε από τα στελέχη εντεροκόκκων και σταφυλόκοκκων ανθεκτικών στη λινεζολίδη. Μεμονωμένες αποικίες από την ανακαλλιέργεια που έγιναν σε Mueller Hinton άγαρ για κάθε στέλεχος χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή του γενετικού υλικού, η οποία έγινε με την

χρήση του εμπορικού kit της Qiagen που ονομάζεται Qiaamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA). Αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Δύο έως τρεις μεμονωμένες αποικίες εναιωρούνται σε 180 μl λυτικού διαλύματος (ATL Buffer) με ανάδευση για 15'. Στη συνέχεια προστίθενται 20 μl Proteinase K, γίνεται ανάδευση και επώαση στους 56<sup>0</sup> C για 2 ώρες και ενδιάμεση ανάδευση έτσι ώστε στο διάστημα αυτό επιτυγχάνεται η λύση. Μετά το τέλος της επώασης προστίθενται 200 μl λυτικού διαλύματος (AL Buffer) για να αποδεσμευτούν οι πρωτεΐνες. Σημαντική είναι η ομογενοποίηση του μείγματος με ανάδευση. Ακολουθεί επώαση στους 70<sup>0</sup>C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 200 μl απόλυτης αιθανόλης και αναδεύεται για 15'. Το ομογενοποιημένο νέο δείγμα μεταφέρεται σε ειδική στήλη εκχύλισης (QIAamp Spin column), η οποία έχει τοποθετηθεί σε ένα σωληνάριο των 2 ml. Η στήλη φυγοκεντρείται για 1 στις 8000 rpm. Η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο και προστίθεται διάλυμα πλύσεως (AW1 και AW2, 500 μl έκαστο) και φυγοκεντρείται για 1 στις 8000 rpm και 3 στις 13000 rpm αντίστοιχα. Με μία επιπλέον φυγοκέντρωση για 1 στις 14000 rpm απομακρύνουμε τα υπολείμματα των διαλυμάτων έκπλυσης. Στο τέλος της διαδικασίας στη στήλη προστίθενται 200 μl διαλύματος έκπλυσης (AE Buffer). Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5, φυγοκέντρωση για 1 στις 8000 rpm και μεταφορά σε σωληνάρια τύπου eppendorf και συντήρηση στους -20<sup>0</sup> C μέχρι τη χρήση τους.

## **5.7 Σταφυλόκοκκοι**

### **5.7.1 Εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR για την ανίχνευση του 16S rRNA των σταφυλοκόκκων**

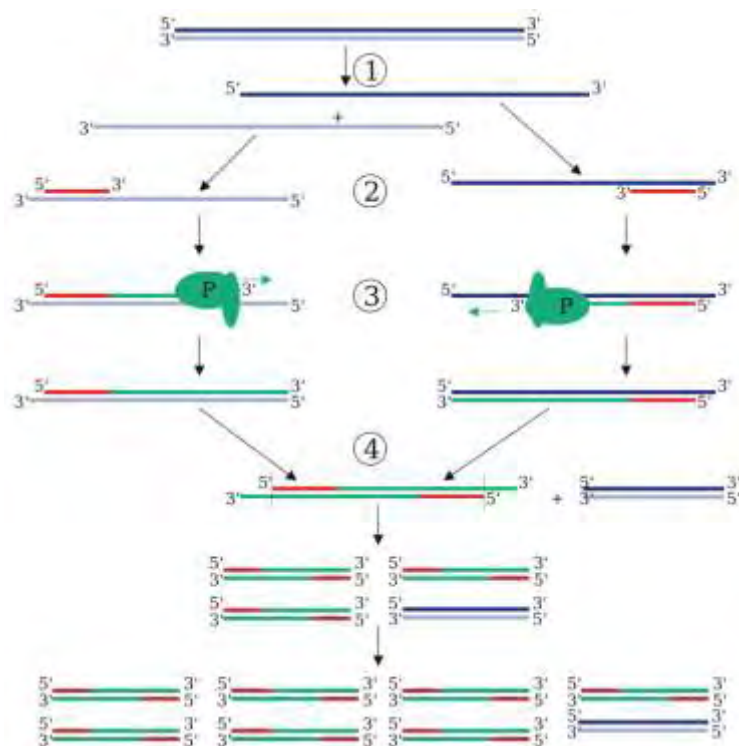
Για να επιβεβαιώσουμε την τυποποίηση των σταφυλοκόκκων σε επίπεδο είδους, που έγινε με τον έλεγχο καλλιεργητικών και βιοχημικών ιδιοτήτων, έγινε η ακριβής τυποποίηση με PCR και νουκλεοτιδική αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA που κωδικοποιεί για το 16S rRNA.

Ο τελικός όγκος για κάθε αντίδραση ήταν 50 μl που περιείχε 5 μl μικροβιακού DNA και 45 μl μείγματος αντιδραστηρίων. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν του οίκου Invitrogen. Inc, Carsbad, CA, USA και αυτά ήταν:

ένζυμο DNA πολυμεράση (Taq DNA polymerase), τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια dNTPs, 10XPCR ρυθμιστικό διάλυμα,  $MgCl_2$  50 mM και τα ζεύγη των εκκινητών.

Στον πίνακα 1 φαίνονται οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων στο διάλυμα αντίδρασης της PCR, ενώ στον πίνακα 2 φαίνονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, το μέγεθος του προϊόντος της PCR καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης. Στην PCR πολλαπλασιάζεται ένα τμήμα 1000 bp.

Η ενίσχυση του γενετικού υλικού έγινε σε θερμοκυκλοποιητή Mini Cycler της MJ Research στις κάτωθι συνθήκες: Αρχική αποδιάταξη του DNA στους  $94^{\circ}C$  για 2'. Η PCR διεξαγόταν σε 35 κύκλους που ο καθένας περιελάμβανε αποδιάταξη (denaturation) στους  $94^{\circ}C$  για 1, πρόσδεση (annealing) των εκκινητών σε κατάλληλη θέση του γονιδίου στους  $55^{\circ}C$  για 1' και σύνθεση (extension) νέων αλυσίδων DNA στους  $72^{\circ}C$  για 1'. Η τελική φάση (elongation) μετά την ολοκλήρωση των 35 κύκλων, στους  $72^{\circ}C$  διαρκούσε 10'.



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση του κύκλου της PCR (1) Αποδιάταξη στους  $94-96^{\circ}C$ . (2) Υβριδισμός στους (π.χ.)  $68^{\circ}C$ . (3) Επιμήκυνση στους  $72^{\circ}C$  (P=Polymerase=Πολυμεράση). (4) Ο πρώτος κύκλος έχει ολοκληρωθεί. Οι δύο νέοι κλώνοι θα αποτελέσουν το εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο, διπλασιάζοντας έτσι την ποσότητα του DNA που αντιγράφεται σε κάθε νέο κύκλο.

Σύσταση διαλύματος PCR (Master mix)	Ποσότητα (μl)
H <sub>2</sub> O	36.35
10XPCR Buffer	5
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1.5
dNTPs 10 mM	1.25
Εκκινητής 1 (forward) 100 pmol/μl	0.2
Εκκινητής 2 (reverse) 100 pmol/μl	0.2
Taq DNA Polymerase 5 U/μl	0.5

Πίνακας 1. Σύσταση διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε στην PCR για την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή		Μέγεθος Προϊόντος PCR (bp)	Συνθήκες PCR	Αναφορά
16S rRNA	533F	5'...GTGCCAGCAGCCGCGTAA...3'	1000	94 <sup>0</sup> C 2min, [94 <sup>0</sup> C 1min, 55 <sup>0</sup> C 1min, 72 <sup>0</sup> C 1min] x 35, 72 <sup>0</sup> C 10min	Relman <sup>65</sup>
	RP2	5'...ACGGCTACCTTGTTACGACTT...3'			Weisburg <sup>66</sup>

Πίνακας 2. Γονίδιο στόχος, νουκλεοτιδική αλληλουχία εκκινητή, μέγεθος προϊόντος και συνθήκες αντίδρασης PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA

### 5.7.2 Εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR για την ανίχνευση του 23S rRNA των σταφυλοκόκκων

Για να εντοπίσουμε τις μεταλλάξεις που προκαλούν την αντοχή στη λινεζολίδη σε κάθε στέλεχος εφαρμόσαμε 12 διαφορετικές αντιδράσεις PCR. Οι PCR αυτές είχαν σαν αποτέλεσμα την μοριακή ενίσχυση ολόκληρου του γονιδίου 23S rRNA που κωδικοποιεί για την μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος.

Αρχικά, με την χρήση έξι ζευγών εκκινητών ενισχύσαμε τα διαφορετικά αντίγραφα του γονιδίου που κωδικοποιούν για το 23S rRNA των σταφυλοκόκκων. Ο τελικός όγκος για κάθε αντίδραση ήταν 50 μl που περιείχε 2 μl μικροβιακού DNA και 48 μl μείγματος αντιδραστηρίων. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν



του οίκου Invitrogen. Inc, Carlsbad, CA, USA και αυτά ήταν: μείγμα ενζύμων ελονγκάσης (Elongase<sup>®</sup> Enzyme Mix, μείγμα Taq πολυμεράσης και GB-D θερμοσταθερών πολυμερασών του είδους *Pyrococcus*), τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια dNTPs, 5X Buffer A και 5X Buffer B που συνδυαζόμενα δίνουν την επιθυμητή συγκέντρωση  $Mg^{+}$  1.6 mM και τα ζεύγη των εκκινητών.

Κατόπιν, με την χρήση ενός ζεύγους εκκινητών ενισχύσαμε σε κάθε αντίγραφο ξεχωριστά μία εσωτερική περιοχή της V περιοχής του 23S rRNA των σταφυλοκόκκων μήκους 419 bp. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης για την ενίσχυση των αλληλεπικαλυπτόμενων τμημάτων του 23S rRNA ήταν 50  $\mu$ l που περιείχε 1  $\mu$ l μικροβιακού DNA και 49  $\mu$ l μείγματος αντιδραστηρίων (master mix). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν του οίκου Invitrogen. Inc, Carlsbad, CA, USA και αυτά ήταν: ένζυμο, DNA πολυμεράση (Platinum<sup>®</sup> Pfx DNA Polymerase), τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια dNTPs, 10X Pfx Amplification Buffer ρυθμιστικό διάλυμα,  $MgSO_4$  1 mM και τα ζεύγη των εκκινητών.

Στον πίνακα 3 φαίνονται οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων στο διάλυμα αντίδρασης της PCR που έγιναν με την χρήση του μείγματος ελονγκάσης, στον πίνακα 4 με την Platinum<sup>®</sup> Pfx DNA Polymerase, ενώ στον πίνακα 5 οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, το μέγεθος των προϊόντων των PCR καθώς και οι συνθήκες των αντιδράσεων.

Σύσταση διαλύματος PCR (Master Mix)	Ποσότητα ( $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O	33
5X Buffer A [300 mM Tris-SO <sub>4</sub> , (pH 9.1 στους 25°C), 90 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> και 5 mM MgSO <sub>4</sub> ]	4
5X Buffer B [300 mM Tris-SO <sub>4</sub> , (pH 9.1 στους 25°C), 90 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> και 10 mM MgSO <sub>4</sub> ]	6
dNTPs 10 mM each	1
Εκκινητής 1 (forward) 100 pmol/ $\mu$ l	1
Εκκινητής 2 (reverse) 100 pmol/ $\mu$ l	1
Elongase enzyme mix	2

Πίνακας 3. Σύσταση διαλύματος PCR με την χρήση του Elongase<sup>®</sup> Enzyme Mix

<b>Σύσταση διαλύματος PCR (Master Mix)</b>	<b>Ποσότητα (μl)</b>
H <sub>2</sub> O	39
10X Pfx Amplification Buffer	5
MgSO <sub>4</sub> 1 mM	1
dNTPs 10 mM each	1.5
Εκκινητής 1 (forward) 100 pmol/μl	1
Εκκινητής 2 (reverse) 100 pmol/ μl	1
Platinum Pfx DNA Polymerase 2.5 U/ μl	0.5

Πίνακας 4. Σύσταση διαλύματος PCR με την χρήση της Platinum® Pfx DNA Polymerase

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή		Μέγεθος Προϊόντος PCR (bp)	Συνθήκες PCR	Αναφορά
rrlA	F	5'...AAACCAATTGGGATTAAAGT...3'	5548	94 <sup>0</sup> C 30 sec, [94 <sup>0</sup> C 30 sec, 50 <sup>0</sup> C 30 sec, 68 <sup>0</sup> C 6 min] x35,	Liakopoulos <sup>67</sup>
	R	5'...TTCGAGGGATCTTATAACCG...3'			
rrlB	F	5'...CCTCCAACCTGGTGGTCTAGG...3'	6371	94 <sup>0</sup> C 30 sec, [94 <sup>0</sup> C 30 sec, 48 <sup>0</sup> C 30 sec, 68 <sup>0</sup> C 6 min] x35,	
	R	5'...TCCTTGCCATTGTCACCAGA...3'			
rrlC	F	5'...GAGTCCACTTAGGCCACCA...3'	5999	94 <sup>0</sup> C 30 sec, [94 <sup>0</sup> C 30 sec, 50 <sup>0</sup> C 30 sec, 68 <sup>0</sup> C 6 min] x35,	
	R	5'...CTACTCTTTTTATAGCAATG...3'			
rrlD	F	5'...GCCTGGCAACGTCCTACTCT...3'	7362	94 <sup>0</sup> C 30 sec, [94 <sup>0</sup> C 30 sec, 56 <sup>0</sup> C 30 sec, 68 <sup>0</sup> C 6 min] x35,	
	R	5'...AACATTTATTCTCGATGAAA...3'			
rrlE	F	5'...TGTTGATGGAGCTTCAGTAG...3'	4358	94 <sup>0</sup> C 30 sec, [94 <sup>0</sup> C 30 sec, 57 <sup>0</sup> C 30 sec, 68 <sup>0</sup> C 6 min] x35,	
	R	5'...TAACCATTTGGAGCTAGCCG...3'			
rrlF	F	5'...TCTTGTATCTCTTCCTACTA...3'	6058	94 <sup>0</sup> C 30 sec, [94 <sup>0</sup> C 30 sec, 55 <sup>0</sup> C 30 sec, 68 <sup>0</sup> C 6 min] x35,	
	R	5'...TAACCATTTGGAGCTAGCCG...3'			
Part of domain V	L1	5'...GCGGTCGCCTCCTAAAAAG...3'	419 bp	94 <sup>0</sup> C 2 min, [94 <sup>0</sup> C 45 sec, 58 <sup>0</sup> C 30 sec, 68 <sup>0</sup> C 35 sec] x35, 72 <sup>0</sup> C 10 min	
	L2	5'...ATCCCGGTCCTCTCGTACTA...3'			

Πίνακας 5. Εκκινητές και συνθήκες PCR για ενίσχυση των αντιγράφων του γονιδίου 23S rRNA των σταφυλοκόκκων

## 5.8 Εντερόκοκκοι

### 5.8.1 Σχεδιασμός εκκινητών με δυνατότητα ενίσχυσης ολόκληρου του γονιδίου 23S rRNA σε 4 αλληλοεπικαλυπτόμενα ζεύγη

Για να ενισχύσουμε ολόκληρο το γονίδιο 23S rRNA σχεδιάσαμε 4 αλληλοεπικαλυπτόμενα ζεύγη εκκινητών που συνολικά ενισχύουν μία περιοχή 3603 bp που κωδικοποιεί για όλο το 23S rRNA. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με την χρήση του προγράμματος Oligo Explorer 1.2 (Gene Link, 2004). Με την χρήση των εκκινητών αυτών ενισχύουμε διαδοχικά και αλληλοεπικαλυπτόμενα τμήματα του γονιδίου. Ο σχεδιασμός έγινε βάση του γονιδιώματος του στελέχους *Enterococcus faecium* LMG 11423 (accession number in core nucleotide AJ295305) (Πίνακας 6) και του στελέχους *Enterococcus faecalis* LMG 7937 (accession number in core nucleotide AJ295306) (Πίνακας 7).

<i>Enterococcus faecium</i>
23S rRNA genome strain LMG 11423 (accession number in core nucleotide AJ295305)
gggtaagtgaataagggcgacggtggatgccttggcactaggagccgatgaaggacgggactaacaccgatatgctttgggga gctgtacgtaagctatgatccagagatttccgaatgggggaacccaacatcttaataggatgttacgattgtgtgaatacatagcac attcgaggtagacgcagagaactgaaacatctaagtacctgcaggaagagaaaattcgattccctgagtagcggcgagc gaaacgggaaaagcccaaacacagcaagcttgcttgggggttaggactccaatatggtagttcttcagatagtcgaatgactt ggaaaagtcagtcaaaagagggtaaaaaccccgtagacgaaatgtggaagacacctaggaggatcctgagtagcgcggaaca cgagaaattccgctcgaatccgggaggaccatctccaaaggctaaatactccctagtgaccgatagtgaaaccagtagcgtgagg gaaaggtgaaaagcaccgggaaggggagtgaaatagaacctgaaaccgtgtgcctacaacaagtcaaaagcccgtaaatgg gtgatggcgtgctttttagaatgaaccggcgagttacgattgcagtgagggttaagttgaagagacggagccgcagcgaagac gagctcgaataggcgcttttagtatgtatgtagcgtagacccgaaaccatgtgatctaccatgtccaggttgaaggtgcggtaaaacg cactggaggaccgaaccacgtagctgtgaaaagtgccgggagtgagggtgtgggtagcggagaaattccaaacgaacttgagat agctgggtctctcgaatagcttttaggcttagcctcggaaatgagaatgatggaggtagagcactgttggactaggggccatct cgggttaccgaattcagataaactccgaatgccattcattcatatccgggagtcagactgtgagtataagatccatagtcgaaag ggaaacagcccagaccaccagtaagggtcccaaatatgttaagtggaaaaggatgtggggttcacagacaactaggatg ttggcttagaagcagccaccatttaaagagtgctgaatagctcactagtcgagtgaccctgcgccgaaaatgtaccggggtaaa catattaccgaagctgtggagtacacctttaggtgattggtaggagagcgttctaaggcgctcgaaggcagatcgtgaggactgt ggagcgcttagaagtgagaatgccggtatgtagtagcgaagacaggtgagaatcctgtccaccgaatgactaagggttctctggg gaaggctcgtccgcccagggttagtcgggacctaagccgagggcgcagagcgtaggcgatggataacaggttgatattcctgta cccggtttttgttgagcaatggaggacgcaggaggtaaggaatgcagacgatcggaatgtctgtccaagcagtaagtctg aagaggagtcaaatgcttcttctaaggacaagctgtgatggggagggaataatagtagcgaaggtcctgatgtcacactgccg agaaaagcttctagttagaaaacagcgcccgtagcgaacacaggtagtcgaggagagaatcctaaggtagcga gagaactctcgtaaggaactcggaataatgaccccgtaactcgggagaaggggtgctgatcatagatcagccgcagtgat aggcccaagcgactgttatcaaaaaacaggtctctgcaaaatcgtaagatgaagtataggggctgacgcctgcccggtgctgg aagggttaagaggagtgcttagcgagcgagggtacgaattgaagcccgtaaacggcgccgtaactataacgggtcctaagg tagcgaaattcctgtcgggtaagttccgacccgcagaaaggcgtaacgatttgggactgtctcaacgagagactcggtgaaat tttagtacctgtgaagatgcaggttaccgcgacaggacggaagaccccatggagcttactgtagttgatattgagtgtctgac cgcatgtacaggataggtaggagccgtgaaatcggaacgtagtttcgatggagcgcgctgggtgggatactaccctgcgtta tgccactctaaccgcaccactaatcgtggtgggagacagtgatgggcagtttgactggggcggtgcctcctaaaaggt aacggaggcgcccaagggtccctcagaatgggtggaaatcattcgaagagtgtaaaggcagaagggagcttgactgcgagac

caacaagtcgagcagggacgaaagtcgggcttagtgatccgggtggttcgcatggaagggccatcgctcaacggataaaagct  
 accctggggataacaggcttatctccccaagagtcacatcgacggggaggttggcacctcgatgctggctcgatcctgg  
 ggctgtagtcggcccaagggttgggctgttcgccattaaagcggcgagctgggtcagaacgctgtagacagttcggc  
 cctatccgctcgggcggttgaaattgagaggagctgtccttagtacgagaggaccgggtaggactaccgctggtgtaccagttg  
 ttctgccaaggttttctggttagctatgtagggaagggataaacgctgaaagcatctaagtgtgaagcccacctaagatgagat  
 ttccatttcttaagaaagtaagatccctgagagatgatcaggtagataggtcaggagtggaagtacagtgtatggagcgga  
 ctgatactaatacgatcaggacttaaccaa

Πίνακας 6. Γονιδιώματος στελέχους *Enterococcus faecium* LMG 11423.

<i>Enterococcus faecalis</i>
23S rRNA genome strain LMG 7937 (accession number in core nucleotide AJ295306)
ggtaagtgaataagggcgacggtggatgccttggcactaggagccgatgaaggacgggactaacaccgatatgctttgggga gctgtaagtaagctatgatccagagatttccgaatgggggaaccaataatctttataggatattcttccagtgatacatagctgatt agaggtagacgcagagaactgaaacatcttagtacctgcaggaagagaaaattcgattccctgagtagcggcgagcga aacgggaagagcccaaccaacaagcttgcctgttggggttaggactccaatatggtagctgttagtatagttgaaggatttgg aaaattccgctaaaagaggggtgaaagccccgtagacgaaatgtaacaacacctaggaggatcctgagtacggcggaacacga gaaattccgctcggaatccgcggggaccatccccgaaggctaaatactccctagtgaccgatagtgaaccagtagcgtgagggga aagggtgaaaagcaccgggaagggtgaaatagatcctgaaaccgtgtgcctacaacaagtcaaagctcgtaaatgagtgga tggcgtgcctttgtagaatgaaccggcgagttacgattgcatgcgaggttaagtcgaagagacggagccgcagcgaaagcgag tctgaatagggcgaatgagtagtagtcgtagacccgaaaccatgtgatctacccatgtccagggtgaaggtgcggtaaaaacgca ctggaggaccgaaccacgtacgttgaagtgcggggatgaggtgtgggtagcggagaaattccaacgaacttggagatag ctggttctctccgaaatagctttagggctagcctcggaattgagaatgatggaggtagagcactgttggactaggggccatctcg ggttaccgaattcagataaactccgaatgccattcatttatccgggagtcagactgcgagtgataagatccgtagtcgaaaggg aaacagcccagaccaccagtaaggtcccaaatatgttaagtggaaaaggatgtggggtgcacagacaactaggatgttg gcttagaagcagccaccattaaagagtgctgaatagctactagtcgagtgaccctgcgcccgaatgtaccggggctaaacat attaccgaagctgtggactacaccattaggttagtggttaggagagcgttctaagggcgttgaaggctgacgtgaggacggctgg agcgttagaagtgagaatgccggtatgtagtcgaaagacaggtgagaatcctgtccaccgtatgactaaggttccctggggaa ggctcgccgcccagggttagtcgggacctaagccgagggcgatagcgtaggcgatggacaacaggttgatattcctgtacca gttgttttgttggaatggaggacgcagtaggctaaggaatgcatgcgattggaagtgcagtgccaagcaatgagctctgagta gagttaaagcttactcttaaggacaagttgtgacggggagcgaaataatagtagcgaagttcctgatgtcacactccaagaaa agctttagtgagaaaacaactgccgtaccgtaaacggacacaggtagtcgaggagagtagtccaaagtgagcgagcgaact ctggttaaggaactcggcaaaatgaccccgtaactcgggagaaggggtgctgacttcggtcagccgcagtgaataggcccaag cgactgttatcaaaaacacaggtctctgcaaaatcgtaagatgaagtaggggctgacgcctgcccggtgctggaagggttaag aggatgggttagcttcggcgaagtcagaattgaagccccagtaaacggcgccgtaactataacggctcaaggtagcgaaat tcctgtcgggtaagttccgaccgcacgaaaggcgtaacgattgggcactgtcacaacgagagactcgggtgaatttttagtacct gtgaagatgcaggttaccgcgacaggacggaagaccccatggagcttactgtagttgatattgagtggttaccacatgtac aggataggtaggagccgatgagaccggaacgctagttcggaggaggcgctggtgggatactaccctgtgttatgaaccctcta acccgaccactaatcgtggtgggagacagtgatgggcagtttgactggggcggtcgctcctctaaaaaggtaacggaggcg ccaaaagggtccctcagaatggttgaaatcattcgaagagtgtaaaggcagaaggagcttgactgcgagacctacaagtcga gcagggacgaaagtcgggcttagtgatccggtggttccgcatggaaggccatcgctcaacggtaaaagctaccctggggataa caggcttatcccccaagagtcacatcgacggggaggttggcacctcgatgctggctcgctcgatcctggggctgtagtcgggtc ccaagggttgggctgttcgccattaaagcggcacgcgagctgggttcagaacgctgtagacagttcggctcctatccgctcgcg gcgttggaatttgagaggagctgtccttagtacgagaggacgggtaggactaccgctggtgtaccagttgttctgccaagggc attgtcgggttagctatgtagggaagggataaacgctgaaagcatctaagtgtgaagcccacctaagatgagattccatttctta agaaagtaagaccctgagagatgatcaggtagataggttgaagtggaaggctagtgatagttggagcggaaccaataactaatc ggctcaggacttaaccaa

Πίνακας 7. Γονιδιώματος στελέχους *Enterococcus faecalis* LMG 7937

23S rDNA περιοχή ενίσχυσης	Αλληλουχία εκκινητή		Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)	Συνθήκες PCR
12-731	F	5'...TAAGGGCGCACGGTGGATG....3'	719bp	94 <sup>0</sup> C 2min, [94 <sup>0</sup> C 45sec, 62 <sup>0</sup> C 30sec, 68 <sup>0</sup> C 60sec] x35, 72 <sup>0</sup> C 10min
	R	5'...GGGTAGATCACATGGTTTCGGG....3'		
597-1486	F	5'...GTGCCTTTTGTAGAATGAACCG...3'	889bp	94 <sup>0</sup> C 2min, [94 <sup>0</sup> C 45sec, 60 <sup>0</sup> C 30sec, 68 <sup>0</sup> C 60sec] x35, 72 <sup>0</sup> C 10min
	R	5'...ATTCCTTAGCCTACTGCGTC...3'		
1319-2143	F	5'...AGAATCCTGTCCACCGTATG...3'	824bp	94 <sup>0</sup> C 2min, [94 <sup>0</sup> C 45sec, 58 <sup>0</sup> C 30sec, 68 <sup>0</sup> C 60sec] x35, 72 <sup>0</sup> C 10min
	R	5'...CGGCTCCTACCTATCCTG...3'		
1988-2896	F	5'...GTAACGATTGGGCACTGTC...3'	908bp	94 <sup>0</sup> C 2min, [94 <sup>0</sup> C 45sec, 58 <sup>0</sup> C 30sec, 68 <sup>0</sup> C 60sec] x35, 72 <sup>0</sup> C 10min
	R	5'...CGATTAGTATTGGTCCGCTC....3'		

Πίνακας 8. Εκκινητές και συνθήκες PCR για ενίσχυση του γονιδίου 23S rRNA των εντεροκόκκων

### 5.8.2 Εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την ενίσχυση του γονιδίου 23S rRNA των εντεροκόκκων

Σε κάθε στέλεχος εφαρμόστηκαν 4 διαφορετικές αντιδράσεις PCR για την μοριακή ενίσχυση ολόκληρου του γονιδίου 23S rRNA που κωδικοποιεί για την μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος.

Η χρήση θετικών μαρτύρων δεν ήταν απαραίτητη εφόσον όλα τα βακτηριακά στελέχη φέρουν το γονίδιο που κωδικοποιεί για την μικρή υπομονάδα των ριβοσωμάτων τους. Ως αρνητικός μάρτυρας προς ανίχνευση πιθανής επιμόλυνσης της αντίδρασης με εξωγενές DNA, χρησιμοποιήθηκε νερό ελεύθερο νουκλεασών.

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης για την ενίσχυση των αλληλεπικαλυπτόμενων τμημάτων του 23S rRNA ήταν 50 µl που περιείχε 2 µl μικροβιακού DNA και 48 µl μείγματος αντιδραστηρίων (master mix). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν του οίκου Invitrogen. Inc, Carlsbad, CA, USA και αυτά ήταν: ένζυμο, DNA πολυμεράση (Platinum® Pfx DNA Polymerase), τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια dNTPs, 10X Pfx Amplification Buffer ρυθμιστικό διάλυμα, MgSO<sub>4</sub> 1 mM και τα ζεύγη των εκκινητών. Στον πίνακα 9 φαίνονται οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων στο διάλυμα αντίδρασης της PCR,

ενώ στον πίνακα 8 φαίνονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, το μέγεθος των προϊόντων της PCR καθώς και τις συνθήκες της αντίδρασης.

Η ενίσχυση του γενετικού υλικού έγινε στο θερμοκυκλοποιητή Mini Cycler της MJ Research στις κάτωθι συνθήκες: Αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94<sup>0</sup> C για 2'. Η PCR διεξαγόταν σε 35 κύκλους που ο καθένας περιελάμβανε την αποδιάταξη (denaturation) στους 94<sup>0</sup> C για 45', πρόσδεση (annealing) των εκκινητών σε κατάλληλη θέση του γονιδίου στους 58<sup>0</sup> έως 62<sup>0</sup> C (ανάλογα με το ζεύγος εκκινητών) για 30' και σύνθεση (extension) νέων αλυσίδων DNA στους 68<sup>0</sup> C. Η τελική φάση (elongation) μετά την ολοκλήρωση των 35 κύκλων, στους 72<sup>0</sup> C διαρκούσε 10'.

<b>Σύσταση διαλύματος PCR (Master Mix)</b>	<b>Ποσότητα (μl)</b>
H <sub>2</sub> O	38
10X Pfx Amplification Buffer	5
MgSO <sub>4</sub> 1 mM	1
dNTPs 10 mM each	1.5
Εκκινητής 1 (forward) 100 pmol/μl	1
Εκκινητής 2 (reverse) 100 pmol/ μl	1
Platinum Pfx DNA Polymerase 2.5 U/ μl	0.5

Πίνακας 9. Σύσταση διαλύματος PCR

## 5.9 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR και αλληλούχιση τους

Στα PCR προϊόντα που επρόκειτο να υποβληθούν στη διαδικασία ανεύρεσης αλληλουχίας βάσεων εφαρμόστηκε καθαρισμός με το σύστημα του εμπορικού kit ChargeSwitch® PCR Clean-Up Kit (Invitrogen. Inc, Carlsbad, CA, USA) για την απομάκρυνση αλάτων, εκκινητών, dNTPs και άλλων μη νουκλεϊκών αντιδραστηρίων. Εφαρμόστηκε το προτεινόμενο από τον κατασκευαστή πρωτόκολλο. Συγκεκριμένα:

Σε 40 μl προϊόντος PCR προσθέτουμε 40 μl ρυθμιστικού διαλύματος καθαρισμού και 10 μl από τα μαγνητικά σφαιρίδια (ChargeSwitch Magnetic Beads) και αναδεύουμε ελαφρά μέχρι να ομογενοποιηθεί το διάλυμα. Μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1' το δείγμα μεταφέρουμε σε μαγνητική στήλη

MagnaRack και αφήνουμε να επωαστεί για 1' ή μέχρι να δημιουργηθεί σφιχτό ίζημα. Χωρίς να αφαιρέσουμε το σωληνάριο από το MagnaRack αφαιρούμε και απορρίπτουμε το υπερκείμενο χωρίς να διαταράξουμε το ίζημα. Ακολουθεί το στάδιο καθαρισμού του DNA. Προσθέτουμε 150 µl διαλύματος πλύσεως W12 και αναδεύουμε ελαφρά για ομογενοποίηση του δείγματος. Κατόπιν, επωάζουμε για 1' στο MagnaRack για διαχωρισμό των μαγνητικών σφαιριδίων. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο χωρίς να διαταράξουμε το ίζημα. Ακολουθεί το στάδιο έκλουσης του DNA με προσθήκη 50 µl Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) και ελαφρά ανάδευση για ομογενοποίηση του δείγματος. Επωάζουμε στο MagnaRack για 1' σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο περιέχει το καθαρό PCR προϊόν.

Η μέθοδος της ανεύρεσης αλληλουχίας βάσεων εφαρμόστηκε για τον ακριβή εντοπισμό των μεταλλάξεων που εδράζονται στο γονίδιο που κωδικοποιεί για το 23S rRNA των στελεχών αυτών. Η διαδικασία του προσδιορισμού της αλληλουχίας των βάσεων έγινε σε αυτόματο DNA sequencer (Applied Biosystems) της εταιρίας παροχής υπηρεσιών αλληλούχισης LARK Technologies (Cogenics Ltd, Essex, UK).

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων των προϊόντων της PCR έγινε με την εφαρμογή της μεθόδου Sanger. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη χρήση σημασμένων διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs). Αυτά είναι σημασμένα με τέσσερις διαφορετικές χρωστικές μία για κάθε βάση και στερούνται της 3-OH ομάδας, με αποτέλεσμα να ενσωματώνονται στη νουκλεοτιδική αλληλουχία και να εμποδίζουν την προσθήκη άλλων νουκλεοτιδίων. Έτσι προκύπτουν αλληλουχίες DNA με ποικίλο μήκος που αντιστοιχούν σε διαφορετικές θέσεις ενσωμάτωσης των ddNTPs και ανιχνεύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η αρχική φάση γίνεται όπως και η PCR σε θερμοκυκλοποιητή, με τη διαφορά ότι στην ανάλυση αλληλουχίας των βάσεων χρησιμοποιείται ένας εκκινητής που οδηγεί σε γραμμικό πολλαπλασιασμό των προϊόντων επέκτασης. Για κάθε δείγμα γίνονται 4 ξεχωριστές αντιδράσεις σε αντίστοιχα σωληνάκια που το καθένα περιέχει όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την *in vitro* σύνθεση του DNA, τα σημασμένα διδεοξυνουκλεοτίδια (ddATP ή ddCTP ή ddGTP ή ddTTP) και έναν εκκινητή. Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται 4 σημασμένα DNA θραύσματα διαφορετικού μήκους. Για την τελική ανίχνευση των θραυσμάτων του γίνεται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η ανάλυση του ηλεκτροφορήματος και η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων των βάσεων γίνεται με αυτόματο αναλυτή (DNA sequencer). Οι αλληλουχίες βάσεων που ανευρέθηκαν συγκρίθηκαν με τις καταχωρημένες



αλληλουχίες πρότυπων στελεχών στην Τράπεζα Γονιδιακών Πληροφοριών, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Genbank που διατίθεται από το NCBI, National Center for Biological Information.<sup>68</sup>

### **5.10 Γενετική συσχέτιση των στελεχών με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)**

Με την ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο πεδίο μελετήθηκε η γενετική συγγένεια των κλινικών στελεχών της μελέτης και η αναζήτηση της τυχόν κλωνικής διασποράς της αντοχής. Η μέθοδος εκτελέστηκε σε συσκευή ηλεκτροφόρησης, CHEF-DRIII (BioRad, Hemel Hempstead, UK). Το πρωτοκόλλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

- Αρχικά τα στελέχη καλλιεργούνται σε τρυβλία που περιέχουν Tryptic Soy άγαρ και επωάζονται στους 37<sup>0</sup> C για 20h.
- Γίνεται ανακαλλιέργεια από μία αποικία από τα τρυβλία σε 5 ml Tryptic Soy Broth (Biolife) και επωάζονται στους 37<sup>0</sup> C για 20h.
- Το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 3500 rpm για 5' και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Στο ίζημα προστίθεται 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος PIV (0.01 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8.0) και γίνεται ανασύσταση αυτού.
- Ακολουθεί η μέτρηση των McFarland. Σε 1 ml καθαρού διαλύματος PIV προσθέτουμε ποσότητα από το προαναφερθέν διάλυμα τόση ώστε η θολρότητα του να είναι αντίστοιχη με το βαθμό 5.0 της κλίμακας McFarland.
- Το διάλυμα αυτό φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 3', απορρίπτεται το υπερκείμενο και γίνεται ανασύσταση του ιζήματος σε 200 μl PIV.
- Παρασκευάζεται διάλυμα αгарόζης 2% χαμηλού σημείου τήξεως (Low Melting Temperature Agarose, Cambrex Bio Science Rockland Inc., ME, USA) σε ρυθμιστικό διάλυμα PIV και διατηρείται σε υδατόλουτρο στους 42<sup>0</sup> C μαζί με τα εναιωρημένα στελέχη για τουλάχιστον 10'.
- Όγκος 100μl πηκτής αгарόζης αναμειγνύεται με 100 μl δείγματος και τοποθετούνται 6-8 κηλίδες μείγματος αгарόζης-μικροβίου των 20 μl για κάθε στέλεχος, επάνω σε γυάλινο εκμαγείο (γυάλινη πλάκα) και καλύπτονται με αντικειμενοφόρους πλάκες. Τοποθετείται το εκμαγείο με τις κηλίδες στις οποίες

έχει εγκλωβιστεί το μικροβιακό εναιώρημα στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για αυστηρά 5' και στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου για 5'.

- Σε αποστειρωμένα σωληνάρια με 1 ml διαλύματος EC (6 mM Tris, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0.2% sodium deoxycholate, 0.5% sodium laurylsarcosine, pH 8.0) που περιέχει 100  $\mu\text{g/ml}$  lysozyme (Sigma-Aldrich), 50  $\mu\text{g/ml}$  RNaseA (Sigma-Aldrich) και 50  $\mu\text{g/ml}$  lysostaphin (Sigma-Aldrich) τοποθετείται η πηκτή αγαρόζης με τα μικροβιακά κύτταρα και επωάζεται στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 20 ώρες έτσι ώστε να καταστραφεί το μικροβιακό τοίχωμα. Αφήνεται το υλικό στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 10' ώστε να στερεοποιηθεί και πάλι η αγαρόζη και στη συνέχεια αφαιρείται όλο το διάλυμα EC.
- Το διάλυμα EC αντικαθίσταται από 1 ml διαλύματος ESP (0.5 M EDTA, 1% sarcosyl, pH 9.0) το οποίο περιέχει 1  $\text{mg/ml}$  πρωτεΐνωση K (Bioline), περιεκτικότητας 40 U/mg, και τα πλακίδια επωάζονται ολονύκτια στους  $60^{\circ}\text{C}$  ώστε να γίνει η πέψη όλων των κυτταρικών πρωτεϊνών.
- Αφαιρείται το διάλυμα ESP και ακολουθούν 5 διαδοχικά πλυσίματα με διάλυμα TE (10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, pH 8.0) ανά 20' ώστε να αφαιρεθούν όλα τα υπολείμματα της πρωτεΐνωσης K και των πρωτεϊνικών καταλοίπων. Η αγαρόζη (κηλίδα) που περιέχει τώρα μόνο το μικροβιακό DNA μπορεί να αποθηκευτεί στους  $4^{\circ}\text{C}$  σε διάλυμα TE.
- Γίνεται πέψη του DNA με το περιοριστικό ένζυμο SmaI (10 U/ $\mu\text{l}$ ). Για κάθε στέλεχος χρειαζόμαστε 80  $\mu\text{l}$  ρυθμιστικού διαλύματος Tango 1X, που περιέχει 40 units SmaI. Για την πέψη του DNA απαιτείται επώαση ολονύχτια στους  $30^{\circ}\text{C}$ .
- Προστίθεται σε κάθε δείγμα 10  $\mu\text{l}$  χρωστικής 10X Blue Juice Loading Buffer (65% w/v sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.3% w/v Bromophenol Blue) και τοποθετείται η αγαρόζη (κηλίδες) στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 10' ώστε να απενεργοποιηθεί η δράση του ενζύμου. Τα κομμάτια της αγαρόζης με το γενωμικό DNA τοποθετούνται και ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης (1% agarose for pulsed field electrophoresis running gel σε 0.5X TBE). Το γενωμικό DNA κάθε στελέχους, κατά την ηλεκτροφόρηση, αναλύεται σε ηλεκτροφορητικές ταινίες ανάλογα με το μέγεθος των κομματιών του που προκύπτει από τη δράση του περιοριστικού ενζύμου. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης στις παρακάτω συνθήκες:  $T=11.3^{\circ}\text{C}$ ,  $V=6\text{Volts/cm}$ ,  $120^{\circ}$  switch angle, initial switch time 5'', final switch time 35''. Οι συνθήκες αυτές

είναι κοινές για τα στελέχη εντεροκόκκων και σταφυλοκόκκων. Όμως ο συνολικός χρόνος διαφέρει στα δύο είδη. Έτσι για τους εντεροκόκκους ο συνολικός χρόνος ανέρχεται στις 18.5 ώρες ενώ στους σταφυλοκόκκους στις 20 ώρες. Ως μάρτυρας μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα PULSE MARKER™ 50-1,000 kb (Sigma-Aldrich) που περιέχει τεμάχια γενώματος λ φάγου γνωστών μεγεθών.

- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή της αгарόζης τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο και χρωματίζεται σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου τελικής συγκέντρωσης 1 µg/ml για 30'. Η πηκτή αποπλένεται για 5' με απεσταγμένο νερό και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία. Το ηλεκτροφόρημα παρατηρείται σε UV ακτινοβολία και τυπώνεται ψηφιακά. Η ψηφιακή ανάλυση και η εξαγωγή της φυλογενετικής σχέσης των στελεχών έγινε με το λογισμικό Quantity One (BioRad). Τα κριτήρια που εφαρμόστηκαν για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων είναι αυτά που πρότειναν οι Tenover και συνεργάτες.<sup>69</sup> Δύο στελέχη θεωρείται ότι ανήκουν στον ίδιο επιδημικό κλώνο όταν η διαφορά τους περιορίζεται σε έξι ή λιγότερες διαφορές στις ταινίες του ηλεκτροφορητικού τους προτύπου. Τα στελέχη που ονομάζονται διαφορετικά και δε σχετίζονται επιδημιολογικά έχουν πάνω από έξι διαφορές στα ηλεκτροφορητικά τους πρότυπα. Στον πίνακα 10 αναγράφονται τα κριτήρια αξιολόγησης της PFGE κατά τον Tenover.

Κατηγορία Στελεχών	Αριθμός διαφορετικών ζωνών ηλεκτροφορητικών ταινιών	Επιδημιολογική ερμηνεία
Αδιαφοροποίητα	0	Επιδημικός κλώνος
Στενή συγγένεια	2-3	Στελέχη που πιθανόν σχετίζονται επιδημιολογικά με τον επιδημικό κλώνο
Πιθανή συγγένεια	4-6	Στελέχη που είναι δυνατόν να σχετίζονται επιδημιολογικά με τον επιδημικό κλώνο
Διαφορετικά	>6	Στελέχη που δεν σχετίζονται επιδημιολογικά με τον επιδημικό κλώνο

Πίνακας 10. Κριτήρια αξιολόγησης της PFGE κατά Tenover\

## 6 Αποτελέσματα

### 6.1 Προέλευση και είδος των δειγμάτων

Κατά το χρονικό διάστημα Ιανουάριος 2007 έως Δεκέμβριος 2008 απομονώθηκαν 25 ανθεκτικά στη λινεζολίδη (Linezolid Resistant, LZR) κλινικά στελέχη εντεροκόκκων από 19 ασθενείς του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

Από τα στελέχη αυτά 19 (76%) ανήκαν στο είδος *E. faecium* και 6 (24%) στο είδος *E. faecalis*. Δεκατρείς ασθενείς απέδωσαν LZR *E. faecium* και πέντε LZR *E. faecalis*. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ένας ασθενής έφερε ένα στέλεχος *E. faecium* και ένα στέλεχος *E. faecalis* ταυτόχρονα, όπου και τα δύο είχαν αντοχή στη λινεζολίδη. Ένα στέλεχος απομονώθηκε από 15 ασθενείς, 2 στελέχη από 4 ασθενείς και 3 στελέχη από έναν ασθενή. Δεκαεννιά από τα 25 (76%) των στελεχών απομονώθηκαν από την μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ), 2 από την χειρουργική κλινική (8%), 1 από τον καρδιοχειρουργική (4%) και 3 από την παθολογική κλινική (12%). Τα κλινικά δείγματα, από τα οποία απομονώθηκαν τα LZR στελέχη, ήταν: 8 αίμα (32%), 11 κόπρανα (44%), 2 πύο (8%), 1 ενδοαγγειακός καθετήρας (4%), 1 χειρουργικός ιστός (4%), 1 ούρα (4%) και 1 τραύμα (4%).

Κατά το χρονικό διάστημα Νοέμβριος 2008 έως Απρίλιος 2010 απομονώθηκαν 72 ανθεκτικά στη λινεζολίδη (Linezolid Resistant, LZR) κλινικά στελέχη coagulase – αρνητικών σταφυλοκόκκων από 41 ασθενείς του Τζάνειου Γενικού Νοσοκομείου Πειραιά.

Από τα στελέχη αυτά 55 (76.4%) ανήκαν στο είδος *S. epidermidis*, 8 (11.1%) στο είδος *S. capitis*, 4 (5.6%) στο είδος *S. hominis*, 3 (4.2%) στο είδος *S. lentus* και τέλος 2 (2.8%) στο είδος *S. warneri*. Όλα τα στελέχη (100%) απομονώθηκαν από ασθενείς που νοσηλεύονταν στην μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ). Τα κλινικά δείγματα, από τα οποία απομονώθηκαν τα LZR στελέχη, ήταν: αίμα 63 (87.5%), κεντρική φλεβική γραμμή 7 (9.7%) και πλευριτικό υγρό 2 (2.8%). Από τον συνολικό αριθμό των 72 στελεχών σταφυλοκόκκων περαιτέρω εξετάστηκαν τα 30.

Περιοχή απομόνωσης	Στελέχη n (%)
Αίμα	8 (32)
Κόπρανα	11 (44)
Πύο	2 (8)
Ενδοαγγειακός Καθετήρας	1 (4)
Χειρουργικός Ιστός	1 (4)
Ούρα	1 (4)
Τραύμα	1 (4)

Πίνακας 11. Περιοχή (site) απομόνωσης εντεροκόκκων

Είδος	n (%)
<i>E. faecium</i>	19 (76)
<i>E. faecalis</i>	6 (24)

Πίνακας 12. Διάταξη ειδών εντεροκόκκου

Περιοχή απομόνωσης	n (%)
Αίμα	63 (87.5)
Κεντρική Φλεβική Γραμμή	7 (9.7)
Πλευριτικό Υγρό	2 (2.8)

Πίνακας 13. Περιοχή (site) απομόνωσης σταφυλοκόκκων

Είδος	n (%)
<i>S. epidermidis</i>	55 (76.4)
<i>S. capitis</i>	8 (11.1)
<i>S. hominis</i>	4 (5.6)
<i>S. lentus</i>	3 (4.2)
<i>S. warneri</i>	2 (2.8)

Πίνακας 14. Διάταξη ειδών σταφυλόκοκκου

## 6.2 Αποτελέσματα προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (MIC) στη λινεζολίδα, βανκομυκίνη και τεϊκοπλανίνη με τη μέθοδο του E-test

Η εφαρμογή των ταινιών E-test που χρησιμοποιήσαμε προσδιορίζει την MIC μέχρι και την συγκέντρωση 256 µg/ml για τη λινεζολίδα, τη βανκομυκίνη και την τεϊκοπλανίνη. Για τους εντεροκόκκους προσδιορίσαμε με την ίδια μέθοδο και την MIC στην κουϊνουπριστίνη/νταλφοπριστίνη (Quinipristin/dalfopristin, QDA). Το E-test της κουϊνουπριστίνης/νταλφοπριστίνης ανέρχεται μέχρι και την συγκέντρωση 256 µg/ml. Τα αποτελέσματα παρατίθενται συγκεντρωτικά στους ακόλουθους πίνακες. Στον πίνακα 15 παρατίθενται τα αποτελέσματα προσδιορισμού των MIC των σταφυλοκόκκων με E-test για την λινεζολίδα, τη βανκομυκίνη και την τεϊκοπλανίνη. Στον πίνακα 16 παρατίθενται τα αποτελέσματα προσδιορισμού των MIC των εντεροκόκκων με E-test για την λινεζολίδα, τη βανκομυκίνη, την τεϊκοπλανίνη και την κουϊνουπριστίνη/νταλφοπριστίνη.

<b>α/α στελέχους σταφυλοκόκκου</b>	<b>Λινεζολίδα MIC (μg/ml)</b>	<b>Βανκομυκίνη MIC (μg/ml)</b>	<b>Τεϊκοπλανίνη MIC (μg/ml)</b>
<b>A2548</b>	>256	3	8
<b>A2490</b>	32	1	1.5
<b>A2453</b>	4	2	6
<b>A2519</b>	>256	2	8
<b>A2561 (1)</b>	>256	1.5	12
<b>A2561 (2)</b>	>256	2	8
<b>A2562 (1)</b>	>256	2	8
<b>A2562 (2)</b>	>256	2	8
<b>A2570</b>	32	2	8
<b>A2549</b>	>256	3	12
<b>E371</b>	>256	2	8
<b>A2544</b>	>256	2	6
<b>A2545</b>	>256	2	6
<b>A41</b>	>256	1.5	8
<b>A55</b>	>256	3	8
<b>A2864</b>	>256	2	8
<b>217</b>	>256	1	3
<b>6119</b>	>256	1	4
<b>651</b>	>256	0.5	4
<b>605-2</b>	>256	0.75	4
<b>A1521</b>	>256	1	3
<b>A1702</b>	32	1	16
<b>Y209</b>	>256	1	6
<b>158</b>	48	0.75	0.5
<b>560</b>	>256	1.5	2
<b>71</b>	32	1	0.75
<b>65</b>	>256	1.5	8
<b>200</b>	>256	1	4
<b>160-2</b>	8	0.75	0.5
<b>A1929</b>	>256	1	8

Πίνακας 15. Προσδιορισμός των MIC των σταφυλοκόκκων με E-test για τη λινεζολίδα, τη βανκομυκίνη και την τεϊκοπλανίνη

α/α στελέχους εντεροκόκκου	Λινεζολίδη MIC (μg/ml)	Βανκομυκίνη MIC (μg/ml)	Τεϊκοπλανίνη MIC (μg/ml)	Κουϊνουπριστίνη/νταλφοπριστίνη MIC (μg/ml)
2531	32	>256	16	2
3677	32	>256	16	1
4855	16	>256	32	1.5
7006	16	>256	16	1.5
7239	32	1.5	1	2
8463	12	1	0.75	1
8630	8	1	0.75	1
6907	4	>256	16	12
8987	64	>256	24	1.5
2813	24	0.75	0.38	1
5777	48	8	1	4
6532	16	>256	16	1.5
599	32	>256	24	3
6528	4	1.5	0.25	>32
154	32	1	1	1.5
585	48	1	1	2
579	64	>256	24	1.5
3942	24	2	1	1.5
4816	32	4	0.75	2
3160	128	>256	>256	>32
9753	24	1	0.38	>32
8834	64	>256	12	>32
2595	24	1.5	0.25	32
8364	16	>256	24	>32
6830	24	>256	48	32

Πίνακας 16. Προσδιορισμός των MIC των εντεροκόκκων με E-test για τη λινεζολίδη, τη βανκομυκίνη, την τεϊκοπλανίνη και την κουϊνουπριστίνη/νταλφοπριστίνη.

### 6.3 Αποτελέσματα προσδιορισμού της MIC στη λινεζολίδη με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων

Ο προσδιορισμός της MIC στη λινεζολίδη έγινε σε όλα τα στελέχη των εντεροκόκκων και των σταφυλοκόκκων ούτως ώστε να εξεταστεί η ακεραιότητα των αποτελεσμάτων του E-test αλλά και του Vitek, όπως επίσης να προσδιοριστεί το ύψος της MIC που στα περισσότερα στελέχη ξεπερνάει το όριο των 256 μg/ml του E-test.



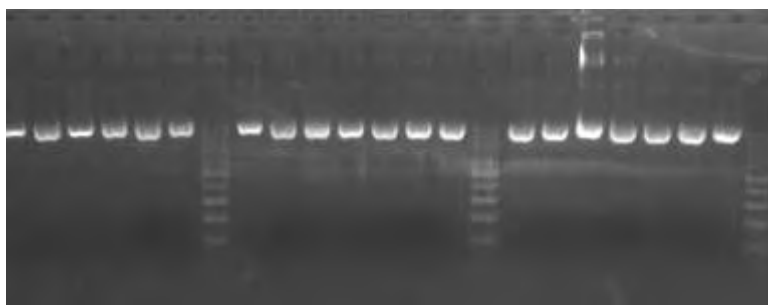
Τα αποτελέσματα αλληλεπικαλύπτονταν με ελάχιστες διαφορές έως μία τάξη μεγέθους (η οποία μπορεί να έγκειται στην απόδοση της μεθόδου). Στον πίνακα 17 εμφανίζονται τα αποτελέσματα προσδιορισμού της MIC στη λινεζολίδη με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων για τα στελέχη σταφυλοκόκκου.

<b>α/α στελέχους σταφυλοκόκκου</b>	<b>Λινεζολίδη MIC (μg/ml)</b>	<b>α/α στελέχους σταφυλοκόκκου</b>	<b>Λινεζολίδη MIC (μg/ml)</b>
<b>A2548</b>	>512	<b>A2864</b>	>512
<b>A2490</b>	32	<b>217</b>	>512
<b>A2453</b>	32	<b>6119</b>	>512
<b>A2519</b>	>512	<b>651</b>	>512
<b>A2561 (1)</b>	>512	<b>605-2</b>	>512
<b>A2561 (2)</b>	>512	<b>A1521</b>	>512
<b>A2562 (1)</b>	>512	<b>A1702</b>	64
<b>A2562 (2)</b>	>512	<b>Y209</b>	>512
<b>A2570</b>	64	<b>158</b>	64
<b>A2549</b>	>512	<b>560</b>	>512
<b>E371</b>	>512	<b>71</b>	64
<b>A2544</b>	>512	<b>65</b>	>512
<b>A2545</b>	>512	<b>200</b>	512
<b>A41</b>	>512	<b>160-2</b>	64
<b>A55</b>	>512	<b>A1929</b>	>512

Πίνακας 17. Προσδιορισμός της MIC στη λινεζολίδη με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων για τα στελέχη σταφυλοκόκκου.

#### **6.4 Ανίχνευση του 16S rRNA με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)**

Η ανίχνευση του 16S rRNA που έγινε σε όλα τα στελέχη των σταφυλοκόκκων για την ακριβή τυποποίηση του είδους σταφυλοκόκκου επιβεβαίωσε την τυποποίηση που έγινε με τον έλεγχο καλλιεργητικών και βιοχημικών ιδιοτήτων. Στην εικόνα 7 φαίνεται η ανίχνευση του γονιδίου 16S rRNA σε 30 στελέχη της μελέτης.



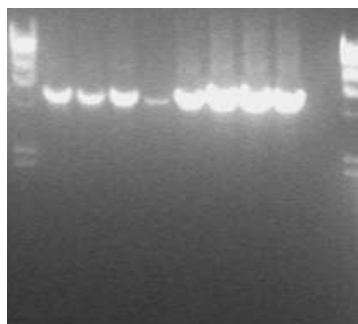
Εικόνα 7. PCR του 16S rRNA γονιδίου

Είδος	n (%)
<i>S. epidermidis</i>	55 (76.4)
<i>S. capitis</i>	8 (11.1)
<i>S. hominis</i>	4 (5.6)
<i>S. lentus</i>	3 (4.2)
<i>S. warneri</i>	2 (2.8)

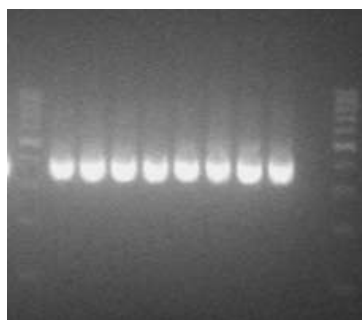
Πίνακας 18. Διάταξη του είδους των σταφυλοκόκκων μετά από ενίσχυση με PCR και αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA.

### 6.5 Ενίσχυση του 23S rRNA των σταφυλοκόκκων

Η ενίσχυση των 6 αντιγράφων του γονιδίου 23S rRNA έγινε σε 30 από τα 72 στελέχη των σταφυλοκόκκων. Τα προϊόντα ενίσχυσης με τα 6 ζεύγη εκκινητών (όπου αντιστοιχεί ένα ζεύγος εκκινητών για κάθε αντίγραφο του γονιδίου), κατόπιν ενισχύθηκαν εσωτερικά περαιτέρω με ένα άλλο ζεύγος εκκινητών που είχε ως αποτέλεσμα ένα τμήμα μεγέθους 419 bp. Στην εικόνα 8 φαίνεται ενδεικτικά η ενίσχυση του πρώτου αντιγράφου του γονιδίου 23S rRNA και στην εικόνα 9 η ενίσχυση του εσωτερικού τμήματος του αντιγράφου αυτού.



Εικόνα 8. Ενδεικτικά αποτελέσματα ενίσχυσης με PCR του πρώτου αντιγράφου του 23S rRNA των σταφυλοκόκκων



Εικόνα 9. Ενδεικτικά αποτελέσματα ενίσχυσης με PCR του εσωτερικού τμήματος του πρώτου αντιγράφου του 23S rRNA των σταφυλοκόκκων

## 6.6 Προσδιορισμός αλληλουχίας βάσεων (DNA sequencing) των αντιγράφων του γονιδίου 23S rRNA των σταφυλοκόκκων

Τα PCR προϊόντα των στελεχών αναλύθηκαν με τη μέθοδο αλληλούχισης του γενετικού υλικού (DNA sequencing), για την ανίχνευση πιθανών μεταλλάξεων που αλλάζουν την τριτοταγή δομή του 23S rRNA με αποτέλεσμα να επηρεάζουν την πρόσδεση της λινεζολίδης και την επακόλουθη λειτουργία της. Οι αλληλουχίες βάσεων που ανευρέθηκαν στα υπό εξέταση στελέχη συγκρίθηκαν με την αλληλουχία *Staphylococcus epidermidis* strain 82-1682A (Accession number: gb|AY204541.1) που ελήφθησε από την Τράπεζα Γονιδιακών πληροφοριών (GenBank), ώστε να προσδιοριστούν οι ακριβείς θέσεις των μεταλλάξεων.

Η σύγκριση των αλληλουχιών των υπό εξέταση στελεχών με την αλληλουχία αυτή έδωσε ποικίλες μεταλλάξεις. Εικοσι-τρία από τα τριάντα στελέχη φέρανε τις μεταλλάξεις T2504A και C2534T. Τρία φέρανε τις μεταλλάξεις G2576T και C2534T και ένα στέλεχος την μετάλλαξη G2576T μαζί με της νέες μεταλλάξεις C2356T ή T2334C (σε διαφορετικά αντίγραφα έκαστη). Τα 3 *S. capitis* στελέχη φέρανε τη νέα μετάλλαξη T2319C μαζί με την γνωστή βιβλιογραφικά G2576T. Τέλος, όλα τα στελέχη είχαν μεταλλαγμένα 3 έως 5 αντίγραφα του γονιδίου 23S rRNA. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 19. Στον πίνακα 20 παραθέτουμε ένα παράδειγμα στοίχισης μιας αλληλουχίας ενός αντιγράφου του 23S rRNA ενός στελέχους σταφυλοκόκκου με την αλληλουχία *Staphylococcus epidermidis* strain 82-1682A (Accession number: [gb|AY204541.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucl/AY204541.1)) που ελήφθησε από την Τράπεζα Γονιδιακών πληροφοριών (GenBank).

<b>a/a</b>	<b>rrlA</b>	<b>rrlB</b>	<b>rrlC</b>	<b>rrlD</b>	<b>rrlE</b>	<b>rrlF</b>
A2548	T2504A C2534T	No	C2534T T2504A	T2504A	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A2490	C2356T G2576T	T2334C G2576T	Όχι	C2356T G2576T	C2356T G2576T	C2356T G2576T
A2453	Όχι	Όχι	G2576T	C2534T G2576T	C2534T G2576T	C2534T G2576T
A2519	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A2561(1)	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A2561(2)	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A2562(1)	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A2562(2)	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A2570	Όχι	Όχι	Όχι	C2534T G2576T	C2534T G2576T	C2534T G2576T
A2549	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
E371	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A2544	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A2545	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A41	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	C2534T G2576T	T2504A C2534T
A55	T2504A C2534T	Όχι	T2504A	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A2864	T2504A C2534T	Όχι	T2504A	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
217	C2534T	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A	T2504A C2534T
6119	T2504A	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
651	T2504A C2534T	Όχι	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
605-2	T2504A	Όχι	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A1521	T2504A C2534T	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A1702	G2576T	G2576T	G2576T	C2534T G2576T	G2576T	C2534T G2576T
Y209	T2504A C2534T	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
158	T2319C G2576T	T2319C G2576T	T2319C G2576T	T2319C G2576T	T2319C G2576T	T2319C G2576T
560	T2504A C2534T	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
71	T2319C G2576T	T2319C G2576T	T2319C G2576T	T2319C G2576T	T2319C G2576T	T2319C G2576T
65	T2504A C2534T	T2504A	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
200	T2504A C2534T	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
160-2	T2319C C2354T	T2319C G2576T	T2319C G2576T	T2319C G2576T	T2319C G2576T	T2319C G2576T
A1929	T2504A C2534T	T2504A	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T

Πίνακας 19. Μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στα αντίγραφα του γονιδίου 23S rRNA με την μέθοδο του προσδιορισμού αλληλουχίας βάσεων στα στελέχη των σταφυλοκόκκων .

[gb|AY204541.1|](#) Staphylococcus epidermidis strain 82-1682A 23S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=784

```

Score = 715 bits (387), Expect = 0.0
Identities = 391/393 (99%), Gaps = 0/393 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1 GGCGCTCAAAGGTTCCCTCAGAATGGTTGGAAATCATTCATAGAGTGTAAGGCATAAGG 60
      |||
Sbjct 301 GGCGCTCAAAGGTTCCCTCAGAATGGTTGGAAATCATTCATAGAGTGTAAGGCATAAGG 360

Query 61 GAGCTTGACTGCGAGACCTACAAGTCGAGCAGGGTCGAAAGACGGACTTAGTGATCCGGT 120
      |||
Sbjct 361 GAGCTTGACTGCGAGACCTACAAGTCGAGCAGGGTCGAAAGACGGACTTAGTGATCCGGT 420

Query 121 GGTTCCGCATGGAAGGGCCATCGCTCAACGGGATAAAAGCTACCCGGGGATAACAGGCTT 180
      |||
Sbjct 421 GGTTCCGCATGGAAGGGCCATCGCTCAACGGGATAAAAGCTACCCGGGGATAACAGGCTT 480

Query 181 ATCTCCCCCAAGAGTTTACATCGACGGGGAGGTTTGGCACCTCGAAGTTCGGGTCATCGCA 240
      |||
Sbjct 481 ATCTCCCCCAAGAGTTTACATCGACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTTCGGGTCATCGCA 540

Query 241 TCCTGGGGCTGTAGTTGGTCCCAAGGGTTGGGCTGTTTCGCCCATTAAGCGGTACGCGAG 300
      |||
Sbjct 541 TCCTGGGGCTGTAGTTCGGTCCCAAGGGTTGGGCTGTTTCGCCCATTAAGCGGTACGCGAG 600

Query 301 CTGGGTTTCAGAACGTCGTGAGACAGTTTCGGTCCCTATCCGTCGTGGGCGTAGGAAATTG 360
      |||
Sbjct 601 CTGGGTTTCAGAACGTCGTGAGACAGTTTCGGTCCCTATCCGTCGTGGGCGTAGGAAATTG 660

Query 361 AGAGGAGCTGTCCTTAGTACGAGAGGACCGGGA 393
      |||
Sbjct 661 AGAGGAGCTGTCCTTAGTACGAGAGGACCGGGA 693

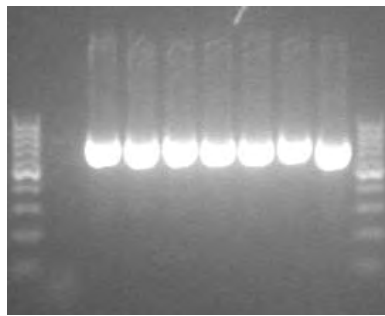
```

Πίνακας 20. Παράθεση παραδείγματος σύγκρισης αλληλουχίας ενός στελέχους σταφυλοκόκκου με αλληλουχία κατατεθειμένη στην GenBank.

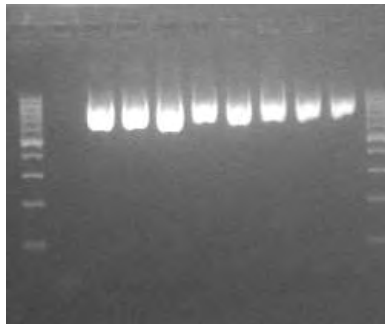
## 6.7 Ενίσχυση του 23S rRNA των εντεροκόκκων

Τα PCR προϊόντα των στελεχών αναλύθηκαν με τη μέθοδο αλληλούχισης του γενετικού υλικού (DNA sequencing), για την ανίχνευση πιθανών μεταλλάξεων που αλλάζουν την τριτοταγή δομή του 23S rRNA με αποτέλεσμα να επηρεάζουν την πρόσδεση της λινεζολίδης και την επακόλουθη λειτουργία της. Οι αλληλουχίες βάσεων που ανευρέθηκαν στα υπό εξέταση στελέχη συγκρίθηκαν με τις αλληλουχίες *Enterococcus faecium* strain ATCC 27273 (Accession number: [gi|183673673|gb|EU547788.1|](#)) και *Enterococcus faecalis* strain IJ-12 (Accession number: [gi|183673632|gb|EU547785.1|](#)) που ελήφθησαν από την Τράπεζα Γονιδιακών πληροφοριών (GenBank), ώστε να προσδιοριστούν οι ακριβείς θέσεις των μεταλλάξεων.

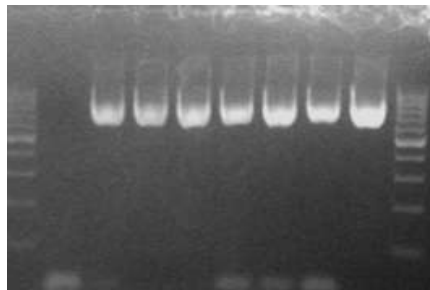
Σε κάθε στέλεχος εφαρμόστηκαν 4 διαφορετικές αντιδράσεις PCR για την μοριακή ενίσχυση ολόκληρου του γονιδίου 23S rRNA που κωδικοποιεί για την μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος (Εικόνες 10-13).



Εικόνα 10. Ενδεικτικά αποτελέσματα ενίσχυσης με PCR του τμήματος που αντιστοιχεί στις βάσεις 12-731 της περιοχής V του 23S rRNA των εντεροκόκκων



Εικόνα 11. Ενδεικτικά αποτελέσματα ενίσχυσης με PCR του τμήματος που αντιστοιχεί στις βάσεις 597-1486 της περιοχής V του 23S rRNA των εντεροκόκκων



Εικόνα 12. Ενδεικτικά αποτελέσματα ενίσχυσης με PCR του τμήματος που αντιστοιχεί στις βάσεις 1319-2140 της περιοχής V του 23S rRNA των εντεροκόκκων



Query	181	CGTTATGGCCACTCTAACCCGCACCACTAATCGTGGTGGGAGACAGTGTCTAGATGGGCAG	240
Sbjct	2183	CGTTATGGCCACTCTAACCCGCACCACTAATCGTGGTGGGAGACAGTGTCTAGATGGGCAG	2242
Query	241	TTTGACTGGGG-CGGTCGCCTCCTAAAAGGTAACGGAGGCGCCAAAGGTTCCCTCAGAA	299
Sbjct	2243	TTTGACTGGGGCGGTTCGCCTCCTAAAAGGTAACGGAGGCGCCAAAGGTTCCCTCAGAA	2302
Query	300	TGGTTGGAAATCATTCGAAGAGTGTAAGGCAGAAGGGAGCTTGAAGTGCAGACCAACAA	359
Sbjct	2303	TGGTTGGAAATCATTCGAAGAGTGTAAGGCAGAAGGGAGCTTGAAGTGCAGACCAACAA	2362
Query	360	GTCGAGCAGGGACGAAAGTCGGGCTTAGTGATCCGGTGGTTCCGCATGGAAGGGCCATCG	419
Sbjct	2363	GTCGAGCAGGGACGAAAGTCGGGCTTAGTGATCCGGTGGTTCCGCATGGAAGGGCCATCG	2422
Query	420	CTCAACGGATAAAAGCTACCTGGGGATAACAGGCTTATCTCCCCAAGAGTCCACATCG	479
Sbjct	2423	CTCAACGGATAAAAGCTACCTGGGGATAACAGGCTTATCTCCCCAAGAGTCCACATCG	2482
Query	480	ACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCGTCGCATCCTGGGGCTGTAGTCGGTCCCA	539
Sbjct	2483	ACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCGTCGCATCCTGGGGCTGTAGTCGGTCCCA	2542
Query	540	AGGGTTGGGCTGTTTCCCCATTAAAGCGGCACGCAGCTGGGTTTCTGCAACGTCGTGAGAC	599
Sbjct	2543	AGGGTTGGGCTGTTTCCCCATTAAAGCGGCACGCAGCTGGGTTTCTGCAACGTCGTGAGAC	2602
Query	600	AGTTCGGTCCCTATCCGTGCGGGCGCTTGGAAATTTGAGAGGAGCTGTCCTTAGTACGAG	659
Sbjct	2603	AGTTCGGTCCCTATCCGTGCGGGCGCTTGGAAATTTGAGAGGAGCTGTCCTTAGTACGAG	2662
Query	660	AGGACCGGGATGGACTTACCGCTGGTGTACCAGTTGTTCTGCCAAGGGCATTGCTGGGTA	719
Sbjct	2663	AGGACCGGGATGGACTTACCGCTGGTGTACCAGTTGTTCTGCCAAGGGCATTGCTGGGTA	2722
Query	720	GCTATGTAGGGAAGGGATAAACGCTGAAAGCATCTAAGTGTGAAGCCACCTCAAGATGA	779
Sbjct	2723	GCTATGTAGGGAAGGGATAAACGCTGAAAGCATCTAAGTGTGAAGCCACCTCAAGATGA	2782
Query	780	GATTTCCCATTTCTTTAAGAAAGTAAGATCCCTGAGAGATGATCAGGTAGATAGGTCAGG	839
Sbjct	2783	GATTTCCCATTTCTTTAAGAAAGTAAGATCCCTGAGAGATGATCAGGTAGATAGGTCAGG	2842
Query	840	AGTGGAAGTACAGTGATGTATGGAGCGGAC	869
Sbjct	2843	AGTGGAAGTACAGTGATGTATGGAGCGGAC	2872

Πίνακας 21. Παράθεση παραδείγματος σύγκρισης αλληλουχίας ενός στελέχους *Enterococcus faecium* με αλληλουχία κατατεθειμένη στην GenBank.



>[gi|183673632|gb|EU547785.1|](#) Enterococcus faecalis strain IJ-12 23S ribosomal RNA gene,  
partial  
sequence  
Length=2901

Score = 1458 bits (1616), Expect = 0.0  
Identities = 851/879 (96%), Gaps = 1/879 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query   1      GANTCGGTGNAATTTTAGTACCTGTGAAGATGCAGGTTACCCGCGACAGGCACGGAAAGA   60
      || ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
Sbjct  2013  GACTCGGTGAAATTTTAGTACCTGTGAAGATGCAGGTTACCCGCGACAGG-ACGGAAAGA   2071

Query   61      CCCCATGGAGCTTTACTGTAGTTTGATATTGAGTGTCTGTACCGCATGTACAGGATAGGT   120
      ||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| |||||||||||
Sbjct  2072  CCCCATGGAGCTTTACTGTAGTTTGATATTGAGTGTCTGTACCATGTACAGGATAGGT   2131

Query   121     AGGAGCCGTAGAAATCGGAACGCTAGTTTCGATGGAGGCGCTGGTGGGATACTACCCCTG   180
      ||||| || | ||||||||||||||| ||||||||||||||| ||
Sbjct  2132  AGGAGCCGATGAGACCGGAACGCTAGTTTCGGAGGAGGCGCTGGTGGGATACTACCCCTG   2191

Query   181     CGTTATGGCCACTCTAACCCGCACCACTAATCGTGGTGGGAGACAGTGTGAGATGGGCAG   240
      ||||| | |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2192  TGTTATGAACCCTCTAACCCGCACCACTAATCGTGGTGGGAGACAGTGTGAGATGGGCAG   2251

Query   241     TTTGACTGGGGCGGTCGCCTCCTAAAAGGTAACGGAGGCGCCAAAGGTTCCCTCAGAAT   300
      |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2252  TTTGACTGGGGCGGTCGCCTCCTAAAAGGTAACGGAGGCGCCAAAGGTTCCCTCAGAAT   2311

Query   301     GGTGAGAAATCATTTCGAAGAGTGTAAGGCAGAAAGGAGCTTGACTGCGAGACCAACAAG   360
      |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2312  GGTGAGAAATCATTTCGAAGAGTGTAAGGCAGAAAGGAGCTTGACTGCGAGACCTACAAG   2371

Query   361     TCGAGCAGGGACGAAAGTCGGGCTTAGTGATCCGGTGGTTCCGCATGGAAGGCCATCGC   420
      |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2372  TCGAGCAGGGACGAAAGTCGGGCTTAGTGATCCGGTGGTTCCGCATGGAAGGCCATCGC   2431

Query   421     TCAACGATAAAAGCTACCTGGGGATAACAGGCTTATCTCCCCAAGAGTCCACATCGA   480
      |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2432  TCAACGATAAAAGCTACCTGGGGATAACAGGCTTATCTCCCCAAGAGTCCACATCGA   2491

Query   481     CGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCGTCGCATCCTGGGGCTGTAGTCGGTCCCAA   540
      |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2492  CGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCGTCGCATCCTGGGGCTGTAGTCGGTCCCAA   2551

Query   541     GGGTTGGGCTGTTGCGCCATTAAAGCGGCACGCTAGCTGGGTTCAGAACGTCGTGAGACA   600
      ||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||
Sbjct  2552  GGGTTGGGCTGTTGCGCCATTAAAGCGGCACGCGAGCTGGGTTCAGAACGTCGTGAGACA   2611

Query   601     GTTCGGTCCCTATCCGTCGCGGGCGTTGGAATTTGAGAGGAGCTGTCCTTAGTACGAGA   660

```

```

|||||
Sbjct 2612 GTTCGGTCCCTATCCGTCGCGGGCGTTGGAAATTTGAGAGGAGCTGTCCTTAGTACGAGA 2671

Query 661 GGACCGGGATGGACTTACCGCTGGTGTACCAAGGGCATTGCTGGGTAG 720
|||||
Sbjct 2672 GGACCGGGATGGACTTACCGCTGGTGTACCAAGGGCATTGCTGGGTAG 2731

Query 721 CTATGTAGGGAAGGGATAAACGCTGAAAGCATCTAAGTGTGAAGCCCACCTCAAGATGAG 780
|||||
Sbjct 2732 CTATGTAGGGAAGGGATAAACGCTGAAAGCATCTAAGTGTGAAGCCCACCTCAAGATGAG 2791

Query 781 ATTTCCCATTTCTTTAAGAAAGTAAGATCCCTGAGAGATGATCAGGTAGATAGGTGAGGA 840
|||||
Sbjct 2792 ATTTCCCATTTCTTTAAGAAAGTAAGATCCCTGAGAGATGATCAGGTAGATAGGTGAGGA 2851

Query 841 GTGGAAGTACAGTGATGTATGGAGCGGACCAATACTAAT 879
|||||
Sbjct 2852 GTGGAAGGCTAGTGATAGTTGGAGCGGACCAATACTAAT 2890

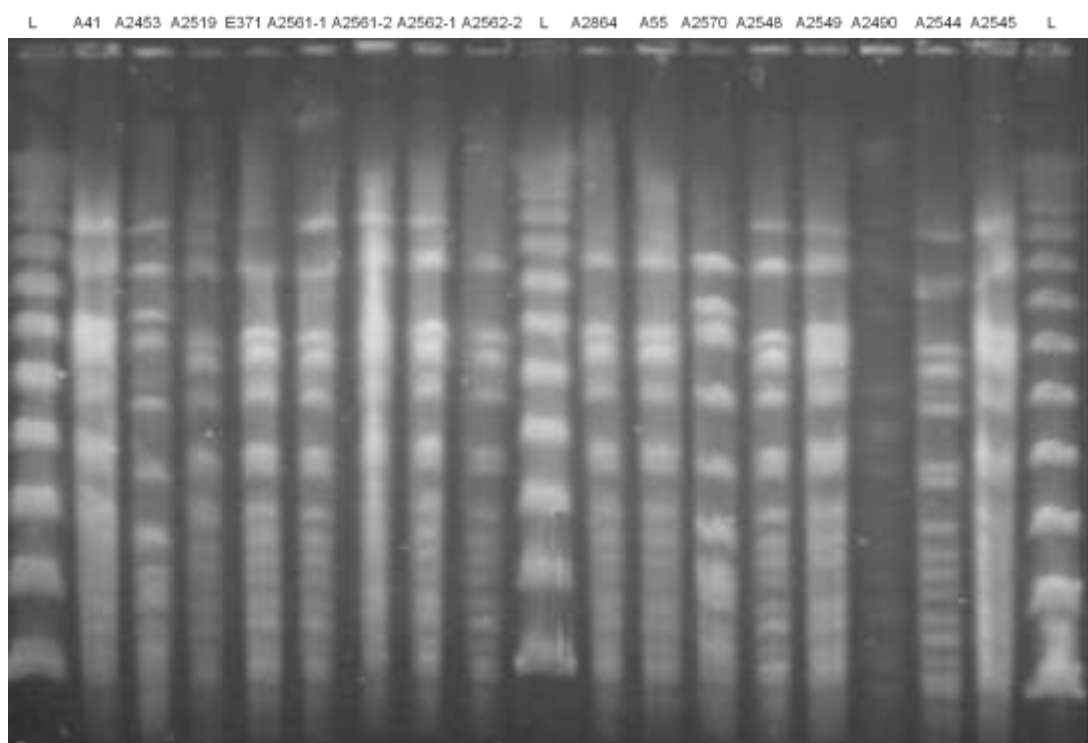
```

Πίνακας 22. Παράθεση παραδείγματος σύγκρισης αλληλουχίας ενός στελέχους *Enterococcus faecalis* με αλληλουχία κατατεθειμένη στην GenBank.

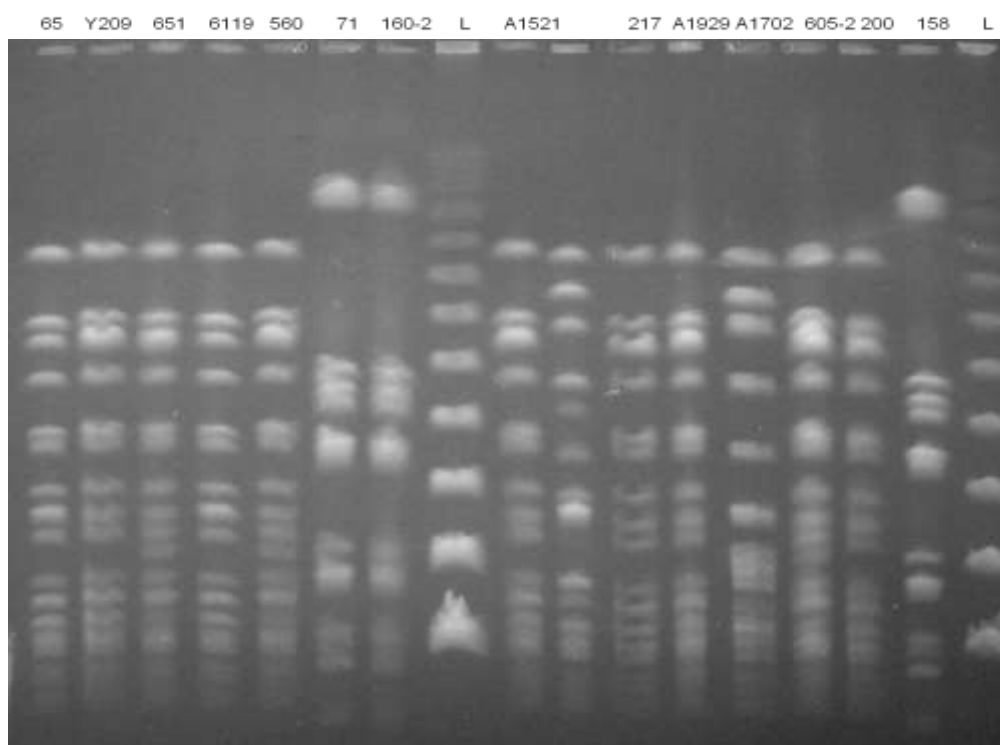
## 6.8 Μελέτη της γενετικής συσχέτισης των στελεχών σταφυλοκόκκου και εντεροκόκκου ανθεκτικών στη λινεζολίδα με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE)

Στα πλαίσια του ελέγχου της μοριακής επιδημιολογικής συσχέτισης των ανθεκτικών στη λινεζολίδα στελεχών σταφυλοκόκκων και εντεροκόκκων, έγινε ανάλυση του γενωμικού τους DNA με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Αρχικά έγινε PFGE στα στελέχη *Enterococcus faecium*, κατόπιν στα στελέχη *Enterococcus faecalis* και τέλος στα στελέχη *Staphylococcus epidermidis* και *Staphylococcus capitis*. Τα γενετικά αποτυπώματα που προέκυψαν μετά την ηλεκτροφόρηση του γενωμικού DNA μετά από τεμαχισμό με περιοριστικό ένζυμο αναλύθηκαν δια γυμνού οφθαλμού.

Τα αποτελέσματα των σταφυλοκόκκων ήταν: εικοστρείς από τους 27 *S. epidermidis* ήταν κλωνικά σχετιζόμενοι ενώ τέσσερα *S. epidermidis* στελέχη ήταν κλωνικά μοναδικά. Τα 3 στελέχη *S. capitis* ήταν γενετικά πανομοιότυπα. Στις εικόνες 14 και 15 εμφανίζονται τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο των 27 στελεχών *S. epidermidis* και των 3 στελεχών *S. capitis*.



Εικόνα 14. Ηλεκτροφορητικά πρότυπα στελεχών *S. epidermidis* και *S. capitis*



Εικόνα 15. Ηλεκτροφορητικά πρότυπα στελεχών *S. epidermidis* και *S. capitis*. L = Ladder

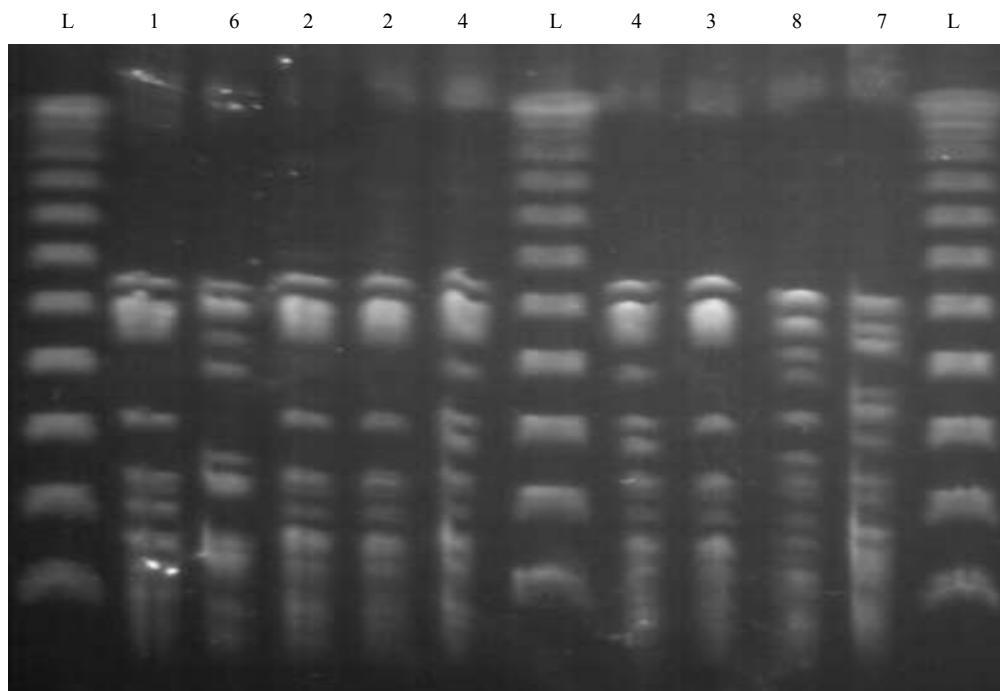
Τα αποτελέσματα των εντεροκόκκων ήταν: τα 19 στελέχη *E. faecium* ανήκουν σε επτά διαφορετικούς κλώνους, ενώ τα 6 στελέχη *E. faecalis* ανήκουν σε 4 διαφορετικούς κλώνους. Στις εικόνες 16 και 17 εμφανίζονται τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο των στελεχών *E. faecium* και των στελεχών *E. faecalis* αντίστοιχα.

Ασθενής	α/α	Ημερομηνία απομόνωσης	Κλινική	Κλινικό δείγμα	LZD Etest MIC (μg/ml)	PFGE τύπος
1	2531	18/1/07	ICU	Blood	32	Ia
2	3677	28/1/07	ICU	Blood	32	Ia
	4855	07/2/07		Pus	16	Ia
3	7006	27/2/07	ICU	Feces	16	Ia
4	7239	28/2/07	ICU 2	Blood	32	Ib
	8463	11/3/07		Blood	12	Ib
	8630	13/3/07		Pus	8	Ib
5	6907	7/5/07	ICU	Blood	4	II
6	8987	04/12/07	ICU	Feces	64	III
7	2813	8/1/08	Cardio-surgical	Katheter	24	IV
8	5777	1/2/08	ICU	Feces	48	V
9	6532	5/5/08	ICU	Feces	16	II
	599	9/6/08	Surgical	Trauma	32	II
10	6528	7/5/08	ICU	Feces	4	II
11	154	30/8/08	ICU	Blood	32	VIa
	585	1/9/08		Feces	48	VIa
12	579	1/9/08	ICU	Feces	64	VII
13	3942	19/12/08	Medicine	Urine	24	VIb
14	4816	29/12/08	Medicine	Blood	32	VIb

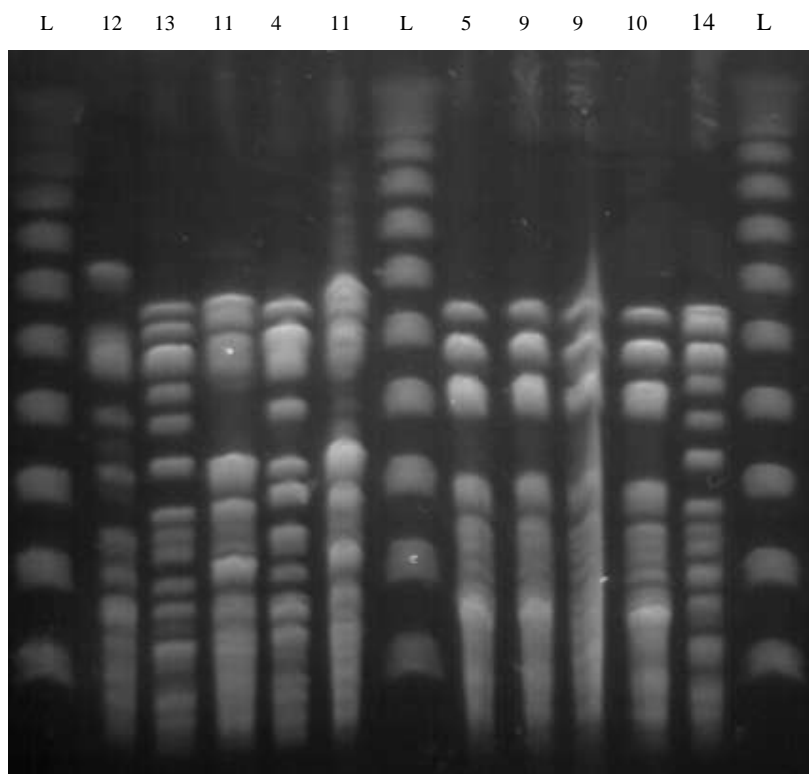
Πίνακας 20. PFGE αποτυπώματα στελεχών *E. faecium*

Ασθενής	α/α	Ημερομηνία απομόνωσης	Κλινική	Κλινικό δείγμα	LZD MIC (μg/ml)	PFGE τύπος
15	3160	24/04/07	Surgical	Surgical Tissue	128	3
6	9753	10/12/07	ICU	Blood	24	2b
16	8834	26/05/08	ICU	Feces	64	2a
17	2595	24/06/08	ICU	Feces	24	2a
18	8364	08/06/07	Medicine	Feces	16	4
19	6830	22/10/08	ICU	Feces	24	1

Πίνακας 21. PFGE αποτυπώματα στελεχών *E. faecalis*



Εικόνα 16. Ηλεκτροφορητικά πρότυπα στελεχών *E. faecium*. L = ladder, 1-8 = αριθμοί ασθενών



Εικόνα 17. Ηλεκτροφορητικά πρότυπα στελεχών *E. faecalis*. L = ladder, 9-14 = αριθμοί ασθενών

## **7 Συζήτηση-Συμπεράσματα**

Η πρόσφατη προσοχή που έχει εστιαστεί στους εντεροκόκκους πιθανολογείται ότι θα συνεχίσει στα επόμενα χρόνια. Η ικανότητα των εντεροκόκκων να αποικίζουν τα γαστρεντερικό σωλήνα, μαζί με τα πολλά και ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά ανθεκτικότητας που έχουν αποκτήσει, σημαίνει ότι αυτοί οι μικροοργανισμοί, που συνήθως φαίνονται να έχουν χαμηλή παθογονικότητα, αποκτούν σταδιακά μία σημαντική δυνατότητα να γίνονται δευτερογενείς εισβολείς. Μιας και τα νοσοκομειακά στελέχη των εντεροκόκκων έχουν επιδείξει ανθεκτικότητα σε σχεδόν όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες, θα αρχίσει να γίνεται ιδιαιτέρως δύσκολο να αντιμετωπίζονται ολοκληρωτικά και επιτυχώς οι εντεροκοκκικές λοιμώξεις. Αυτό πρόκειται να γίνει σύντομα αληθινό, όταν τα ποικίλα γονίδια αντοχής βρεθούν όλα μαζί σε ένα και μοναδικό στέλεχος, ένα γεγονός που θεωρείται σίγουρο ότι θα συμβεί κάποια στιγμή στο κοντινό μέλλον.<sup>70</sup>

Η μονάδα εντατικής θεραπείας βαρύνεται με μία υψηλή συχνότητα νοσοκομειακών λοιμώξεων που συχνά προκαλούνται από πολυανθεκτικά νοσοκομειακά παθογόνα. Η εκτεταμένη χρήση των ευρέως φάσματος αντιβιοτικών θέτει σε κίνδυνο μία ιδιαιτέρως μεγάλη ομάδα ασθενών. Θεραπεία εμποδίων, τοπικές οδηγίες για την χρήση των αντιβιοτικών, στενή συνεργασία με λοιμωξιολόγους και περιορισμοί με ταυτόχρονη δυνεισδυτική θεραπεία είναι όλες στρατηγικές που μπορούν να βελτιώσουν τον περιορισμό των λοιμώξεων και να μειώσουν την εμφάνιση των νοσοκομειακών λοιμώξεων.<sup>71,72</sup> Οι coagulase-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (coagulase-negative staphylococci, CoNS) αναφέρονται ως ο τρίτος πιο κοινός αιτιολογικός παράγοντας νοσοκομειακών λοιμώξεων και το πιο κοινό αίτιο νοσοκομειακών βακτηριαμιών.<sup>73,74</sup> Αυτά τα είδη έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν στον περιβάλλοντα χώρο μονάδων εντατικής θεραπείας, πάνω σε ιατρικές συσκευές και ιατρικό εξοπλισμό για εβδομάδες έως και μήνες.<sup>75</sup> Λοιμώξεις που προκαλούνται από CoNS σταφυλοκόκκους συνθέτουν ένα σοβαρό πρόβλημα για τους ανοσοκατασταλμένους ασθενείς και είναι πολλές φορές δύσκολο να αντιμετωπιστούν αφού πολλές φορές τα στελέχη είναι πολυανθεκτικά. Σε αναφορές από διάφορα μέρη της Ευρώπης, η αντοχή στην οξακυλλίνη στους CoNS κυμαίνεται

ανάμεσα στο 70% και στο 80%, και παρόμοια υψηλά ποσοστά αντοχής αναφέρονται και στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, τον Καναδά και την Λατινική Αμερική.<sup>16,72,76</sup> Σε αυτό το πλαίσιο, η αντοχή αυτή θα οδηγήσει σε υψηλότερη κατανάλωση ουσιών όπως η βανκομυκίνη και η λινεζολίδα, που αυξάνουν την αντιβιοτική πίεση στην ΜΕΘ, προωθώντας έτσι την ανάπτυξη της αντιβιοτικής αντοχής.

Οι οξαζολιδινόνες θεωρούνται ότι είναι η πρώτη νέα τάξη αντιβιοτικών φαρμάκων που παρουσιάστηκε τις τελευταίες 3 δεκαετίες. Η λινεζολίδα εγκρίθηκε από τον FDA το 2000 για χρήση σε ενήλικες και για παιδιατρική χρήση το 2005.<sup>77</sup> Προγράμματα επιτήρησης της αντοχής στη λινεζολίδα έχουν αναφέρει ότι τα συνολικά ποσοστά αντοχής στη λινεζολίδα ανέρχονται στο 0.4% στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, ενώ τα ποσοστά ανέρχονται μόλις στο 0.1% μεταξύ των gram-θετικών στελεχών σε ιατρικές τοποθεσίες μη αμερικανικές.<sup>78,79</sup>

Η αντοχή στη λινεζολίδα προκύπτει κυρίως από μεταλλάξεις που συμβαίνουν στο ριβοσωμικό RNA (rRNA), όλες εκ των οποίων χαρτογραφούνται κοντά στο PTC. Τοποθετούνται στην περιοχή της κεντρικής θηλιάς της υπομονάδας V του 23S rRNA της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας.<sup>80</sup> Ο κύριος όγκος στελεχών που είναι ανθεκτικά στη λινεζολίδα φέρουν τη μετάλλαξη G2576T στην υπομονάδα V του 23S rRNA.<sup>81</sup> Άλλες μεταλλάξεις, όπως η T2500A, G2447T και T2504A έχουν επίσης αναφερθεί στη βιβλιογραφία.<sup>82</sup> Επιπλέον, τροποποιήσεις σε συντηρημένες περιοχές των ριβοσωμικών πρωτεϊνών L3 και L4 έχουν συσχετιστεί με τα αυξημένα επίπεδα της MIC στη λινεζολίδα.<sup>81,83,84</sup> Το γονίδιο *cfr*, όμως, αποτελεί έναν επιπλέον μηχανισμό που προσδίδει αντοχή στη λινεζολίδα σε στελέχη σταφυλοκόκκων, αν και αρχικά είχε συσχετιστεί μόνο με την αντοχή στη χλωραμφενικόλη.<sup>85</sup> Το γονίδιο *cfr* προκαλεί μετα-μεταφραστική μεθυλίωση στο 23S ριβοσωμικό RNA στη θέση A2503, που επηρεάζει την πρόσδεση των φαρμάκων που ανήκουν σε τουλάχιστον πέντε αντιβιοτικές τάξεις (φενικόλες, λινκοζαμίδες, οξαζολιδινόνες, πλευρομυτοουλίνες και στρεπτογραμμίνη A).<sup>86</sup> Αρχικά είχε εντοπιστεί ανάμεσα σε ζωικά δείγματα από την Ευρώπη,<sup>85</sup> όμως πρόσφατα το γονίδιο *cfr* έχει αναφερθεί ότι εντοπίστηκε και σε ανθρώπινα δείγματα *Staphylococcus spp* από τις ΗΠΑ, την Κολομβία και την Ισπανία.<sup>87,88,89</sup>

Η μελέτη αυτή εξετάζει την αύξηση της αντοχής στη λινεζολίδα, ένα αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται λιγότερο από 10 χρόνια στα ελληνικά νοσοκομεία. Κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν με κλασσικές και μοριακές τεχνικές 25 στελέχη εντεροκόκκων και 72 coagulase-αρνητικά στελέχη

σταφυλοκόκκων ανθεκτικά στη λινεζολίδα. Τα στελέχη των εντεροκόκκων ύστερα από ανάλυση τους σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο αποδείχθηκε ότι δεν είναι κλωνικά σχετιζόμενα αλλά αποτελούν σποραδικά και τυχαία γεγονότα, ενώ 23 από τα 30 στελέχη σταφυλοκόκκων που αναλύθηκαν με την ίδια μέθοδο αποδείχθηκε ότι ανήκουν στον ίδιο επιδημικό κλώνο.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής συνιστούν την πρώτη ευρεία καταγραφή της αντοχής στη λινεζολίδα στελεχών εντεροκόκκου και σταφυλοκόκκου προερχόμενα από δύο διαφορετικά ελληνικά νοσοκομεία. Η κλωνική προέλευση των στελεχών, υποδεικνύει οριζόντια μετάδοση που εγείρει ερωτήματα ως προς την ικανή απολύμανση των ιατρικών εργαλείων και μηχανημάτων αλλά και την επαρκή απομόνωση των ασθενών στις μονάδες εντατικής θεραπείας. Η παρουσία των μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν είναι αυξημένης σημασίας λόγω της επιδημικής διασποράς των στελεχών σταφυλοκόκκων για τους προαναφερθέντες λόγους. Παράλληλα, η σποραδικότητα των στελεχών των εντεροκόκκων είναι ιδιαίτερος σημαντική λόγω του γεγονότος ότι η αντοχή στη λινεζολίδα δεν αποτελεί πλέον ένα τυχαίο και σπάνιο γεγονός που απλά φέρει τη δυνατότητα μεταφοράς από ασθενή σε ασθενή, αλλά η συχνότητα εμφάνισης νέων κλώνων έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια. Καθίσταται, πλέον, αναγκαία η λήψη αυστηρών μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων και η συνεχής επιδημιολογική επαγρύπνηση για την αποφυγή της περαιτέρω διασποράς τέτοιων στελεχών. Ακόμη, η μελέτη περαιτέρω μοριακών μηχανισμών που πιθανόν προσφέρουν επιπλέον αντοχή στη λινεζολίδα οφείλουν να μελετηθούν, έτσι ώστε να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της αντοχής αυτής προτού η λινεζολίδα αποσυρθεί από την κλινική πρακτική.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι ενδεικτικά της ανάγκης για περαιτέρω συνεχή και ενδεδειγμένη επιτήρηση των νοσοκομειακών λοιμώξεων, έτσι ώστε να υπάρχει η δυνατότητα προγραμματισμού προληπτικών και θεραπευτικών πρακτικών με τις οποίες θα επιτυγχάνεται το μέγιστο θεραπευτικό όφελος για τον ασθενή και το μέγιστο οικονομικό όφελος για το νοσοκομείο, δεδομένου ότι η λινεζολίδα αποτελεί ένα από τα πιο ακριβά αντιβιοτικά στην ελληνική αγορά. Τέλος είναι απαραίτητος ο προσεκτικός σχεδιασμός της χορήγησης της λινεζολίδης με σκοπό τη διατήρηση της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου.



## 8 Βιβλιογραφία

1. A. Ogston (1881), Report upon microorganisms in surgical diseases. Br Med J; 1:369-75
2. F. J. Rosenbach (1884), Mikro-organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. Wiesbaden: JF Bergmanns Verlag
3. D. Hart (1937), Operation room infections. Arch Surg (Chicago); 34:874-96
4. I. L. Bennet, P. B. Beeson (1954), Bacteremia: a consideration of some experimental and clinical aspects. Medicine; 26:241-62
5. W. Kloos (1997), Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. New York: Churchill Livingstone; 113-37
6. J. M. Fournier, Capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. In: T Wardström, I. Eliason, I. Holder, A. Ljungh (1990) eds. Pathogenesis of wound and biomaterial-associated infections. London: Springer-Verlag; 533-45
7. W. W. Karakawa (1992), The role of capsular antigens in *Staphylococcus aureus* immunity. Zentralbl Bakteriolo; 277:415
8. B. J. Wilkinson, Biology. In: K. B. Crossley, G. L. Archer (1997) eds. The staphylococci in human disease. New York: Churchill Livingstone; 1-38
9. E. A. E. Mevissen-Verhage, J. H. Marcelis, W. C. M. Harmsen-van Amerongen, N. M. de Vos, J. Berkel, J. Verhoef (1997), Iron affects the intestinal flora. I. Development of the neonatal gut flora during the first week of life. Eur J Clin Microbiol; 4:14-8
10. C. A. Kauffman, S. F. Bradley. Epidemiology of community acquired infection. In: K.B. Crossley, G. L. Archer (1997) eds. The staphylococci in human disease. New York: Churchill Livingstone; 287-308
11. R. J. Hollis, J. L. Barr, B. N. Doebbeling, M. A. Pfaller, R. P Wenzel (1995), Familial carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and subsequent infection in a premature neonate. Clin Infect Dis; 21:328-32
12. H. M. E. Frenay, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, M. J. C. H. Molkenboer, J. Verhoef (1992), Long-term carriage, and transmission of methicillin-

- resistant *Staphylococcus aureus* after discharge from hospital. J Hosp Infect; 22:207-15
13. J. M. Boyce. Epidemiology and prevention of nosocomial infections. In: K. B. Crossley, G. L. Archer (1997) eds. The staphylococci in human disease. New York: Churchill Livingstone; 309-29
  14. J. A. Kluytmans, J. W. Mouton, E. P. IJzerman et al (1995), Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as a major risk factor wound infections after cardiac surgery. J Infect Dis; 171:216-9
  15. J. F. John, T. J. Grieshop, L. M. Atkins, C. G. Platt (1993), Widespread colonization of personnel at a veterans affairs medical center by methicillin-resistant, coagulase-negative staphylococcus. Clin Infect Dis; 17:380-8
  16. D. J. Diekema, M. A. Pfaller, F. J. Schmitz et al (2001), 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; 32(Suppl. 2):S114-32
  17. G. L. Archer, M. W. Climo (1994), Antimicrobial susceptibility of coagulase negative staphylococci. Antimicrob Agents Chemother; 38:2231-7
  18. M. R. Foulque Moreno, P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou, L. De Vuyst, (2006). The role and application of enterococci in food and health. Int J Food Microbiol; 106:1–24.
  19. M. De Fa'tima Silva Lopes, T. Ribeiro, M. Abrantes, J. J. Figueiredo Marques, R. Tenreiro, M. T. B. Crespo, (2005). Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. Int J Food Microbiol; 103:191–198.
  20. Health Protection Agency (2007). Bacteraemia. Available from [www.hpa.org.uk](http://www.hpa.org.uk)
  21. G. M. L. Bearman, R. P. Wenzel (2005). Bacteraemias: a leading cause of death. Arch Med Res; 36:646–659.
  22. National Nosocomial Infections Surveillance (2004). System report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. A report from the NNIS System. Am J Infect Control; 32:470– 485.
  23. Health Protection Agency (2005). Enterococcus spp. and Glycopeptide-Resistant Enterococci (GRE). Available from [www.hpa.org.uk](http://www.hpa.org.uk)

24. G. Klein, A. Pack, C. Bonaparte, G. Reuter (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*; 41:103–125.
25. M. E. Stiles, W. H. Holzapfel (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol*; 36:1–29.
26. G. Klein (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int J Food Microbiol*; 88:123–131.
27. B. Saeedi, A. Hallgren, J. Jonasson, L. Nilsson, H. Hanberger, B. Isaksson (2002). Modified pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of enterococci. *APMIS*; 110:869–874.
28. K. J. Domig, H. K. Mayer, W. Kneifel (2003). Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. *Int J Food Microbiol*; 88:165–188.
29. O. C. Shanks, J. W. Santo Domingo, J. E. Graham (2006). Use of competitive DNA hybridization to identify differences in the genomes of bacteria. *J Microbiol Methods*; 66:321–330.
30. E. Van den Berghe, T. De Winter, L. De Vuyst (2006). Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. *Int J Food Microbiol*; 107:159–170.
31. F. Gardin, M. Martuscelli, M. C. Caruso, F. Galgano, M. A. Crudele, F. Favati, M. E. Guerzoni, G. Suzzi (2001). Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *Int J Food Microbiol*; 64:105–117.
32. S. Martinez, M. Lopez, A. Bernardo (2003). Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells. *Lett Appl Microbiol*; 37:475–481.
33. K. Nakajo, Y. Iwami, R. Komori, S. Ishikawa, T. Ueno, Y. Suzuki, N. Takahashi (2005). The resistance to acidic and alkaline environments of endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. *Int Congr Ser*; 1284:191–192.
34. I. T. Ivanov, S. Boytcheva, G. Mihailova (1999). Parallel study of thermal resistance and permeability barrier stability of *Enterococcus faecalis* as affected by salt composition, growth temperature and pre-incubation temperature. *J Therm Biol*; 24:217–227.

35. S. Garneau, N. I. Martin, J. C. Vederas (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*; 84:577–592.
36. C. A. Campos, O. Rodriguez, P. Calo-Mata, M. Prado, J. Barros- Velazquez (2006). Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Res Int*; 39:356–364.
37. C. M. A. P. Franz, W. H. Holzapfel, M. E. Stiles (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *Int J Food Microbiol*; 47:1–24.
38. I. Kuhn, A. Iversen, L. G. Burman, B. Olsson-Liljequist, A. Franklin, M. Finn, F. Aarestrup, A. M. Seyfarth, A R. Blanch et al (2003). Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment – a European study. *Int J Food Microbiol*; 88:133–145.
39. J. Peters, K. Mac, H. Wichmann-Schauer, G. Klein, L. Ellerbroek (2003). Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *Int J Food Microbiol*; 88:311–314.
40. A. H. Mutnick, D. J. Biedenbach, R. N. Jones (2003). Geographic variations and trends in antimicrobial resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2000). *Diagn Microbiol Infect Dis*; 46:63–68.
41. D. F. J. Brown, N. M. Brown, B. D. Cookson, G. Duckworth, M. Farrington, G. L. French, L. King, D. Lewis, D. M. Livermore et al (2006). National glycopeptide-resistant enterococcal bacteraemia surveillance Working Group report to the Department of Health – August 2004. *J Hosp Infect*; 62 (Suppl. 1):1–27.
42. C. H. Poh, H. M. L. Oh, A. L. Tan (2006). Epidemiology and clinical outcome of enterococcal bacteraemia in an acute care hospital. *J Infect*; 52:383–386.
43. G. Giraffa (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev*; 26:163–171.
44. W. W. Spink, V. Ferris (1945), Quantitative action of penicillin inhibitor from penicillin-resistant strains of staphylococci. *Science*; 102:221
45. A. L. Panlilio, D. H. Culver, R. P. Gaynes et al (1992). Methicillin-resistant *S. aureus* in US hospitals, 1975-1991. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 13:582-6

46. R. S. Schwalbe, J. T. Stapleton, P. H. Gilligan (1987). Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *N Engl J Med*; 316:927-31
47. R. N. Jones, H. S. Sader, M. E. Erwin et al (1995). Emerging multiply resistant enterococci among clinical isolates. I. Prevalence data from 97 medical center surveillance study in the United States. *Diag Microbiol Infect Dis*; 21:85-93
48. M. A. Pfaller, R. N. Jones, G. V. Doern et al (1998). 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*; 42:1762-70
49. G. V. Doern, M. A. Pfaller, K. Kugler et al (1998). 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*; 27:764-8
50. S. N. Banerjee, T. G. Emori, D. H. Culver et al (1991). Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. *Am J Med*; 91 Suppl. 3B:86S-89S
51. S. A. Marshall, W. W. Wilke, M. A. Pfaller et al (1998). *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mec A*) characterisation of oxacillin resistance in the SCOPE program. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 30:205-14
52. R. C. Moellering (1998). Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis*; 26:1196-9
53. F. Franceschi, E. M. Duffy (2006). *Biochem. Pharmacol*; 71:1016–1025.
54. D. N. Wilson, (2004). In *Protein Synthesis and Ribosome Structure*, K.H. Nierhaus and D.N. Wilson, eds. Weinheim, Germany: Wiley- VCH:449–527.
55. K. L. Leach, S. M. Swaney, J. R. Colca, W. G. McDonald, J. R. Blinn, L. M. Thomasco, R. C. Gadwood, D. Shinabarger, L. Xiong, A.S. Mankin (2007), The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria. *Mol. Cell*; 26:393–402.

56. N. B. Matassova, M. V. Rodnina, R. Endermann, H. P. Kroll, U. Pleiss, H. Wild, W. Wintermeyer (1999), Ribosomal RNA is the target for oxazolidinones, a novel class of translational inhibitors. *RNA*; 5:939–946.
57. A. H. Lin, R. W. Murray, T. J. Vidmar, K. R. Marotti (1997), The oxazolidinone eperezolid binds to the 50S ribosomal subunit and competes with binding of chloramphenicol and lincomycin. *Antimicrob. Agents Chemother*; 41:2127–2131.
58. J. R. Colca, W. G. McDonald, D. J. Waldon, L. M. Thomasco, R. C. Gadwood, E. T. Lund, G. S. Cavey, W. R. Mathews, L. D. Adams, E. T. Cecil et al. (2003), Cross-linking in the living cell locates the site of action of oxazolidinone antibiotics. *J Biol Chem*; 278:21972–21979.
59. P. Sander, L. Belova, Y.G. Kidan, P. Pfister, A. S. Mankin, E. C. Bottger (2002), Ribosomal and non-ribosomal resistance to oxazolidinones: species-specific idiosyncrasy of ribosomal alterations. *Mol Microbiol*; 46:1295–1304.
60. L. Xiong, P. Kloss, S. Douthwaite, N. M. Andersen, S. Swaney, D. L. Shinabarger, A. S. Mankin (2000), Oxazolidinone resistance mutations in 23S rRNA of *Escherichia coli* reveal the central region of domain V as the primary site of drug action. *J Bacteriol*; 182:5325– 5331.
61. Y. Qin, N. Polacek, O. Vesper, E. Staub, E. Einfeldt, D. N. Wilson, K. H. Nierhaus (2006), The Oxazolidinone Class of Drugs Find Their Orientation on the Ribosome. *Cell*; 127:721–733.
62. D. N. Wilson, K. H. Nierhaus (2007), The Oxazolidinone Class of Drugs Find Their Orientation on the Ribosome. *Mol Cell*; 26: 460-62
63. A. Bashan, I. Agmon, R. Zarivach, F. Schlutzen, J. Harms, R. Berisio, H. Bartels, F. Franceschi, T. Auerbach, H. A. Hansen et al. (2003), Structural basis of the ribosomal machinery for peptide bond formation, translocation, and nascent chain progression. *Mol Cell*; 11:91–102.
64. Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighteenth informational supplement. 28: 117-118.
65. D. A. Relman, T. M. Schmidt, R. P. MacDermot, S. Falkow (1992), Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med*. 30; 327(5):293-301.

66. W. G. Weisburg, S. M. Barns, D. A. Pelletier, D. J. Lane (1991), 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 173(2): 697–703.
67. A. Liakopoulos, C. Neocleous, D. Klapsa, M. Kanellopoulou, I. Spiliopoulou, K. D. Mathiopoulos, E. Papafrangas, E. Petinaki (2009), A T2504A mutation in the 23S rRNA gene responsible for high-level resistance to linezolid of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemoth.* 64: 206–211
68. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
69. F. C. Tenover, R. D. Arbeit, R. V. Roering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, B. Swaminathan (1995), Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*; 33:2233-39
70. B. E. Murray (1990), The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*; 46-65
71. J. L. Vincent (2003), Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet*; 361:2068-2077.
72. H. Hanberger, D. Diekema, A. Fluit, R. Jones, M. Struelens, R. Spencer, M. Wolff (2001), Surveillance of antibiotic resistance in European ICUs. *J Hosp Infect*; 48:161-176.
73. D. Pittet, D. Tarara, R. P. Wenzel (1994), Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *JAMA*; 271:1598- 1601.
74. R. C. Spencer (1996), Predominant pathogens found in the European prevalence of infection in intensive care study. *Eur J Clin Infect Dis*; 15:281-285.
75. A. N. Neely, M. P. Maley (2000), Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastic. *J Clin Microbiol*; 38:724-726.
76. J-L Vincent (2000), Microbial resistance: lessons from the EPIC study. *Intensive Care Med*; 26:S3-S8.
77. G. Devasahayam, M. W. Scheld, P. S. Hoffman (2010), Newer Antibacterial Drugs for a New Century; 19:215-234.
78. R. N. Jones, J. E. Ross, J. M. Bell et al (2009), Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum program: linezolid surveillance program results for 2008. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 65:404–13.

79. 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.
80. L. Xiong, P. Kloss, S. Douthwaite, N. M. Andersen, S. Swaney, D. L. Shinabarger et al (2000). Oxazolidinone resistance mutations in 23S rRNA of *Escherichia coli* reveal the central region of domain V as the primary site of drug action. *J Bacteriol*;182(19):5325-31
81. J. B. Locke, M. Hilgers, K. J. Shaw (2009), Novel ribosomal mutations in *Staphylococcus aureus* strains identified through selection with the oxazolidinones linezolid and torezolid (TR-700). *Antimicrob Agents Chemother*; 53:5265–74.
82. R. E. Mendes, R. N. Jones, L. M. Deshpande et al (2009). Daptomycin activity tested against linezolid-nonsusceptible Gram-positive clinical isolates. *Microb Drug Resist*; 15:245–9
83. A. Wong, S. P. Reddy, D. S. Smyth et al (2010), Polyphyletic emergence of linezolid-resistant staphylococci in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*; 54:742–8.
84. J. B. Locke, M. Hilgers, K. J. Shaw (2009), Mutations in ribosomal protein L3 are associated with oxazolidinone resistance in staphylococci of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother*; 53:5275–8
85. S. Schwarz, C. Werckenthin, C. Kehrenberg (2000), Identification of a plasmid- borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob Agents Chemother*; 44:2530–3.
86. K. S. Long, J. Poehlsgaard, C. Kehrenberg et al (2006), The cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*; 50:2500–5.
87. R. E. Mendes, L. M. Deshpande, M. Castanheira et al (2008), First report of cfr-mediated resistance to linezolid in human staphylococcal clinical isolates recovered in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*; 52:2244–6.
88. S. M. Toh, L. Xiong, C. A. Arias et al (2007), Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Mol Microbiol*; 64:1506–4.



89. G. Morales, J. J. Picazo, E. Baos et al (2010), Resistance to linezolid is mediated by the cfr gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis; 50:821–5.