



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθύντρια: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευθυμία ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ

Διδακτορική Διατριβή

**" ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΩΝ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ
ΣΤΕΛΕΧΗ GRAM ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΟΚΚΩΝ "**

υπό

ΕΛΕΝΗΣ Ν. ΝΤΟΚΟΥ

Μοριακού Βιολόγου - Γενετίστριας 2012

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2012

© 2012 Ελένη Ντόκου

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

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (3^η/21-03-2012 ΓΣΕΣ):

- 1^{ος} Εξεταστής**
(Επιβλέπων) Δρ. Σπυρίδων **Πουρνάρας**
Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** Δρ. Αθανάσιος **Τσακρής**
Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 3^{ος} Εξεταστής** Δρ. Κωνσταντίνος **Σταθόπουλος**
Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Πατρών
- 4^{ος} Εξεταστής** Δρ. Γεώργιος **Συρογιαννόπουλος**
Καθηγητής Παιδιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 5^{ος} Εξεταστής** Δρ. Παναγιώτης **Μαρκουλάτος**
Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη
Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6^{ος} Εξεταστής** Δρ. Ευθυμία **Πετεινάκη**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7^{ος} Εξεταστής** Δρ. Χρήστος **Χατζηχριστοδούλου**
Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θερμές ευχαριστίες οφείλω να εκφράσω στον κ. Σπύρο Πουρνάρα, Επίκουρο Καθηγητή Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ο οποίος μου εμπιστεύτηκε το θέμα της διατριβής αυτής και μου προσέφερε κάθε δυνατή στήριξη και ενθάρρυνση κατά την εκπόνηση της. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή κ. Σπύρο Πουρνάρα, τον κ. Αθανάσιο Τσακρή, Καθηγητή Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και τον κ. Κωνσταντίνο Σταθόπουλο, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών, για τη σημαντική συμβολή τους στη διεξαγωγή της έρευνας αυτής και την υπομονή που έδειξαν στην καθοδήγηση των ερευνητικών μου δραστηριοτήτων. Ιδιαίτερα, θέλω να τους ευχαριστήσω για την στήριξη που μου παρείχαν για την εκπλήρωση της διατριβής μου με συνεχείς παρενέσεις και την αμέριστη βοήθεια τους στην καλλιέργεια του ερευνητικού μου πνεύματος, χωρίς να φείδονται χρόνο και κόπο. Ευχαριστώ, επίσης, τον κ. Αντώνιο Μανιάτη, αφυπηρετήσαντα Καθηγητή Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τον κ. Επαμεινώνδα Ζακυνθινό, Αναπληρωτή Καθηγητή Εντατικής Θεραπείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύτιμη συμβολή τους στη διεκπαιρέωση αυτής της διατριβής. Ευχαριστώ, επίσης, τον κ. Γεώργιο Συρογιαννόπουλο, τον κ. Χρήστο Χατζηχριστοδούλου και την κ. Ευθυμία Πετεινάκη, Καθηγητή και Αναπληρωτές Καθηγητές αντίστοιχα του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τον κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο, Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που με χαρά δέχθηκαν να συμμετέχουν στην επταμελή επιτροπή. Ευχαριστώ επίσης θερμά την κ. Αικατερίνη Θέμελη-Διγαλάκη, Διευθύντρια και την κ. Ολυμπία Ζαρκωτού, Επιμελήτρια Α' του Τζανείου Νοσοκομείου για τη συμβολή τους στη διατριβή αυτή, με την αποστολή σημαντικού αριθμού στελεχών προς μελέτη. Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα όλους εκείνους που με στήριξαν με την υπομονή τους και την αγάπη τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

*Λάρισα, 2012
Ελένη Ν. Ντόκου
Μοριακός Βιολόγος - Γενετίστρια*

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Ονοματεπώνυμο: Ελένη Ντόκου

Επάγγελμα: Μοριακός Βιολόγος - Γενετίστρια

Ημερομηνία Γέννησης: 10/05/1983

Ιούνιος 2001: 1^ο Ενιαίο Λύκειο Βόλου, Βαθμός Απολυτηρίου **18.5/20**

Ιούλιος 2007: Βασικός τίτλος Σπουδών, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Βαθμός Πτυχίου **6.8/10**

Νοέμβριος 2010: Κατοχύρωση Μεταπτυχιακού Τίτλου Σπουδών «Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας-Μοριακής Γενετικής και Διαγνωστικοί Δείκτες» του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Βαθμός Πτυχίου **8.6/10**

Ξένες Γλώσσες: Αγγλική, Γερμανική, Ιταλική

Δημοσιεύσεις:

- **Ntokou E**, Stathopoulos C, Kristo I, Dimitroulia E, Labrou M, Vasdeki A, Makris D, Zakynthinos E, Tsakris A, Pournaras S. Intensive care unit dissemination of multiple clones of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **J Antimicrob Chemother** 2012; 67: 1819-1823.
- Amaral L, Martins A, Spengler G, Martins M, Rodrigues L, McCusker M, **Ntokou E**, Cerca P, Machado L, Viveiros M, Couto I, Fanning S, Kristiansen J, Molnar J. Structure, genetic regulation, physiology and function of the AcrAB-TolC efflux pump of *Escherichia coli* and *Salmonella*, p. 44-61. In Tegos G, Mylonakis E (ed.), *Antimicrobial Drug Discovery: Emerging Strategies*, 2012. Cabi, United Kingdom.
- Tsikrikonis G, Maniatis AN, Labrou M, **Ntokou E**, Michail G, Daponte A, Stathopoulos C, Tsakris A, Pournaras S. Differences in biofilm formation and virulence factors between clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin. **Microbiol Pathol** 2012; 52: 336-43.
- Labrou M, Michail G, **Ntokou E**, Pittaras TE, Pournaras S, Tsakris A. Activity of oxacillin versus that of vancomycin against oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolates evaluated by population analyses, time-kill assays, and a murine thigh infection model. **Antimicrob Agents Chemother** 2012; 56: 3388-91.

- Spengler G, Rodrigues L, Martins A, Martins M, McCusker M, Cerca P, Machado L, Costa SS, **Ntokou E**, Couto I, Viveiros M, Fanning S, Molnar J, Amaral L. Genetic response of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to thioridazine rendering the organism resistant to the agent. *Int J Antimicrob Agents*. **Int J Antimicrob Agents** 2012; 39: 16-21.
- Costa SS, **Ntokou E**, Martins A, Viveiros M, Pournaras S, Couto I, Amaral L. Identification of the plasmid-encoded *qacA* efflux pump gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain HPV107, a representative of the MRSA Iberian clone. **Int J Antimicrob Agents** 2010; 36: 557-61.
- Vasilaki O, **Ntokou E**, Ikonomidis A, Nikolaidis P, Frantzidou F, Alexiou-Daniel St, Maniatis An, Pournaras S. Prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *QNRS* among ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* genotypes in Greece. **Antimicrob Agents Chemother** 2008; 52: 2996-7
- Ikonomidis A, **Ntokou E**, Maniatis An, Tsakris A, Pournaras S. Hidden VIM-1 Metallo-beta-lactamase phenotypes among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **J Clin Microbiol** 2008; 46: 346-9.

Ανακοινώσεις συνεδρίων:

- 5^ο Πανελλήνιο Ετήσιο συνέδριο Βιοπαθολογίας με τίτλο «Plasmid genes conferring resistance to quinolones in *Escherichia coli* resistant clinical isolates», 9-12 Απριλίου 2008, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα
- 18^ο Ευρωπαϊκό συνέδριο Μικροβιολογίας και Λοιμώξεων με τίτλο «Prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS* among ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* genotypes in Greece», 19-22 Απριλίου 2008, Βαρκελώνη, Ισπανία
- 19^ο Ευρωπαϊκό συνέδριο Μικροβιολογίας και Λοιμώξεων με τίτλο «Outbreak of multiple clones of linezolid- and vancomycin- resistant enterococci in the intensive-care unit of a Greek University Hospital», 16-19 Μαΐου 2009, Ελσίνκι, Φιλανδία
- 19^ο Ευρωπαϊκό συνέδριο Μικροβιολογίας και Λοιμώξεων με τίτλο «Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates», 16-19 Μαΐου 2009, Ελσίνκι, Φιλανδία

- 4^η Συνάντηση Επιτροπής Διαχείρισης του οργανισμού COST (ACTION 0701) με τίτλο «Evaluation of the expression of genes that regulate and code for the transporter of the AcrAB efflux pump in *ramA* and *soxS* deleted mutants exposed to thioridazine», 10-11 Δεκεμβρίου 2009, Δουβλίνο, Ιρλανδία
- 4^η Συνάντηση Επιτροπής Διαχείρισης του οργανισμού COST (ACTION 0701) με τίτλο «Characterization of the MDR strain *Staphylococcus aureus* HPV-107 for efflux pump activity and the presence of the *QAC* efflux pump containing plasmid», 10-11 Δεκεμβρίου 2009, Δουβλίνο, Ιρλανδία
- 36^ο Πανελλήνιο Ιατρικό συνέδριο με τίτλο «Αντοχή στη λινεζολίδη σε στελέχη coagulase-αρνητικών σταφυλοκόκκων» 4-8 Μαΐου 2010, Αθήνα, Ελλάδα
- 5^η Συνάντηση Επιτροπής Διαχείρισης του οργανισμού COST (ACTION 0701) με τίτλο «Investigation of the linezolid resistance mechanisms in clinical isolates of coagulase negative Staphylococci from Greece», 8-9 Ιουλίου 2010, Βρέμη, Γερμανία
- 50^ο Ετήσιο Διεπιστημονικό συνέδριο Αντιμικροβιακών Παραγόντων και Χημειοθεραπείας με τίτλο «Outbreak of Linezolid-Resistant Coagulase-Negative staphylococci in an Intensive Care Unit and Identification of Novel Resistance Mutations», 12-15 Σεπτεμβρίου 2010, Βοστώνη, ΗΠΑ
- 51^ο Ετήσιο Διεπιστημονικό συνέδριο Αντιμικροβιακών Παραγόντων και Χημειοθεραπείας με τίτλο «Linezolid dependence among linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clinical isolate», 17-20 Σεπτεμβρίου 2011, Σικάγο, ΗΠΑ

Reviewer: **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.**

**" ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΩΝ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΔΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ
ΣΤΕΛΕΧΗ GRAM ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΟΚΚΩΝ "**

ΕΛΕΝΗ ΝΤΟΚΟΥ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Σπυρίδων Πουρνάρας**, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- (*Επιβλέπων*),
2. **Δρ. Αθανάσιος Τσακρής**, Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
3. **Δρ. Κωνσταντίνος Σταθόπουλος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

*Στην μητέρα μου και στον πατέρα μου
που με τους κόπους και την υπομονή τους,
στήριζαν την προσπάθεια αυτή.*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι σταφυλόκοκκοι και οι εντερόκοκκοι είναι συχνοί αιτιολογικοί παράγοντες για ενδοноσοκομειακές λοιμώξεις στην Ευρώπη και στις ΗΠΑ. Τα γένη αυτά, αναπτύσσουν γρήγορα μηχανισμούς αντοχής σε διάφορες κατηγορίες αντιβιοτικών όπως τα β-λακταμικά ή τα γλυκοπεπτίδια. Οι λοιμώξεις από πολυανθεκτικά στελέχη αυτών των γενών μπορεί να αποβούν κρίσιμες για την πορεία του ασθενή, ιδιαίτερα για τους ανοσοκατεσταλμένους νοσηλευόμενους της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας. Αποτέλεσμα αυτού ήταν να αναπτυχθούν νέοι αντιμικροβιακοί παράγοντες, όπως οι οξαζολιδιόνες, σαν πιθανές εναλλακτικές λύσεις για τη θεραπεία λοιμώξεων από πολυανθεκτικούς Gram-θετικούς μικροοργανισμούς.

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών αντοχής εντεροκόκκων και σταφυλοκόκκων, έναντι της λινεζολίδης, που ιδιαίτερα για τη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας αποτελεί θεραπεία εκλογής για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από τα γένη αυτά όταν άλλοι αντιμικροβιακοί παράγοντες έχουν ήδη αποτύχει. Την περίοδο έναρξης της έρευνας (2007) τα σχετικά επιδημιολογικά και μοριακά ευρήματα από τον ελλαδικό χώρο ήταν περιορισμένα, ενώ σε παγκόσμιο επίπεδο οι αντίστοιχες βιβλιογραφικές αναφορές μελέτης των μοριακών μηχανισμών αντοχής ήταν σχετικά λίγες. Κύριος στόχος της διατριβής ήταν να μελετήσει τους μοριακούς μηχανισμούς και τους προκαλούμενους φαινοτύπους αντοχής στη λινεζολίδη.

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν οι μηχανισμοί αντοχής στη λινεζολίδη στελεχών εντεροκόκκων (*Enterococcus faecalis* και *Enterococcus faecium*) που προκάλεσαν μία μικρής έκτασης επιδημική έξαρση το 2007-2008. Ο μόνος μηχανισμός αντοχής που ανιχνεύθηκε ήταν η μετάλλαξη G2576T σε διαφορετικό αριθμό αντιγράφων του γονιδίου του 23S rRNA ανά στέλεχος, ενώ τα στελέχη που προκάλεσαν την επιδημία δεν ήταν κλωνικά.

Αναλύθηκαν επίσης οι μηχανισμοί αντοχής στη λινεζολίδη στελεχών *Staphylococcus epidermidis* και *Staphylococcus capitis*) που απομονώθηκαν από διαφορετικούς ασθενείς σε τριτοβάθμιο Νοσοκομείο της Αθήνας το 2008-2010. Οι μηχανισμοί αντοχής που ανιχνεύθηκαν ήταν ποικίλες μεταλλάξεις στην περιοχή V του 23SrRNA σε διαφορετικό αριθμό αντιγράφων του 23SrRNA ανά στέλεχος και μεταλλάξεις στη ριβοσωμική πρωτεΐνη L3, ενώ τα στελέχη που προκάλεσαν την επιδημία ήταν κυρίως κλωνικά. Παρατηρήθηκε επίσης, για πρώτη φορά με τη

λινεζολίδη, ένας ενδιαφέρων φαινότυπος «εξάρτησης» των σταφυλοκόκκων, με μεγάλη αύξηση του ρυθμού της ανάπτυξης τους σε παρουσία λινεζολίδης. Η εξάρτηση από τη λινεζολίδη πιθανώς συμβάλλει στη μεγάλη αύξηση της απομόνωσης ανθεκτικών στη λινεζολίδη στελεχών *Staphylococcus epidermidis* στον Ελληνικό χώρο.

ABSTRACT

Staphylococci and enterococci are common causative agents of hospital-acquired infections in Europe and USA. These genera develop rapidly resistance mechanisms to multiple classes of antibiotics like beta-lactams or glycopeptides. Infections from multidrug-resistant strains of these genera may prove critical to the progress of the patient, especially for immunocompromised patients hospitalized in the Intensive Care Unit. The result was the development of new antimicrobial agents, like oxazolidinones, as possible alternatives for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-positive microorganisms.

The purpose of this study was to investigate the molecular mechanisms of enterococci and staphylococci, against linezolid, that especially for the Intensive Care Unit is the treatment of choice for the treatment of infections caused by these genera when other antimicrobial agents have already failed. The period that this research began (2007) relevant epidemiological and molecular findings from Greece were limited, while globally the corresponding reference studies for molecular mechanisms of resistance were relatively few. The main objective of this study was to study the molecular mechanisms of resistance and the induced resistance phenotypes to linezolid.

In the present study the resistance mechanisms to linezolid of enterococci isolates (*Enterococcus faecalis* και *Enterococcus faecium*) were analysed that caused a minor outbreak in 2006-2007. The only resistance mechanism that was detected was the mutation G2576T in different copy numbers of 23S rRNA gene per isolate, while the isolates that caused the outbreak were not clonal.

The resistance mechanisms to linezolid were analyzed in isolates of *Staphylococcus epidermidis* και *Staphylococcus capitis* that were isolated from different patients in a tertiary hospital in Piraeus, Athens in 2008-2010. The

mechanisms that were detected were multiple mutations in domain V of the 23S rRNA gene in different copy numbers of 23S rRNA gene per isolate and mutations in ribosomal protein L3, while the isolates that caused the outbreak were mainly clonal. It was also observed for the first time, an interesting phenotype of “dependence” of staphylococci, with a large increase in the rate of growth in the presence of linezolid. The dependence to linezolid probably contributes to the large increase of isolation linezolid-resistant strains of *Staphylococcus epidermidis* in the Greek territory.

Πίνακας Περιεχομένων

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	15
I. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>ENTEROCOCCUS</i>	16
I.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	16
I.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	18
I.3 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ – ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ	19
I.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ – ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ	21
I.4.1 Ταυτοποίηση με χρήση συμβατικών μεθόδων	21
I.4.2 Ταυτοποίηση με Εμπορικά Συστήματα	24
I.4.3 Τυποποίηση με Μοριακές Μεθόδους	25
I.5 ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ	27
I.6 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	30
II. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>Staphylococcus</i>	32
II.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	32
II.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	32
II.3 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ – ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ	34
II.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ – ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ	37
II.4.1 Ταυτοποίηση με χρήση συμβατικών μεθόδων	37
II.4.2 Ταυτοποίηση με Εμπορικά Συστήματα	44
II.4.3 Επιδημιολογική Τυποποίηση με Μοριακές Μεθόδους	45
II.5 ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ	47
II.6 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	50
II.6.1 Κοαγκουλάση-Αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι	51
III. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ	53
III.1 ΓΕΝΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	53
III.1.1 Ενδογενής Αντοχή	53
III.1.2 Επίκτητη Αντοχή	54
III.2 ΓΕΝΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	55
III.3 ΟΞΑΖΟΛΙΔΙΝΟΝΕΣ – ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	56
III.4 ΔΙΝΕΖΟΛΙΔΗ	62
III.5 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΔΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΣΕ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΥΣ - ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΥΣ	63
III.5.1 Αντοχή λόγω μεταλλάξεων στην περιοχή V του 23S rRNA	64
III.5.2 Μηχανισμός συσχετιζόμενος με τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες L3, L4 και L22	66
III.5.3 Μηχανισμός Cfr	67
III.6 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ	68
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	71
I. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	72
I.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	72
I.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ – ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ	72
I.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	72
I.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ (MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION, MIC)	73
I.4.1 Προσδιορισμός της MIC με τη μέθοδο του E-test	73

1.4.2	Προσδιορισμός της MIC στη λινεζολίδη με τη μέθοδο των αραιώσεων σε άγαρ .	74
I.5	ΕΞΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ DNA	74
I.6	ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΑΛΛΟΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ (PULSED – FIELD GEL ELECTROPHORESIS, PFGE)	75
I.7	ΜΕΘΟΔΟΙ PCR	78
I.7.1	ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ	79
1.7.1.1	Σχεδιασμός εκκινητών με δυνατότητα ενίσχυσης ολόκληρου του γονιδίου 23S rRNA σε 4 αλληλοεπικαλυπτόμενα ζεύγη	79
1.7.1.2	Εφαρμογή της PCR για την ενίσχυση ολόκληρου του γονιδίου του 23S rRNA των εντεροκόκκων σε 4 αλληλοεπικαλυπτόμενα ζεύγη	82
1.7.1.3	Σχεδιασμός εκκινητών με δυνατότητα ενίσχυσης της πιθανής περιοχής σύνδεσης της λινεζολίδης για κάθε αντίγραφο του 23S rRNA ξεχωριστά	84
1.7.1.4	Εφαρμογή της PCR για την ενίσχυση της πιθανής περιοχής σύνδεσης της λινεζολίδης για κάθε αντίγραφο του 23S rRNA ξεχωριστά	84
I.7.2	ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΙ	88
1.7.2.1	Εφαρμογή της PCR για κάθε αντίγραφο του 23S rRNA των σταφυλοκόκκων ξεχωριστά	88
1.7.2.2	Εφαρμογή της PCR για ανίχνευση του γονιδίου της μεθυλοτρανσφεράσης Cfr	90
1.7.2.3	Εφαρμογή της PCR για ενίσχυση των γονιδίων <i>rplC</i> , <i>rplD</i> και <i>rplV</i> που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες L3, L4 και L22	91
I.8	ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ	93
I.9	ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	95
II.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	97
II.1	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΕΙΔΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	97
II.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ (MIC) ΣΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ, BANKOMYKINΗ ΚΑΙ ΤΕΙΚΟΠΛΑΝΙΝΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ E-TEST	98
II.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ MIC ΣΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΩΝ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΝ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ	100
II.4	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΥ ΚΑΙ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΥ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΑΛΛΟΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ (PFGE)	102
II.5	ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR	106
II.5.1	Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου 23S rRNA των εντεροκόκκων σε 4 αλληλοεπικαλυπτόμενα ζεύγη	106
II.5.2	Αποτελέσματα ενίσχυσης κάθε αντιγράφου του γονιδίου 23S rRNA των εντεροκόκκων ξεχωριστά	109
II.6	ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΙ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR	113
II.6.1	Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου 23S rRNA των σταφυλοκόκκων	113
II.6.2	Προσδιορισμός αλληλουχίας βάσεων (DNA sequencing) των αντιγράφων του γονιδίου 23S rRNA των σταφυλοκόκκων	114
II.6.3	Αποτελέσματα ανίχνευσης του γονιδίου της μεθυλοτρανσφεράσης Cfr και ενίσχυσης των γονιδίων <i>rplC</i> , <i>rplD</i> και <i>rplV</i> που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες L3, L4 και L22	116
II.7	ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ	119
III.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	123
	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	132
	ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ	164

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΡΟΣ Ι

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ – ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ *ENTEROCOCCUS*Ι. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *ENTEROCOCCUS*

Ι.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Μικροοργανισμοί που πλέον συμπεριλαμβάνονται στο γένος των εντεροκόκκων αρχικά θεωρούνταν ότι συσχετίζονται με τους στρεπτοκόκκους περιττωματικής προελεύσεως. Για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα αποτελούσαν σημαντικό τμήμα του γένους των στρεπτοκόκκων, που διαφοροποιούνταν λόγω της υψηλότερης αντοχής τους σε φυσικούς και χημικούς παράγοντες και περικλείαν τους περισσότερους στρεπτοκόκκους της ορολογικής ομάδας D. Τις τελευταίες όμως δεκαετίες οι εντερόκοκκοι έχουν υποστεί σημαντικές αλλαγές στην ταξινόμηση τους που ξεκίνησε με τον διαχωρισμό του γένους των στρεπτοκόκκων και την αναγνώριση της ύπαρξης του γένους των εντεροκόκκων (Schleifer *et al*, 1984A). Σαφή στοιχεία ότι ο *Enterococcus faecalis* και ο *Enterococcus faecium* ήταν επαρκώς διαφορετικοί από τα υπόλοιπα μέλη του γένους ώστε να χρήζουν κατανομή σε ένα ξεχωριστό γένος παρασχέθηκε από μελέτες που χρησιμοποιούσαν μοριακές προσεγγίσεις (Schleifer *et al*, 1984A). Τα υπόλοιπα εντεροκοκκικά είδη μετατοπίστηκαν τότε στο νέο γένος, και πολλά νέα είδη περιγράφηκαν και προτάθηκαν για να συμπεριληφθούν στο γένος των εντεροκόκκων (Collins MD *et al*, 1984, Collins MD *et al*, 1986, Collins MD *et al*, 1989, Collins MD *et al*, 1991, De Vaux A *et al*, 1998, Devriese LA *et al*, 1983, Devriese LA *et al*, 1990, Farrow JAE *et al*, 1985, Martinez-Murcia AJ *et al*, 1991, Rodrigues U *et al*, 1990, Svec P *et al*, 2001, Teixeira LM *et al*, 2001, Tyrell GJ *et al*, 2002, Vancanneyt M *et al*, 2001, Williams AM *et al*, 1989).

Η φυλογενετική ανάλυση των γενών των καταλάση-αρνητικών Gram-θετικών κόκκων, βασισμένη στην σύγκριση της αλληλουχίας του γονιδίου του 16S rRNA, έχει αποκαλύψει ότι ο εντερόκοκκος σχετίζεται πιο στενά με το βαγγόκοκκο, τον τετραγενόκοκκο και το καρνοβακτήριο, από ότι με το στρεπτόκοκκο και το λακτόκοκκο, γέννη με τα οποία είχε συσχετιστεί φαινοτυπικά στο παρελθόν (Devriese LA *et al*, 1992, Facklam RR *et al*, 2002).

Ισχύοντα κριτήρια για να συμπεριληφθεί ένα είδος στο γένος του εντεροκόκκου συμπεριλαμβάνουν ένα συνδυασμό τιμών επανασυσχέτισης DNA-DNA, αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA, πρωτεϊνική ανάλυση ολόκληρων κυττάρων, και συμβατικές φαινοτυπικές δοκιμασίες. Ενώ η επανασυσχέτιση DNA-DNA θεωρείται η ‘χρυσή μέθοδος’ (gold standard) για τον προσδιορισμό των ειδών, η αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA και η πρωτεϊνική ανάλυση ολόκληρων κυττάρων συσχετίζονται πολύ καλά με αυτή τη ‘χρυσή μέθοδο’ (**Merquior VLC *et al*, 1994, Patel R *et al*, 1998, Teixeira LM *et al*, 1995, Teixeira LM *et al*, 1997, Tyrell GJ *et al*, 2002**). Η σύνθεση της μακράς αλυσίδας των λιπαρών οξέων των εντεροκοκκικών κυττάρων, όπως αποκαλύφθηκε από υγρή-αέρια χρωματογραφία, έχει επίσης ταξονομική σημασία και χρησιμοποιήθηκε για τη διάκριση ειδών (**Hsueh PR *et al*, 2000, Schleifer KH *et al*, 1984A, Tyrell GJ *et al*, 2002**).

Το γένος των εντεροκόκκων παράγει βακτηριοσίνες και για αυτό έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς την τελευταία δεκαετία στη βιομηχανία τροφίμων σαν προβιοτικό ή σαν εκκινητής καλλιέργειών (**Foulquie-Moreno MR *et al*, 2006**). Πλέον, οι εντερόκοκκοι έχουν γίνει ένα από τα πλέον κοινά νοσοκομειακά παθογόνα, με ασθενείς να αγγίζουν ποσοστό θνησιμότητας έως και 61% (**De Fátima Silva Lopes M *et al*, 2005**).

Το 2005 αναφέρθηκαν 7066 περιπτώσεις βακτηριαμίας από εντεροκόκκους στο Ηνωμένο Βασίλειο, μια αύξηση κατά 8% από το 2004, με το Health Protection Agency (2007) να δηλώνει ότι μία αύξηση στις βακτηριαμίες από εντεροκόκκους δεν είχε παρατηρηθεί για αρκετό διάστημα. Σε μελέτη των Bearman *et al*. βρέθηκε ότι 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 (**Bearman GML *et al*, 2005**). Αυτοί οι αριθμοί αντανakλώνται στις ΗΠΑ. Κατά τη διάρκεια μιας περιόδου 15 ετών έχει καταγραφεί μία 20-πλάσια αύξηση σε εμφάνιση VRE συσχετιζόμενη με νοσοκομειακές λοιμώξεις από την Εθνική Επιτήρηση Νοσοκομειακών Λοιμώξεων του Κέντρου Ελέγχου Νοσημάτων (CDC) των ΗΠΑ (**National Nosocomial Infections Surveillance, 2004**).

Αυτή η δραματική αύξηση στην μικροβιακή αντοχή στους εντεροκόκκους τονίζει παγκοσμίως την ανάγκη για μεγαλύτερη κατανόηση αυτού του γένους, συμπεριλαμβανομένης της οικολογίας του, της επιδημιολογίας του και της παθογένειας του.

1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Το γένος των εντεροκόκκων αποτελείται από Gram-θετικά, καταλάση-αρνητικά, μη σπορογόνα, προαιρετικά αναερόβια βακτήρια που μπορούν να υφίστανται ως μονοί κόκκοι ή και αλυσίδες. Οι εντερόκοκκοι ανήκουν σε μία ομάδα οργανισμών γνωστών και ως βακτήρια που παράγουν γαλακτικό οξύ (**lactic acid bacteria, LAB**) που παράγουν βακτηριοσίνες (**Health Protection Agency, 2005**).

Τα γένη των LAB με τα οποία ο μαδοποιούνται οι εντερόκοκκοι προσδιορίζονται από χαμηλό G+C περιεχόμενο της τάξεως του <50 mol% (**Klein G et al, 1998**). Δεν υπάρχουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που να διαχωρίζουν τους εντεροκόκκους από τα υπόλοιπα Gram-θετικά, καταλάση-αρνητικά κοκκοβακτήρια, έτσι η αναγνώριση γίνεται συνήθως με αντίστροφη μεθοδολογία (αποβολή γνωρισμάτων άλλων γενών πρώτα). Σαν γένος ο εντερόκοκκος έχει αναγνωριστεί από το 1899, όταν ο Thiercelin το αναγνώρισε σαν εντερικό οργανισμό (**Stiles ME et al, 1997**), ενώ η πιο πρόσφατη ταξινόμηση και οικολογία του αποδίδονται στον Klein (**Klein G, 2003**). Πολλές προσπάθειες είχαν γίνει παλιότερα για να διαχωριστεί το γένος των εντεροκόκκων από το γένος των στρεπτοκόκκων. Το 1937, ο Sherman ταξινόμησε τα είδη των στρεπτοκόκκων σε 4 υποκατηγορίες: περιττωματικοί στρεπτόκοκκοι (εντερόκοκκοι), στρεπτόκοκκοι των γαλακτοκομικών, ομάδες των viridans και πυογενείς στρεπτόκοκκοι (**Klein G, 2003**). 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 πρόπον αφού η αιμόλυση προσδιορίζεται από ένα πλασμίδιο (**Stiles ME et al, 1997**). Κλασσικές μέθοδοι όπως η οροτυπία και τυποποίηση φάγων αφήνουν αναπάντητα ερωτήματα για το ποιά είδη στρεπτοκόκκων ανήκουν στο γένος των εντεροκόκκων (**Saeedi B et al, 2002**).

Το 1984, μέσω της χρήσης του υβριδισμού του DNA και της αλληλούχησης του γονιδίου 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 (**Foulquie-Moreno MR et al, 2006**). Εννέα είδη μεταφέρθηκαν από την ομάδα των στρεπτοκόκκων και τώρα ο εντερόκοκκος περιέχει 28 είδη (**Foulquie-Moreno MR**

et al, 2006). 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.

Αυτή η μέθοδος επίσης επέτρεψε την ομαδοποίηση των ειδών των εντεροκόκκων. Η ομάδα ειδών *Enterococcus faecalis* περιλαμβάνει τα *E. faecalis*, *Enterococcus haemoperoxidus* και *Enterococcus moraviensis* ενώ στην ομάδα των ειδών *Enterococcus faecium* περιλαμβάνονται τα *E. faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus porcinus* και *Enterococcus villorum* (Klein G, 2003). 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 γένος των εντεροκόκκων λόγω της ελλειπούς ανάπτυξης σε 6.5% (w/v) χλωριούχο νάτριο στους 10 °C. Είναι δυσκολότερο να διαχωρίσεις το γένος των εντεροκόκκων από άλλους κόκκους που δεν εκφράζουν το αντιγόνο D όπως οι πεδιόκοκκοι, οι λακτόκοκκοι και οι 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) (Domig KJ *et al*, 2003), η ανάπτυξη σε καθορισμένες θερμοκρασίες και τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά είναι απαραίτητα για τον προσδιορισμό του γένους του εντεροκόκκου. Οι διαφορές στα γονιδιώματα των *E. faecalis* και *E. faecium* αξιολογήθηκαν σε μία μελέτη χρησιμοποιώντας ανταγωνιστικό DNA υβριδισμό (Shanks OC *et al*, 2006). 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 γένη εντοπίζεται σε αυτά τα γονίδια. Αυτή η παραλλαγή θεωρείται ότι έχει επιπτώσεις στα είδη που αποφεύγουν διαφορετικές ανοσοαποκρίσεις ξενιστών (Shanks OC *et al*, 2006).

1.3 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ – ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

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 (**Van den Berghe E et al, 2006**), αν και ανάπτυξη θα εμφανιστεί και σε αναερόβιες συνθήκες (**Domig KJ et al, 2003**). Και οι *E. faecalis* αλλά και οι *E. faecium* μπορούν να επιβιώσουν σε θέρμανση στους 60 °C για 30 λεπτά, κάνοντας έτσι το γένος των εντεροκόκκων διακριτό από άλλα στενά σχετιζόμενα γένη όπως ο στρεπτόκοκκος (**Foulquie-Moreno MR et al, 2006**). 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 (**Domig KJ et al, 2003**). Οι *E. faecalis* και *E. faecium* αναπτύσσονται σε ένα μεγάλο εύρος pH (4.6-9.9), με το βέλτιστο να είναι 7.5 (**Van den Berghe E et al, 2006**). Είναι επίσης ανθεκτικοί 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 γένους 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 (**Gardin F et al, 2001**). Κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής φάσης, η θερμοκρασία είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας ανάπτυξης, ενώ κατά τη στατική φάση η θέρμανση (**Gardin F et al, 2001, Martinez S et al, 2003**). Η αντοχή του *E. faecalis* σε ένα εύρος τιμών pH θεωρείται ότι οφείλεται στην αντοχή και τη μη διαπερατότητα σε οξέα και αλκάλια, αν και ορισμένες έρευνες προτείνουν ότι μπορεί να σχετίζεται με τη δράση μιας μεμβρανοσυνδεδεμένης H^+ -ATPάσης (**Nakajo K et al, 2005**). 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 (**Ivanov IT et al, 1999**). Σε υψηλότερες θερμοκρασίες οι εντεροκόκκοι είναι λιγότεροι ελαστικοί, με το περιεχόμενο της μεμβράνης να αυξάνει σε λιπαρά οξέα και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα να μειώνονται. Η αντοχή των εντεροκόκκων στη θέρμανση δεν εξαρτάται μόνο από την θερμοκρασία αλλά και από την φάση ανάπτυξης στην οποία βρίσκονται (**Martinez S et al, 2003**).

Όταν ο *E. faecalis* αναπτύσσεται σε συνήθεις θερμοκρασίες τα

καλλιεργημένα κύτταρα δεν έχουν την ικανότητα ανάπτυξης σε θερμά ή ψυχρά περιβάλλοντα που θα υπήρχαν αν η πρώτη γενιά είχε αναπτυχθεί σε ακραίες θερμοκρασίες (Ivanov IT *et al*, 1999). Τρεις ευδιάκριτες θερμοκρασιακές ομάδες (10-13 °C, 17-22 °C και 42-47 °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 (Ivanov IT *et al*, 1999).

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 (Gardin F *et al*, 2001).

1.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ – ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ

1.4.1 Ταυτοποίηση με χρήση συμβατικών μεθόδων

Εφόσον ταυτοποιείται ότι ένας άγνωστος καταλάση-αρνητικός, Gram-θετικός κόκκος είναι μέλος του γένους των εντεροκόκκων ή κάποιου στενού συγγενικά γένους, τα συμβατικά τεστ που παρουσιάζονται στον **πίνακα 1** μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ταυτοποιηθεί το είδος. Ο πίνακας αυτός περιέχει στοιχεία για την ταυτοποίηση είδους στελεχών που έχουν απομονωθεί από κλινικά δείγματα ανθρώπων, ενώ στελέχη που απομονώνονται από δείγματα μη ανθρώπινα μπορεί να διαφέρουν. Τα εντεροκοκκικά είδη χωρίζονται σε 5 ομάδες βασισμένες στο σχηματισμό οξέος από μαννιτόλη και σορβιτόλη και στην υδρόλυση της αργινίνης (**Πίνακας 1**). Τα είδη που ανήκουν σε κάθε ομάδα ταυτοποιούνται περαιτέρω με επιπλέον δοκιμασίες. Η ταυτοποίηση των εντεροκόκκων με συμβατικές μεθόδους δεν είναι γρήγορη και μπορεί να χρειαστεί επώαση έως και δέκα ημέρες. Ωστόσο, οι περισσότερες ταυτοποιήσεις μπορούν να ολοκληρωθούν με επώαση δύο ημερών.

Η ομάδα I αποτελείται από τα είδη *E. avium*, *E. malodoratus*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. saccharolyticus*, *E. gilvus*, και *E. pallens*. Αυτά τα είδη παράγουν οξύ από μαννιτόλη και σορβιτόλη, αλλά, δεν μπορούν να υδρολύσουν την αργινίνη. Διαχωρίζονται μέσω αντιδράσεων στις δοκιμασίες αραβινόζης και ραφινόζης, την ικανότητα τους να χρησιμοποιούν το πυροσταφυλικό και από το αν ή όχι τα στελέχη

χρωματίζονται (**Πίνακας 1**). Η παραγωγή οξέος από μεθυλο-α-*D*-γλυκοπυρανοσίδη (methyl-α-*D*-glycopyranoside, MGP) βοηθάει, επίσης, για να διαχωριστούν ορισμένα από αυτά τα είδη μεταξύ τους.

Η ομάδα II αποτελείται από τους *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* και *E. mundtii*. Αυτά τα είδη παράγουν οξύ από μαννιτόλη υδρολύουν την αργινίνη, αλλά δεν έχουν τη δυνατότητα να σχηματίζουν οξύ από σορβιτόλη. Τα άτυπα στελέχη δεν μπορούν να υδρολύσουν αργινίνη ή να σχηματίσουν οξύ από σορβιτόλη. Το γένος *Lactococcus* sp. έχει εισαχθεί σε αυτή την ομάδα γιατί, λόγω των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών ορισμένων στελεχών, μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη ταυτοποίηση σαν εντερόκοκκος. Αν απαντηθούν μη κινητά στελέχη *E. casseliflavus* και *E. gallinarum*, η παραγωγή οξέος από MGP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να βοηθήσει στην αναγνώριση αυτών των ειδών. Οι *E. casseliflavus* και *E. gallinarum* σχηματίζουν οξύ από MGP ενώ οι *E. faecium* και *E. mundtii* δεν σχηματίζουν.

Η ομάδα III των εντεροκόκκων υδρολύει αργινίνη αλλά δεν μπορεί να σχηματίσει οξύ από μαννιτόλη και σορβιτόλη. Αυτή η ομάδα αποτελείται από τα είδη *E. dispar*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. ratti* και *E. villorum* (*E. porcinus*) (**Teixeira LM et al, 2001, Vancanneyt MC et al, 2001**). Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του *E. porcinus* είναι πανομοιότυπα με εκείνα του *E. villorum*, και υπάρχουν στοιχεία ότι αποτελούν ένα μοναδικό είδος. Δύο ανεξάρτητες ομάδες ερευνητών εξέτασαν την ταξινόμηση αυτών των στελεχών και ονόμασαν τα είδη αυτά διαφορετικά. Τα νέα είδη σε αυτή την ομάδα είναι δύσκολο να ταυτοποιηθούν και να διαχωριστούν από τον *E. durans*. Οι *E. durans*, *E. porcinus* και *E. ratti* έχουν παρόμοια φαινοτυπικά προφίλ στα τεστ που αναφέρονται στον **Πίνακα 1**. Μπορούν να διαχωριστούν με αντιδράσεις σε γάλα ηλιοτροπίου, υδρόλυση του ιππουρικού, και σχηματισμό οξέος από τρεχαλόζη και ξυλόζη. Ο *E. durans* σχηματίζει οξύ και προκαλεί πήξη στο γάλα του ηλιοτροπίου, ο *E. porcinus* σχηματίζει οξύ αλλά δεν προκαλεί πήξη και ο *E. ratti* δεν σχηματίζει οξύ αλλά ούτε προκαλεί πήξη. Ο *E. durans* υδρολύει το ιππουρικό, ο *E. porcinus* δεν το υδρολύει, ενώ ο *E. ratti* είναι μεταβλητός στη δοκιμασία υδρόλυσης του ιππουρικού. Ο *E. durans* σχηματίζει οξύ από τρεχαλόζη αλλά όχι από ξυλόζη, ο *E. porcinus* σχηματίζει οξύ από τρεχαλόζη και από ξυλόζη, ενώ ο *E. ratti* δεν σχηματίζει οξύ ούτε από τρεχαλόζη ούτε από ξυλόζη. Τα υπόλοιπα μέλη της ομάδας αυτής ταυτοποιούνται εύκολα από τις αντιδράσεις στις δοκιμασίες πυροσταφυλικού, αραβινόζης, ραφινόζης και σακχαρόζης.

Η ομάδα IV αποτελείται από τρία είδη (*E. asini*, *E. cecorum* και *E. sulfureus*) που δεν σχηματίζουν οξύ από μανιτόλλη ή σορβιτόλη και δεν μπορούν να υδρολύσουν την αργινίνη. Αυτά τα τρία είδη μπορούν να διαχωριστούν με σχηματισμό οξέος από ραφινόζη και σορβιτόλη και από τη δοκιμασία χρωματισμού. Ο *E. sulfureus* είναι το μόνο μέλος αυτής της ομάδας που σχηματίζει οξύ από MGP.

Η ομάδα V απολείται από τον *E. columbae* και τον *Vagococcus*. Στελέχη των ειδών *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* και *E. faecalis* που αδυνατούν να υδρολύσουν την αργινίνη ομοιάζουν με τους μικροοργανισμούς που εμπεριέχονται στην ομάδα αυτή. Ωστόσο, τα στελέχη αυτά έχουν χαρακτηριστικά παρόμοια με τα στελέχη που υδρολύουν αργινίνη και μπορούν να διαχωριστούν από αυτές τις ίδιες φαινοτυπικές δοκιμασίες. Το είδος *Vagococcus* spp. εμπεριέχεται σε αυτή την ομάδα γιατί τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του *V. fluvialis* είναι παρόμοια με αυτά του γένους *Enterococcus* και μερικά στελέχη μπορούν να ταυτοποιηθούν ως εντερόκοκκοι (Teixeira LM *et al*, 1997).

Είδος	Φαινοτυπικά Χαρακτηριστικά ^a											
	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SUC	PYU	MGP
Ομάδα I												
<i>E. avium</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	Π
<i>E. gilvus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>E. malodoratus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	Π
<i>E. pallens</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. raffinosus</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	Π
<i>E. saccharolyticus</i> ^b	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
Ομάδα II												
<i>E. faecalis</i>	+ ^δ	-	+ ^δ	-	+	-	+	-	-	+ ^δ	+	-
<i>Lactococcus sp.</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Π	-	-
<i>E. faecium</i>	+ ^δ	-	+ ^δ	+	Π	Π	-	-	-	+ ^δ	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+ ^δ	+	Π	+	- ^δ	+ ^δ	+ ^δ	+	Π	+
<i>E. gallinarum</i>	+	-	+	+	-	+	-	+ ^δ	-	+	-	+
<i>E. mundtii</i>	+	-	+	+	Π	+	-	-	+	+	-	-
Ομάδα III												
<i>E. dispar</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>E. durans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. hirae</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>E. porcinus</i> ^γ	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. ratti</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ομάδα IV												
<i>E. asini</i> ^β	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. cecorum</i> ^β	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. sulfureus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
Ομάδα V												
<i>E. columbae</i> ^β	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>Vagococcus sp.</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+

^a Συντομογραφίες και σύμβολα: MAN, μαννιτόλη; SOR, σορβιτόλη; ARG, αργινίνη; ARA, αραβινόζη; SBL, σορβιτόλη; RAF, ραφινόζη; TEL, 0.04% tellurite; MOT, κινητικότητα; PIG, χρώμα; SUC, σουκρόζη; PYU, πυροσταφυλικό; MGP, μεθυλ-α-d-γλυκοκυρανοσίδη; +, 90% ή περισσότερα από τα στελέχη είναι θετικά; -, 10% ή λιγότερα από τα στελέχη είναι θετικά; Π, ποικίλλουν (11 έως 89% των στελεχών είναι θετικά).

^β Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά βασισμένα σε πληροφορίες από τυποποιημένα στελέχη.

^γ Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του *E. porcinus* είναι πανομοιότυπα με εκείνα του *E. villorum*. Αυτά τα δύο είδη που περιγράφηκαν πρόσφατα αντιστοιχούν σε μία τάξη.

^δ Εμφανίζονται περιστασιακές εξαιρέσεις (<3% των στελεχών εμφανίζουν παρεκκλίνουσες αντιδράσεις).

Πίνακας 1 (Teixeira LM *et al*, 2003). Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των ειδών εντεροκόκκου και ορισμένα συγγενικά είδη άλλων Gram-θετικών οργανισμών.

1.4.2 Ταυτοποίηση με Εμπορικά Συστήματα

Υπάρχουν πολλά εμπορικά διαθέσιμα συστήματα (μικρού μεγέθους, χειροκίνητα, ημιαυτόματα ή αυτόματα) για την ταυτοποίηση των ειδών του εντεροκόκκου. Από την εποχή που παρουσιάστηκαν, αυτά τα συστήματα έχουν ανανεωθεί έτσι ώστε να βελτιωθούν τα χαρακτηριστικά απόδοσης τους και να διευρυνθούν οι ικανότητες ταυτοποίησης, αφού οι ερευνητές έχουν εντοπίσει τυχόν ανακρίβειες (D'Azevedo PA *et al*, 2001, Garcia-Garrote F *et al*, 2001, Hamilton-Miller JMT *et al*, 1999, Wilke WW *et al*, 1997). Αυτά τα συστήματα είναι αξιόπιστα για την ταυτοποίηση

του *E. faecalis* και, σε μικρότερη έκταση, του *E. faecium*. Η ακριβής ταυτοποίηση των υπολοίπων ειδών από τα περισσότερα συστήματα βασίζεται σε πρόσθετες δοκιμασίες, αν και βελτιώσεις έχουν παρατηρηθεί με ανανεωμένες μορφές και τράπεζες δεδομένων. Τα εμπορικά συστήματα που είναι διαθέσιμα για ταυτοποίηση εντεροκοκκικών ειδών εμπερικλείουν τα συστήματα API 20S και API Rapid ID32 STREP (bioMerieux, Hazelwood, Mo.), τα Crystal Gram-Positive και Crystal Rapid Gram-Positive συστήματα ταυτοποίησης (Beckton Dickinson Microbiology Systems), τη Gram-Positive κάρτα ταυτοποίησης του συστήματος Vitek (bioMerieux) και τον Gram-Positive πίνακα ταυτοποίησης του συστήματος MicroScan Walk Away (Dade MicroScan, West Sacramento, California). Η ακρίβεια της ταυτοποίησης από μερικά από αυτά τα συστήματα σε σύγκριση με την ταυτοποίηση μέσω μοριακών μεθόδων αξιολογήθηκε το 2001 (Angeletti S *et al*, 2001).

1.4.3 Τυποποίηση με Μοριακές Μεθόδους

Μοριακές μέθοδοι όπως υβριδισμός DNA-DNA και αλληλούχιση των γονιδίων 16S rRNA έχουν χρησιμοποιηθεί αρχικά για ταξινομικούς σκοπούς σε συγκεκριμένα εργαστήρια. Τα τελευταία 20 χρόνια, όμως, η εφαρμογή μοριακών τεχνικών για την τυποποίηση των ειδών εντεροκόκκου έχει επεκταθεί. Το εύρος των μοριακών μεθόδων που έχουν προταθεί για την τυποποίηση των εντεροκοκκικών ειδών αναλύθηκε και συνοψίστηκε από τον Facklam το 2002 (Facklam RR *et al*, 2002). Στις μεθόδους αυτές ιδιαίτερη βοήθεια παρασχέθηκε από τη χρήση προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών για την ανάλυση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η αλληλούχιση του γονιδιώματος έχει τελεσθεί για τα περισσότερα είδη εντεροκόκκων και οι αλληλουχίες είναι διαθέσιμες μέσω της GenBank για σκοπούς σύγκρισης.

Η αυξανόμενη καταγραφή του εντεροκόκκου ως κύριο νοσοκομειακό παθογόνο, όπως και στοιχεία που υποστηρίζουν την εξωγενή προέλευση των εντεροκοκκικών λοιμώξεων, έχει πυροδοτήσει μία επιπλέον ανάγκη για τυποποίηση των στελεχών σαν ένα μέσο περιορισμού των λοιμώξεων και την εκτέλεση επιδημιολογικών μελετών. Ως εκ τούτου, η διερεύνηση των νοσοκομειακών επιδημιών, μαζί με την διάδοση των εντεροκοκκικών στελεχών που φέρουν δείκτες αντιμικροβιακής αντοχής, είναι αυξημένου ενδιαφέροντος. Πρώιμες επιδημιολογικές

μελέτες των εντεροκοκκικών λοιμώξεων βασίζονταν στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και παρεμποδίζονταν από την έλλειψη απλών συστημάτων τυποποίησης, με υψηλή δυνατότητα επαναληψιμότητας και επαρκή ικανότητα διάκρισης στελεχών. Οι κλασσικές φαινοτυπικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνταν για να εξετάσουν την ποικιλότητα ανάμεσα στα στελέχη ενός εντεροκοκκικού είδους έχουν συχνά αποτύχει να διαχωρίσουν επαρκώς τους κλώνους και έχουν περιορισμένη αξία στις επιδημιολογικές μελέτες. Ωστόσο, η χρήση φαινοτυπικών μεθόδων τυποποίησης σε συνδυασμό με πιο πρόσφατες μοριακές τεχνικές μπορεί να συνεισφέρει πολύτιμες πληροφορίες (Kuhn I *et al*, 1995, Morisson D *et al*, 1999, Willey BM *et al*, 1994).

Η παρουσίαση πικύλων μοριακών τεχνικών έχει ουσιαστικά βελτιώσει την ικανότητα μας να διαχωρίσουμε τα εντεροκοκκικά στελέχη και παρέχουν διακριτική ικανότητα στις επιδημιολογικές πτυχές των λοιμώξεων από εντεροκόκκους. Αποτέλεσμα της χρήσης μεθόδων τυποποίησης με μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα, είναι ότι έχει γίνει πλέον εφικτό να αποδειχθεί ότι τα στελέχη μπορούν να αποκτηθούν εξωγενώς από άμεση ή έμμεση επαφή ανάμεσα σε ασθενείς (Livornese Jr LL *et al*, 1992, Pegues DA *et al*, 1997, Willey RJL *et al*, 2000, Woodford N *et al*, 1993, Zervos MJ *et al*, 1986).

Οι πρώτες μοριακές τεχνικές που αναπτύχθηκαν για την τυποποίηση των εντεροκόκκων ήταν η ανάλυση του πλασμιδιακού προφίλ και η ανάλυση του γενωμικού DNA σε συμβατική gel ηλεκτροφόρηση μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα (Lacoux PA *et al*, 1992, Luginbuhl LM *et al*, 1987, Quednau M *et al*, 1999, Savor C *et al*, 1998). Αυτές οι τεχνικές μπορεί να είναι χρήσιμες σε ορισμένες περιπτώσεις, αλλά μπορεί να αντιμετωπιστούν διάφορα προβλήματα κατά τη χρήση τους. Αξιοσημείωτη συνεισφορά στην ικανότητα μας να διαχωρίσουμε εντεροκοκκικά στελέχη παρείχε η χρήση τεχνικών που περιλαμβάνουν την ανάλυση του προφίλ χρωμοσωμικού DNA, μετά από πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού, με ηλεκτροφόρηση σε gel παλλόμενου πεδίου (Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) είτε με ηλεκτροφόρηση σε gel με αναστροφή του ηλεκτρικού πεδίου (Field inversion gel electrophoresis, FIGE) (Green M *et al*, 1995), ή ιδανικά με ομοιογενές ηλεκτρικό πεδίο ακινητοποιημένου περιγράμματος (Contour-clamped homogeneous electric field, CHEF) (Green M *et al*, 1995, Gordillo ME *et al*, 1993, Murray BE *et al*, 1990A, Pegues DA *et al*, 1997, Perlada DE *et al*, 1997, Plessis P *et al*, 1995) που είναι μία από τις πιο κοινά χρησιμοποιούμενες τεχνικές στις μελέτες

τυποποίησης σήμερα.

Η ηλεκτροφόρηση ενζύμων πολλαπλών τύπων (Carvahlo MGS *et al*, 1997, Tomayko JF *et al*, 1995), η τυποποίηση ριβοσωμάτων ή αλλιώς ριβοτυπία (Endtz HP *et al*, 1997, Gordillo ME *et al*, 1993, Kuhn I *et al*, 1995, Plessis P *et al*, 1995, Woodford N *et al*, 1993) και μέθοδοι τυποποίησης βασισμένες στην PCR, όπως η τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA με PCR (Randomly amplified polymorphic DNA PCR, RAPD-PCR) και η PCR που ενισχύει αλληλουχίες επαναλαμβανόμενων στοιχείων (Repetitive extragenic palindromic sequence-PCR, REP-PCR), έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την διερεύνηση της γενετικής συσχέτισης ανάμεσα σε εντεροκοκκικά είδη (Martín B *et al*, 2009, Descheemaeker P *et al*, 1997, Sherer CR *et al*, 2005). Αλληλούχιση προϊόντων PCR και ανάλυση πολυμορφισμών μήκους μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα των προϊόντων PCR έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για να εντοπιστούν και να προσδιοριστούν διαφορές ανάμεσα σε συγκεκριμένα γονίδια αντοχής στους εντεροκόκκους; ως εκ τούτου, αντιπροσωπεύουν πρόσθετα εργαλεία στην τυποποίηση ανθεκτικών στελεχών (Donabedian S *et al*, 2000, Kawalec M *et al*, 2000, Lee WG *et al*, 2001, Willems RJL *et al*, 2001). Η ανάλυση πέψεων περιορισμού με το ένζυμο *SmaI* του γενωμικού DNA με PFGE είναι ευρέως χρήσιμη για τη μελέτη εντεροκοκκικών στελεχών (Descheemaeker P *et al*, 1997, Gordillo ME *et al*, 1993, Tomayko JF *et al*, 1995, Turabelidze D *et al*, 2000). Η PFGE είναι μία από τις πιο χρήσιμες και αξιόπιστες μεθόδους τυποποίησης και θεωρείται η μέθοδος αναφοράς, ‘gold standard’, για την μοριακή επιδημιολογική ανάλυση των εντεροκοκκικών λοιμώξεων. Το 1998 η τυποποίηση αλληλουχίας πολλαπλών τύπων (multi-locus sequence typing, MLST) προτάθηκε σαν προσέγγιση βασισμένη στη νουκλεοτιδική αλληλουχία που μπορεί να εφαρμοστεί σε πολλά βακτηριακά παθογόνα, ένα εκ των οποίων και το γένος του εντεροκόκκου (Urwin R *et al*, 2003). Συγκριτικές μελέτες που έχουν γίνει για τις δύο αυτές μεθόδους αποδεικνύουν ότι τα αποτελέσματα που παράγονται από την τεχνική MLST φαίνεται να συμφωνούν με αυτά που προκύπτουν από περιοριστική πέψη του μικροβιακού γενώματος σε μεγάλα τμήματα και ηλεκτροφόρηση σε μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Bourdon N *et al*, 2011A, Nallapareddy SR *et al*, 2002).

1.5 ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Οι εντερόκοκκοι είναι συμβιωτικοί μικροοργανισμοί που δρουν σαν ευκαιριακά

παθογόνα, ειδικότερα σε ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας με σοβαρές υποκείμενες νόσους και σε άλλους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς που έχουν νοσηλευθεί για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα, που χρησιμοποιούν επεμβατική τεχνολογία και/ή λαμβάνουν αντιμικροβιακή θεραπεία ευρέως φάσματος. Πολλοί πιθανοί λοιμογόννοι παράγοντες έχουν ταυτοποιηθεί στους εντεροκόκκους, όπως αξιολογήθηκαν την τελευταία δεκαπενταετία (**Eaton TJ et al, 2001, Hancock LE et al, 2000, Huycke MM et al, 1998, Jett BD et al, 1994, Mundy LM et al, 2000, Strausbaugh LJ et al, 2000**), αλλά κανένας δεν έχει αποδειχθεί ότι έχει τη μέγιστη συμβολή στην ανθρώπινη παθογένεια. Αν και οι εντερόκοκκοι είναι αίτιο λοιμώξεων στους ανθρώπους στην κοινότητα και στο νοσοκομείο, αυτοί οι μικροοργανισμοί αρχικά εντοπίζονταν με αυξημένη συχνότητα σαν κοινές αιτίες ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων στα τέλη του 1970, αντικατοπτρίζοντας έτσι την αυξανόμενη αντοχή στους αντιμικροβιακούς παράγοντες που χρησιμοποιούνταν εκείνη την εποχή. Αποτέλεσμα αυτού είναι ότι οι εντερόκοκκοι έχουν εξελιχθεί σε μία από τις κύριες θεραπευτικές προκλήσεις όταν συνδέονται με σοβαρές ή απειλητικές για τη ζωή λοιμώξεις. Αυτή η τάση πιθανότατα θα συνεχιστεί λόγω του ότι ο συνολικός πληθυσμός γερνάει και έτσι περισσότεροι άνθρωποι γίνονται ευάλωτοι στις λοιμώξεις (**Megran DW, 1992**). Η παρουσία των εντεροκόκκων παντού, ωστόσο, απαιτεί προσοχή στην εδραίωση της κλινικής σημασίας ενός συγκεκριμένου στελέχους. Αυτό είναι ιδιαίτερος σημαντικός όσον αφορά τις αποφάσεις για τις *in vitro* δοκιμές ευαισθησίας.

Η ποικιλία των λοιμώξεων στις οποίες εμπλέκονται οι εντερόκοκκοι έχει αξιολογηθεί πλήρως και συνοψιστεί (**Murray BE, 1990B, Hancock LE et al, 2000, Strausbaugh LJ et al, 2000**). Αν και το φάσμα των λοιμώξεων έχει παραμείνει αμετάβλητο από την εκτεταμένη αναφορά της **Murray** το 1990, η επικράτηση αυτών των οργανισμών σαν νοσοκομειακά παθογόνα είναι εμφανώς αυξανόμενη. Οι εντεροκοκκικές λοιμώξεις περιλαμβάνουν λοιμώξεις της ουροποιητικής οδού, ενδοκαρδίτιδες, μολύνσεις χειρουργικών τραυμάτων, βακτηριαμίες και νεογνική σήψη (**Poh CH et al, 2006**). Στην Ευρώπη, οι μολύνσεις από εντεροκόκκους θεωρούνταν ακίνδυνες για τους ανθρώπους για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα. Ωστόσο, την τελευταία δεκαετία οι εντερόκοκκοι αναφέρονται ως η δεύτερη πιο κοινή αιτία λοιμώξεων τραυμάτων και ουροποιητικής οδού (Urinary tract infections, UTIs) και η τρίτη πιο κοινή αιτία βακτηριαμίας (**De Fátima Silva Lopes M et al, 2005, Hancock LE et al, 2000, Moellering Jr RC, 1992, Murray BE, 1990B,**

Schaberg DR et al, 1991). Οι ουρολοιμώξεις (UTIs) είναι οι πιο κοινές από τις εντεροκοκκικές λοιμώξεις (οι εντερόκοκκοι εμπλέκονται στο 10% περίπου όλων των UTIs, **Felmingham D et al, 1992**) και στο 16% των νοσοκομειακών UTIs (**Schaberg DR et al, 1991**). Η εντεροκοκκική βακτηριουρία συνήθως προκύπτει σε ασθενείς με υποκείμενες δομικές ανωμαλίες και/ή σε αυτούς που έχουν υποβληθεί σε ουρολογικούς χειρισμούς (**Moellering Jr RC, 1992**). Οι ενδοκοιλιακές και πυελικές λοιμώξεις είναι οι δεύτερες πιο συχνές λοιμώξεις που συναντώνται. Ωστόσο, καλλιέργειες από ασθενείς με περιτονίτιδα, ενδοκοιλιακά ή πυελικά αποστήματα, λοίμωξη της ουροδόχου κύστης, λοιμώξεις χειρουργηθέντων σημείων και ενδομητρίτιδας είναι συχνά πολυμικροβιακές, και ο ρόλος των εντεροκόκκων σε αυτές τις λοιμώξεις παραμένει αμφιλεγόμενος. 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 (**Health Protection Agency, 2007**). 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 (**Giraffa G, 2002**). Οι εντερόκοκκοι θεωρούνται σημαντική αιτία ενδοκαρδίτιδας και υπολογίζεται ότι ευθύνονται για το 20% των περιπτώσεων βακτηριακή ενδοκαρδίτιδας μητρικής βαλβίδας και για το 6-7% ενδοκαρδίτιδας προσθετικής βαλβίδας (**Hancock LE et al, 2000, Megrn DW, 1992**). Ενώ η ενδοκαρδίτιδα είναι μία σοβαρή εντεροκοκκική λοίμωξη, είναι πιο σπάνια από τη βακτηριαμία. Εντεροκοκκικές λοιμώξεις του αναπνευστικού ή του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως επίσης και ωτίτιδα, ιγμορίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα και ενδοφθαλμίτιδα μπορούν να προκύψουν αλλά είναι σπάνιες (**Hancock LE et al, 2000, Murray BE, 1990B, Strausbaugh LJ et al, 2000**). Υπάρχουν στοιχεία για πιθανή συμμετοχή του εντεροκόκκου, επίσης, στις οδοντιατρικές λοιμώξεις (**Sundqvist G et al, 1998**). Η κλινική αξιολόγηση των στελεχών από ορισμένα από τα προαναφερθέντα σημεία συλλογής θα πρέπει να αξιολογείται προσεκτικά πριν να παρθούν κλινικές αποφάσεις.

Ο *E. faecalis* είναι το πιο συχνό είδος εντεροκόκκων που απομονώνεται από ανθρώπινα κλινικά δείγματα, αντιπροσωπεύοντας το 80 με 90% των στελεχών, ακολουθούμενος από τον *E. faecium* που βρίσκεται στο 5 με 10% των λοιμώξεων από εντερόκοκκο (**Buschelman BJ et al, 1993, Facklam RR et al, 1989, Gordon S**

et al, 1992, Stern CS *et al*, 1994). Σε μία πρόσφατη αναφορά, η αναλογία των *E. faecalis* προς τους *E. faecium* από κλινικά δείγματα είναι 1.5:1 (Arias CA *et al*, 2010). Ενώ τα υπόλοιπα είδη εντεροκόκκων συναντώνται λιγότερο συχνά έως και σπάνια, στελέχη από πολλά από τα είδη αυτά όπως *E. gallinarium*, *E. raffinosus*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. durans*, or *E. hirae* έχουν απομονωθεί από ανθρώπινα δείγματα (Mundy LM *et al*, 2000, De Perio MA *et al*, 2006). Τα είδη *E. columbae*, *E. haemoperoxidans*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. porcinius*, *E. pseudovarium*, *E. ratti*, *E. saccharolyticus* και *E. sulfureus* δεν έχουν απομονωθεί ακόμα από ανθρώπινα δείγματα.

1.6 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η προέλευση του γένους 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. Οι *E. faecium* και *E. faecalis* είναι κοινοί στη γαστρεντερική διαδρομή, ο *E. faecium* σε παραγωγικά ζώα και οι *E. mundtii* και *E. casseliflavus* σε φυτικές πηγές (Klein G, 2003). 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 (Franz CMAP *et al*, 1999).

Μελέτες της οικολογίας και της επιδημιολογίας του εντεροκόκκου έχουν αναφέρει ότι οι *E. faecalis* και *E. faecium* απομονώνονται συχνά από τυρί, ψάρι, λουκάνικα, κομματιασμένο βόειο και χοιρινό κρέας (Foulquie-Moreno MR *et al*, 2006, Klein G, 2003). 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% (Kuhn I *et al*, 2003). 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* (Peters J *et al*, 2003).

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 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 (Kuhn I *et al*, 2003).

Τα κλινικά στελέχη εντεροκόκκου εμφανίζουν μικρότερη ποικιλομορφία συγκριτικά με εκείνα που λαμβάνονται από το περιβάλλον και από ανθρώπινες πηγές, με τον *E. faecalis* να είναι το κυρίαρχο είδος (Kuhn I *et al*, 2003). Ο λόγος αυτής της έλλειψης ποικιλομορφίας πιθανόν να συνδέεται με τους παράγοντες της παθογονικότητας που σχετίζονται με το είδος αυτό. Το γεγονός ότι ο εντεροκόκκος 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 (Mutnick AH *et al*, 2003). Οι νοσοκομειακοί ασθενείς έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες εμφάνισης εντεροκοκκικών λοιμώξεων όχι μόνο εξαιτίας της λοιμογονικότητας, αλλά και επειδή το ίδιο το νοσοκομείο είναι εστία υψηλής συγκέντρωσης εντεροκόκκων. Αυτό διευκρινίζεται από μία αναφορά του HPA της Αγγλίας, που επισημαίνει το γεγονός ότι οι εντεροκόκκοι μπορεί να μολύνουν και να επιβιώσουν γύρω από τον ασθενή για αρκετές ημέρες (Brown DFJ *et al*, 2006).

ΜΕΡΟΣ II

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ – ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ *STAPHYLOCOCCUS*II. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Staphylococcus*

II.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Οι σταφυλόκοκοι παρατηρήθηκαν και καλλιεργήθηκαν πρώτα από τους Pasteur και Koch αλλά οι πρώτες εκτεταμένες μελέτες έγιναν από τον Ogston το 1881 (**Ogston A, 1881**) και τον Rosenbach το 1884 (**Rosenbach FJ, 1884**). Το γένος σταφυλόκοκκος ονομάστηκε έτσι από τον Ogston το 1881 όταν παρατήρησε συσσωματώματα, που ο μοιάζαν με σταφύλια, από βακτήρια που εδράζονταν σε ανθρώπινα αποστήματα με πύο (**Ogston A, 1881**). Τρία χρόνια αργότερα, ο Rosenbach κατόρθωσε να απομονώσει και να μεγαλώσει αυτούς τους μικροοργανισμούς σε καθαρή καλλιέργεια. Τους έδωσε τη συγκεκριμένη ονομασία, *Staphylococcus aureus*, λόγω των αποικιών τους των οποίων το χρώμα είναι κίτρινο, σχεδόν πορτοκαλί (**Rosenbach FJ, 1884**). 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 (**Hart D, 1937**). Οι σταφυλόκοκοι επίσης προκάλεσαν ασθένειες απειλητικές για τη ζωή μετά από τραυματισμούς και θανατηφόρα πνευμονία κατά τη διάρκεια της επιδημίας γρίπης, σκοτώνοντας έτσι νέους ανθρώπους (**Bennet IL, 1954**). Έτσι στην εποχή πριν από τα αντιβιοτικά, ο *S. aureus* ήταν γνωστός σαν ένα ιδιαίτερος επικίνδυνος 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.

II.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Τα μέλη των γενών *Staphylococcus* και *Micrococcus* είναι καταλάση-θετικοί, Gram-θετικοί κόκκοι και ταξινομούνται μαζί με τα γένη *Stomatococcus* και *Planococcus*

στην οικογένεια των *Micrococcaceae* (Schleifer KH, 1986A). Ωστόσο, τα αποτελέσματα της σύνθεσης βάσεων του DNA (Seifert H *et al*, 1995), DNA-rRNA υβριδισμού (Kilpper R *et al*, 1980) και ολιγονουκλεοτιδική ανάλυση συσχέτισης αλληλουχιών του 16S rRNA (Ludwig W *et al*, 1981, Stackebrandt E *et al*, 1979, Kloos WE, 1997) υποδεικνύουν ότι τα δύο αυτά γένη δεν είναι στενά συνδεδεμένα. Το γένος, λοιπόν, του σταφυλοκόκκου συνδέεται πιο στενά με το γένος *Macrococcus* (Kloos WE *et al*, 1998), αλλά έχει επίσης σχετικά στενή σχέση με τα γένη *Bacillus*, *Brocothrix*, *Gemella*, *Listeria* και *Planococcus*. Αυτά τα είδη έχουν τοποθετηθεί, με ορισμένες επιφυλάξεις, μαζί με τους σταφυλοκόκκους και αρκετά άλλα γένη στην οικογένεια *Bacillaceae* και στην τάξη *Bacilales* (Cato EP *et al*, 1989).

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 και είναι προαιρετικά αναερόβια αλλά μεγαλώνουν καλύτερα κάτω από αερόβιες συνθήκες από ότι σε αναερόβιες. Παραδοσιακά έχουν διαχωριστεί σε κοαγκουλάση-θετικούς και κοαγκουλάση-αρνητικούς σταφυλοκόκκους. Οι κοαγκουλάση-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*
- *Staphylococcus lugdunensis*
- *Staphylococcus saprophyticus*

Επίσης, πρέπει να αναφερθεί και το είδος *Staphylococcus schleiferi* γιατί είναι σχετικά επιθετικό και μπορεί να προκαλέσει μία ποικιλία λοιμώξεων, όπως σωματικές λοιμώξεις, βακτηριαμία, ενδοκαρδίτιδα, λοιμώξεις των οστών και αποστήματα σε διάφορα όργανα.

II.3 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ – ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Τα μέλη του γένους *Staphylococcus* είναι Gram-θετικοί κόκκοι, διαμέτρου 0.5 έως 1.5 μm , που απαντώνται μοναδιαία, σε ζεύγη, σε τετράδες, σε κοντές αλυσίδες (τριών-τεσσάρων κυττάρων) και σε ακανόνιστα συμπλέγματα που ο μοιάζουν με σταφύλια. Δεν έχουν την ικανότητα της κίνησης, δεν δημιουργούν σπόρια, είναι καταλάση θετικοί και τυπικά 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 (**Methicillin Resistant *S. aureus*, MRSA**) ανήκουν σε αυτούς τους οροτύπους (**Fournier JM, 1990**).

Όταν απομονώνεται από λοιμώξεις, 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*. Είναι προαιρετικά αναερόβιοι, εκτός από τον *Staphylococcus saccharolyticus* και τον *S. aureus* subsp. *anaerobius*, που είναι αναερόβιοι και καταλάση-αρνητικοί και δεν σχηματίζουν αέρια από υδατάνθρακες. Μερικά σπάνια είδη σταφυλοκόκκων μπορεί να απαιτούν την παρουσία CO_2 ή άλλων μεταβολιτών (αιμίνη, μεναδιόνη) (**Slifkin M et al, 1971**) ή υπέρτονο μέσο ανάπτυξης (**Proctor RA et al, 1998**). Η σύνθεση των κυτταρικών λιπαρών οξέων των σταφυλοκόκκων αποτελείται κυρίως από ισο- και αντισο- $\text{C}_{15:0}$, αντισο- $\text{C}_{17:0}$, $\text{C}_{18:0}$ και $\text{C}_{20:0}$ (**Welch DF, 1991**). Το μέγεθος του γενώματος τους κυμαίνεται από 2000 έως 3000 kb (**George CG et al, 1994, Kloos WE et al, 1998, Prevost G et al, 1992**).

Ο Kohn παρουσίασε το γένος *Micrococcus* που αντιπροσωπεύει μικρά σφαιρικά βακτήρια όπως οι σταφυλόκοκκοι, οι μικρόκοκκοι και οι στρεπτόκοκκοι όπως και κάποια άλλα γκρουπ (**Cohn F, 1872**). Οι μικρόκοκκοι και οι σταφυλόκοκκοι συγγέονται μεταξύ τους για περισσότερο από ένα αιώνα, με βάση την παρόμοια σφαιρική μορφολογία τους, τα αποτελέσματα της Gram-χρώσης και τις θετικές δ οκιμασίες καταλάσης. Και τα δύο αυτά γένη ζούνε πάνω στο δέρμα θηλαστικών ζώων και μπορεί να είναι παρόντα σε ποικίλα ανθρώπινα και κτηνιατρικά κλινικά δείγματα, αν και οι μικρόκοκκοι απαντώνται πιο σπάνια από τους σταφυλοκόκκους και γενικά θεωρούνται σαπροφυτικά παρά ευκαιριακά παθογόνα. Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του '60, μπορούσε πλέον να γίνει σαφής

διάκριση ανάμεσα στους σταφυλοκόκκους και τους μικροκόκκους βασιζόμενη στη νουκλεοτιδική σύνθεση του DNA τους (Silvestri LG *et al*, 1965). Τα μέλη του γένους σταφυλόκοκκος έχουν G+C περιεκτικότητα από 30 έως 39% ενώ τα μέλη του γένους μικρόκοκκος έχουν περιεκτικότητα που κυμαίνεται από 66 έως 75%. Οι σταφυλόκοκκοι είναι οξειδάση-αρνητικοί με εξαίρεση τους *S. lentus*, *S. scuri* και *S. vitulus* (Welch DF, 1991).

Το πεπτιδογλυκανικό στρώμα των σταφυλοκόκκων είναι το κύριο μακρομόριο που απαντάται σε διαδοχικές υπομονάδες *N*-ακετυλομουραμικού οξέος και *N*-ακετυλογλυκοζαμίνης. Πενταπεπτιδικές πλευρικές αλυσίδες προσδένονται στις υπομονάδες *N*-ακετυλομουραμικού οξέος και οι αλυσίδες γλυκάνης κατόπιν διασταυρώνονται με πεπτιδικές γέφυρες ανάμεσα στις πλευρικές αλυσίδες.

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 ανοσοσφαιρινικών υποτάξεων IgG1, IgG2 και IgG4 (Karakawa WW, 1992). Η πρωτεΐνη A δεν παράγεται από κοαγκουλάση-αρνητικούς σταφυλοκόκκους.

Τα τειχοϊκά οξέα των σταφυλοκόκκων 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* (Wilkinson BJ, 1997).

Τα κυριότερα είδη που περιλαμβάνει το γένος του σταφυλοκόκκου και η ταυτοποίησή τους παρατίθενται στον **Πίνακα 2**.

Γένος	Υποχρεωτικά αερόβια	Προαιρετικά αναερόβια ή μικροαερόφιλα	Αυστηρά αναερόβια	Αλυσίδες 4 κυττάρων	Ισχυρή προσκόλληση στο άγαρ	Κινητικότητα	Ανάπτυξη σε:				Κατάλυση ⁷	Δοκιμασία Βενζιδίνης ⁸	Τροποποιημένη δοκιμασία οξείδωσης ⁹	Αναερόβιο οξύ από γλυκόζη ⁵	Αερόβιο οξύ από γλυκόζη	Ανάπτυξη σε άγαρ Schellfer-Kramer ¹¹	Αντοχή σε:			
							άγαρ με 5% NaCl	άγαρ με 6.5% NaCl	άγαρ με 12% NaCl	P άγαρ σε 18 h ⁶							Λυσοσταφίνη (200 μg/ml)	Ερυθρομικίνη (0.4μg/ml)	Βακτρακίνη (0.04 U) ¹⁰	Φουραζολιδόνη (100μg) ¹
<i>Staphylococcus</i>	-	d	-	d	+	-	+	+	d	+	+	+	-	d	+	+	-	+	+	-
<i>S. aureus subsp. anaerobius</i>	-	±	±	-	-	-	+	+	d	-	-	-	-	+	+	N	-	+	N	-
<i>S. saccharolyticus</i>	-	±	±	+	-	-	+	+	±	-	-	±	-	+	+	D	-	+	N	-
<i>S. hominis</i>	± ^x	±	-	+	-	-	+	+	±	+	+	+	-	+	+	D	-	+	+	-
<i>S. auricularis</i>	-	+	-	+	-	-	+	+	±	-	+	+	-	+	+	N	-	+	+	-
<i>S. saprophyticus</i> , <i>S. cohnii</i> <i>S. xylosus</i>	d	d	-	-	-	-	+	+	±	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>S. kloosi</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. arlettae</i>	±	±	-	-	-	-	+	+	±	d	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>S. intermedius</i>	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	±	-	+	+	-
<i>S. sciuri</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. vitulinus</i>	±	±	-	d	-	-	+	+	d	d	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-

^a Συντομογραφίες και σύμβολα: +, 90% ή περισσότερα είδη ή στελέχη είναι θετικά; ±, 90% ή περισσότερα είδη ή στελέχη είναι ασθενώς θετικά; -, 90% ή περισσότερα είδη ή στελέχη είναι αρνητικά; D, 11 έως 89% των ειδών ή των στελεχών θετικά; ND, μη προσδιορισμένα (Not Determined).

^b Η ανάπτυξη σε P άγαρ είναι κάτω από αναερόβιες συνθήκες και από 35 έως 37 °C. Θετική ανάπτυξη θεωρείται όταν ανιχνεύεται σχηματισμός αποικιών τουλάχιστον 1 mm σε διάμετρο; ±, υποδεικνύει σχηματισμό αποικιών από 0.5 έως 1 mm διάμετρο. Η ανάπτυξη σε άγαρ με αίμα βοοειδών ή προβάτων είναι λίγο μεγαλύτερη αλλά λιγότερο διαχωριστική ανάμεσα στα είδη των σταφυλοκόκκων.

^c Μερικές φορές μία ασθενής αντίδραση καταλάσης ή αντίδραση ψευδοκαταλάσης μπορεί να εντοπιστεί σε στελέχη ειδών που έχουν χαρακτηριστεί ως καταλάση-αρνητικά. Σε μερικά είδη μπορεί η ενεργότητα της καταλάσης να ενεργοποιηθεί από συμπληρωματική αιμίνη.

^d Η δοκιμασία βενζιδίνης ανιχνεύει την παρουσία κυτοχρωμάτων. Μερικά στελέχη ειδών που είναι αρνητικά στη δοκιμασία βενζιδίνης μπορούν να συνθέσουν κυτοχρώματα σε αερόβια μέσα ανάπτυξης με συμπληρωματική αιμίνη (Faller A *et al*, 1981).

^e (Schleifer KH, 1986B).

^f Πρότυπη δοκιμασία οξείδωσης-ζύμωσης (Evans JB *et al*, 1955, Schleifer KH, 1986B).

^g Η ανάπτυξη γίνεται κάτω από αερόβιες συνθήκες και από 35 έως 37 °C για 24 έως 48 h. Η θετική ανάπτυξη υποδεικνύεται από τον αριθμό των CFU σε εκλεκτικό καλλιεργητικό μέσο συγκρινόμενη με εκείνη που λαμβάνεται από μέτρηση ανάπτυξης σε άγαρ και η διάμετρος της αποικίας είναι 0.5 mm; ±, υποδεικνύει σημαντική μείωση στα CFU's στο εκλεκτικό καλλιεργητικό μέσο συγκρινόμενη με εκείνη που λαμβάνεται από μέτρηση ανάπτυξης σε άγαρ.

^h Χρησιμοποιείται δίσκος. Το θετικό υποδεικνύει αντοχή και δεν εμφανίζεται ζώνη αναστολής.

ⁱ Χρησιμοποιείται δίσκος. Το θετικό υποδεικνύει αντοχή με ζώνη αναστολής από 0 μέχρι 9 mm. Τα ευαίσθητα είδη έχουν ζώνη αναστολής από 15 έως 35 mm σε διάμετρο (Hebert GA, 1990).

Πίνακας 2 (Bannerman TL, 2003). Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των ειδών *Staphylococcus* και ορισμένα συγγενικά είδη άλλων Gram-θετικών οργανισμών.

II.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ – ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ

Τα σταφυλοκοκκικά είδη μπορούν να ταυτοποιηθούν βασιζόμενα σε μία ποικιλία συμβατικών φαινοτυπικών χαρακτήρων (Kloos WE, 1990, Kloos WE *et al*, 1995, Kloos WE *et al*, 1991). Τα πιο σημαντικά κλινικά είδη μπορούν να αναγνωριστούν χρησιμοποιώντας ποικίλα βασικά χαρακτηριστικά. Εξάλλου, τα είδη μπορούν να ταυτοποιηθούν βάση των μοριακών φαινοτυπικών τους ιδιοτήτων όπως τα κυτταρικά λιπαρά οξέα (Kotilainen P *et al*, 1991), την ηλεκτροφόρηση πολλαπλών ενζυμικών τόπων (Zimmerman RJ *et al*, 1976) και πολυπεπτιδίων ολικών-κυττάρων (Clink J *et al*, 1987) και γενοτυπικών ιδιοτήτων όπως τμήματα περιορισμού χρωμοσωμάτων (Bialkowska-Hobrzanska H *et al*, 1990), πρότυπα μακροπεριορισμού (George CG *et al*, 1994), ριβοτυπίες (Webster JA *et al*, 1994), ενίσχυση περιοχών DNA (Mendoza M *et al*, 1998, Yugueros J *et al*, 2000) και αλληλούχιση του *hsp60* (Kwok AYC *et al*, 1999).

II.4.1 Ταυτοποίηση με χρήση συμβατικών μεθόδων

Σε μη εκλεκτικό αιματούχο άγαρ, θρεπτικό άγαρ, σε άγαρ πρωτοταγούς σόγιας, σε άγαρ έγχυσης εγκεφάλου-καρδιάς, ή σε Ρ άγαρ οι μεμονωμένες αποικίες των περισσότερων σταφυλοκόκκων είναι μεταξύ 1 έως 3 χιλιοστά μέσα σε 24 ώρες και 3 έως 8 χιλιοστά σε διάμετρο σε 3 μέρες επώασης σε αερόβιες συνθήκες στους 34 έως 37 °C, εξαρτώμενο από το είδος (Kloos WE *et al*, 1991). Τα είδη *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. saccharolyticus*, *S. auricularis*, *S. equorum*, *S. vitulinus* και *S. lentus* μεγαλώνουν πιο αργά από άλλους σταφυλοκόκκους και συνήθως απαιτούν 24 έως 36 ώρες για ανιχνεύσιμη ανάπτυξη αποικιών. Οι τυπικές αποικίες 24 ωρών του *S. aureus* είναι έγχρωμες, λείες, ολόκληρες, ελαφρώς κυρτές και προκαλούν αιμόλυση σε αιματούχο άγαρ ρουτίνας. Οι τυπικές αποικίες 24 ωρών των CoNS είναι άχρωμες, λείες, ολόκληρες, γυαλιστερές, ελαφρώς κυρτές και αδιαφανής. Η μορφολογία των αποικιών μπορεί να αποτελέσει ένα συμπληρωματικό χαρακτηριστικό στην ταυτοποίηση των ειδών. Για να γίνουν ορατές οι διαφορές, οι απομονωμένες αποικίες πρέπει να αναπτυχθούν για πολλές ημέρες στους 34 έως 37 °C και κατόπιν να αναπτυχθούν για δύο επιπλέον ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Οι αποικίες του *S. aureus* είναι συνήθως μεγάλες (6 έως 8 χιλιοστά σε διάμετρο), λείες, ολόκληρες, ελαφρώς κυρτές και ημιαδιαφανής. Σε Ρ άγαρ, γίνονται

σχεδόν διαφανείς μετά από 3 έως 5 ημέρες επώασης. Οι αποικίες των περισσότερων στελεχών έχουν χρώμα που κυμαίνεται από κρεμώδες κίτρινο μέχρι πορτοκαλί. Σπάνια στελέχη με σχετικά μεγάλες κάψουλες παράγουν αποικίες που είναι μικρότερες και πιο κυρτές από στελέχη χωρίς κάψουλες και έχουν μία γυαλιστερή, υγρή εμφάνιση. Στέλεχη *S. aureus* που παράγουν μικρές αποικίες (Small-colony variants, **SCVs**) μπορεί να απομονωθούν από ασθενείς με επίμονες ή επανεμφανιζόμενες λοιμώξεις όπως χρόνια οστεομυελίτιδα και κυστική ίνωση. Αυτές οι αποικίες έχουν το μέγεθος της κεφαλής μίας καρφίτσας, και είναι μη αιμολυτικές και άχρωμες. Συνήθως, η φυσιολογική ανάπτυξη μπορεί να επανέλθει αν το στέλεχος επιτραπεί να μεγαλώσει παρουσία μενοδιόνης, αιμίνης ή/και συμπληρωματικού CO₂ (**Proctor RA et al, 1995, Von Eiff C et al, 2000**). Οι αποικίες του *S. epidermidis* είναι σχετικά μικρές και κυμαίνονται σε διάμετρο από 2.5 έως 6 χιλιοστά, ανάλογα με το στέλεχος. Δεν ανιχνεύεται συνήθως χρώμα. Μερικά από τα στελέχη που παράγουν γλοιώδες υγρό είναι εξαιρετικά κολλώδη και προσκολλώνται στην επιφάνεια του άγαρ.

Η ικανότητα να πήζει το πλάσμα συνεχίζει να είναι το πιο κοινά χρησιμοποιούμενο και γενικά αποδεκτό κριτήριο για την ταυτοποίηση των παθογόνων σταφυλοκόκκων που συσχετίζονται με οξείες λοιμώξεις όπως ο *S. aureus* στους ανθρώπους και τα ζώα και ο *S. intermedius* και ο *S. hyicus* στα ζώα. Δύο διαφορετικές δοκιμασίες κοαγκουλάσης μπορούν να εκτελεστούν: ένας δοκιμαστικός σωλήνας για ελεύθερη κοαγκουλάση και μία δοκιμασία σε αντικειμενοφόρο πλάκα για δεσμευμένη κοαγκουλάση ή παράγοντα πήξης (**Kloos WE et al, 1995**). Αν και η δοκιμασία στον δοκιμαστικό σωλήνα είναι οριστική, η δοκιμή με την αντικειμενοφόρο πλάκα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν γρήγορη τεχνική προσυμπτωματικού ελέγχου για την ταυτοποίηση του *S. aureus*. Ωστόσο, ένα 10 έως 15% των στελεχών *S. aureus* μπορεί να αποδώσουν ένα αρνητικό αποτέλεσμα. Θετικό αποτέλεσμα στην δοκιμασία κοαγκουλάσης με αντικειμενοφόρο πλάκα μπορεί να παράσχει βοήθεια στην ταυτοποίηση των νέων ειδών *S. lugdunensis* και *S. schleiferi*. Ποικιλία πλασμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στις δύο αυτές δοκιμασίες, ωστόσο, είναι εμπορικά διαθέσιμο και ιδιαίτερα ικανοποιητικό αφυδατωμένο πλάσμα κόνικλου που περιέχει EDTA, με την εξαίρεση του ανθρώπινου πλάσματος που είναι πιο ικανοποιητικό στην ταυτοποίηση των *S. lugdunensis* και *S. schleiferi*. Το ανθρώπινο πλάσμα δεν πρέπει να χρησιμοποιείται εκτός εάν έχει εξεταστεί για ικανότητα πήξης και μολυσματικούς παράγοντες.

Η δοκιμασία κοαγκουλάσης σε δοκιμαστικό σωλήνα εκτελείται καλύτερα αναμιγνύοντας 0.1 ml μιας ολονύχτιας καλλιέργειας σε ζωμό έγχυσης εγκεφάλου-καρδιάς με 0.5 ml ανασυσταμένου πλάσματος (κατα προτίμηση σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα), ακολουθούμενη από επώαση του μείγματος στους 37 °C σε ένα υδατόλουτρο για 4 ώρες και παρατήρηση του σχηματισμού θρόμβων δημιουργώντας μία κλίση 90°. Εναλλακτικά, μία μεγάλη και καλά απομονωμένη αποικία σε μη ανασταλτικό άγαρ μπορεί να μεταφερθεί σε 0.5 ml ανασυσταμένου πλάσματος και να επωαστεί, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Οποιοσδήποτε βαθμός πήξης αποτελεί θετική δοκιμασία. Ωστόσο, ένα ιξώδες ή ινώδες ίζημα δεν αποτελεί αληθινό θρόμβο και πρέπει να καταγραφεί ως αρνητικό αποτέλεσμα. Για τον *S. aureus* έχει προταθεί ολονύχτια επώαση της δοκιμασίας, γιατί ένας μικρός αριθμός στελεχών μπορεί να απαιτεί περισσότερο από 4 ώρες για να δημιουργήσει θρόμβους.

Η δοκιμασία αντικειμενοφόρου πλάκας εκτελείται κάνοντας ένα πυκνό ομοιογενές διάλυμα ανάπτυξης σε απεσταγμένο νερό, ανακινώντας το μείγμα να αποκτήσει ομοιογενή σύνθεση έτσι ώστε να αποφευχθεί η σύγχυση της συσσώρευσης με την αυτοσυγκόλληση, προσθέτοντας μία σταγόνα πλάσματος και παρατηρώντας για ενδεχόμενη συσσώρευση μέσα σε 10 δευτερόλεπτα. Η δοκιμασία αντικειμενοφόρου πλάκας είναι πολύ γρήγορη και πιο οικονομική σε σχέση με το πλάσμα που χρησιμοποιείται, από ότι η δοκιμασία δοκιμαστικού σωλήνα. Οι δοκιμασίες αντικειμενοφόρου πλάκας πρέπει να ερμηνεύονται όσο το δυνατόν γρηγορότερα γιατί μπορεί να εμφανιστούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε χρόνους αντίδρασης περισσότερο των 10 δευτερολέπτων. Επιπρόσθετα, οι αποικίες που χρησιμοποιούνται δεν πρέπει να επιλέγονται από υπόστρωμα που περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων γιατί μπορεί να εμφανιστούν φαινόμενα αυτοσυγκόλλησης και ψευδώς θετικά δείγματα. Μερικά σπάνια στελέχη *S. intermedius* μπορεί να προσφέρουν θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμασία αντικειμενοφόρου πλάκας. Εναλλακτικές μέθοδοι για τη δοκιμασία αντικειμενοφόρου πλάκας συμπεριλαμβάνουν εμπορικές δοκιμασίες αντικειμενοφόρου πλάκας αιμοσυγκόλλησης για παράγοντα πήξης και δοκιμασίες συγκόλλησης λάτεξ που εντοπίζουν τον παράγοντα πήξης και την πρωτεΐνη Α και/ή αντιγόνα επιφανείας. Οι δοκιμασίες συγκόλλησης λάτεξ συχνά έχουν μεγαλύτερη ειδικότητα και ευαισθησία από ότι οι συμβατικές δοκιμασίες αντικειμενοφόρου πλάκας για την ταυτοποίηση του *S. aureus*, αν και είναι λιγότερο αξιόπιστες για την ταυτοποίηση του *S. lugdunensis*. Λόγω των χαμηλών επιπέδων προσδεδμενής κοαγκουλάσης και

πρωτεΐνης A σε στελέχη MRSA, η ανίχνευση των MRSA με δοκιμασία γρήγορης συγκόλλησης απαιτεί την ενσωμάτωση αντισωμάτων ενάντια σε σταφυλοκοκκικούς καψιδικούς πολυσακχαρίτες. Υπάρχουν διαθέσιμες δοκιμασίες συγκόλλησης λάτεξ που ανιχνεύουν τον ορότυπο 5 και ορότυπο 8 καψιδικών πολυσακχαριτών από *S. aureus* ευαίσθητους στη μεθικιλίνη (Fournier JM *et al*, 1993), ωστόσο μπορεί να προκύψουν και ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Blake JE *et al*, 2001, Van Griethuysen A *et al*, 2001).

Η θερμοσταθερή σταφυλοκοκκική νουκλεάση (thermonuclease [TNase]) που έχει ενδο- και εξωνουκλεολιτικές ιδιότητες και μπορεί να διασπάσει DNA ή RNA, παράγεται από τα περισσότερα στελέχη των *S. aureus*, *S. schleiferi*, *S. intermedius* και *S. hyicus*. Μερικά στελέχη των *S. epidermidis*, *S. simulans* και *S. carnosus* παρουσιάζουν ασθενή δράση της TNάσης. Η TNάση μπορεί να ανιχνευθεί χρησιμοποιώντας μία διαδικασία έγχυσης μεταχρωματικού-άγαρ και μπλε άγαρ που περιέχει DNάση και τολουιδίνη (Lachica RVF *et al*, 1972). Μία δοκιμασία οροαναστολής έχει δημιουργηθεί για να γίνεται διαχωρισμός ανάμεσα στην TNάση του *S. aureus* και αυτή άλλων ειδών (Lachica RVF *et al*, 1979). Μία εμπορική δοκιμασία TNάσης με μπλε άγαρ τολουιδίνης είναι διαθέσιμη (Remel) και μπορεί να ερμηνευθεί σε 4 ώρες.

Η δραστικότητα φωσφατάσης που βασίζεται στην υδρόλυση της p-νιτροφαινυλφωσφατάσης σε Pi και p-νιτροφαινόλη με αλκαλική φωσφατάση έχει ενσωματωθεί σε πολλά από τα εμπορικά βιοχημικά συστήματα δοκιμασίας για την ταυτοποίηση σταφυλοκοκκικών ειδών. Η δραστικότητα φωσφατάσης υποδεικνύεται από την απελευθέρωση της κίτρινης p-νιτροφαινόλης από το άχρωμο υπόστρωμα. Η εταιρία Key Scientific Co. (Roundrock, Tex) π αράγει μία ταμπλέτα αλκαλικής φωσφατάσης που μπορεί να ανιχνεύσει δραστικότητα στους σταφυλοκόκκους. Στελέχη των *S. aureus*, *S. schleiferi*, *S. intermedius* και *S. hyicus* και τα περισσότερα στελέχη του *S. epidermidis* είναι θετικά στην αλκαλική φωσφατάση. Φωσφατάση-αρνητικά στελέχη *S. epidermidis* μπορούν να διαχωριστούν από το συγγενικό είδος *S. hominis* λόγω της αναερόβιας ανάπτυξης τους σε θειογλυκολικό μέσα σε 18 έως 24 ώρες ή στην αντοχή σε δισκίο 300 μονάδων πολυμυξίνης B.

Η δραστικότητα πυρρολιδονυλικής αρυλαμιδάσης μπορεί να προσδιοριστεί από την υδρόλυση της πυρογλουταμικής-β-ναφθυλαμίδης (L-pyrrolidonyl-β-naphthylamide [PYR]) σε L-πυρρολιδόνη και β-ναφθυλαμίνη, που συνδέεται με ένα παράγοντα PYR για να παραχθεί κόκκινο χρώμα. Ένα εμπορικό kit που περιέχει

ζωμό PYR και παράγοντα PYR, προτείνεται για την ταυτοποίηση των στρεπτοκόκκων και είναι χρήσιμο για να διαχωρίζει συγκεκριμένα σταφυλοκοκκικά είδη. Η παραγωγή κόκκινου χρώματος μέσα σε 2 λεπτά είναι ενδεικτική της θετικής δραστηριότητας ενώ κίτρινο, πορτοκαλί ή ροζ χρώμα θεωρείται αρνητικό αποτέλεσμα. Εναλλακτικά, τα βασικά χαρακτηριστικά της δοκιμασίας έχουν ενσωματωθεί σε ποικίλα εμπορικά βιοχημικά πάνελ δοκιμασίας για την ταυτοποίηση σταφυλοκοκκικών ειδών. Τα είδη *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* και *S. intermedius* είναι συνήθως πυρρολιδονάση-θετικά.

Ένα θετικό αποτέλεσμα δραστηριότητας της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης μπορεί να ταυτοποιήσει το είδος *S. lugdunensis* με ιδιαίτερη ακρίβεια. Η δραστηριότητα της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης μπορεί να προσδιοριστεί με μία μικρή μετατροπή της δοκιμασίας που έχει περιγραφεί από τον Moeller (**Moeller V, 1955**). Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας αυτής μπορούν να ερμηνευθούν αρχικά στις 8 ώρες που μπορεί να δοθεί θετική ταυτοποίηση του είδους *S. lugdunensis*, ενώ εκείνη την ώρα ο *S. epidermidis* παράγει ακόμα αρνητικά αποτελέσματα. Η θετική αντίδραση υποδεικνύεται από αλκαλοποίηση του μέσου, με αλλαγή στο αρχικό γκρίζο χρώμα ή ελαφρώς κίτρινο σε βιολετί. Το κίτρινο χρώμα μετά από 24 ώρες υποδεικνύει το αρνητικό αποτέλεσμα.

Συμβατικός ζωμός ουρίας ή άγαρ έχουν χρησιμοποιηθεί για να ανιχνευτεί η δραστηριότητα ουρεάσης σε σταφυλοκοκκικά είδη. Η δοκιμασία ανιχνεύει την απελευθέρωση αμμωνίας από την ουρία, που οδηγεί σε αύξηση του pH η οποία εμφανίζεται μέσω του δείκτη κόκκινης φαινόλης που αλλάζει χρώμα από κίτρινο σε κόκκινο ή κερασόχρωμο. Μικρογραφίες των δοκιμασιών ουρεάσης σε ζωμό έχουν ενσωματωθεί σε ποικίλα εμπορικά βιοχημικά πάνελ δοκιμασίας για την ταυτοποίηση σταφυλοκοκκικών ειδών. Τα είδη *S. epidermidis*, *S. intermedius* και μερικά στελέχη του *S. saprophyticus* είναι συνήθως ουρεάση θετικά.

Ανίχνευση υψηλών επιπέδων δραστηριότητας β-γαλακτοσιδάσης για τη διαφοροποίηση συγκεκριμένων σταφυλοκοκκικών ειδών μπορεί να επιτευχθεί με εμπορικά βιοχημικά πάνελ δοκιμασίας που χρησιμοποιούν 2-ναφθυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσίδη σαν υπόστρωμα. Γρήγορο μπλε BB άλας σε 2-μεθοξυαιθανόλη προστίθεται στη δοκιμασία αρκετή ώρα μετά από την περίοδο επώασης για να ανιχνευθεί ελεύθερη β-ναφθόλη που απελευθερώνεται από τη β-γαλακτοσιδάση. Η θετική δραστηριότητα υποδεικνύεται από ένα δαμασκηνί μωβ χρώμα. Με αυτή τη

δοκιμασία ο *S. intermedius* και τα περισσότερα στελέχη του *S. saprophyticus* είναι β-γαλακτοσιδάση θετικά και ο *S. schleiferi* είναι ασθενώς ή με καθυστέρηση θετικός.

Η παραγωγή ακετοΐνης από γλυκόζη ή πυροσταφυλικό είναι ένα χρήσιμο εναλλακτικό χαρακτηριστικό για το διαχωρισμό του *S. aureus* (θετική) από στελέχη των κοαγκουλάση-θετικών ειδών *S. intermedius* (αρνητική) και *S. hyicus* (αρνητική). Μία συμβατική μέθοδος με τον δοκιμαστικό σωλήνα Voges-Proskauer ή η πιο ταχεία μέθοδος με χάρτινους δίσκους των Davis και Hoyling (**Davis GHG et al, 1973**) προτείνονται για τη δοκιμασία αυτή. Η ακρίβεια της μεθόδου με τους δίσκους είναι συγκρίσιμη με αυτή της συμβατικής μεθόδου Voges-Proskauer που απαιτεί περισσότερο χρόνο επώασης. Εναλλακτικά, η παραγωγή ακετοΐνης μπορεί να προσδιοριστεί με τη χρήση των ταμπλετών της Key Scientific Products ή με μία μικρογραφία της δοκιμασίας Voges-Proskauer που βρίσκεται ενσωματωμένη σε ποικίλα εμπορικά βιοχημικά πάνελ δοκιμασίας για την ταυτοποίηση σταφυλοκοκκικών ειδών.

Μία απλή δοκιμασία έγχυσης σε δίσκο για τον υπολογισμό της ευαισθησίας στη νοβοβοκίνη και για τον διαχωρισμό του *S. saprophyticus* από άλλα κλινικά σημαντικά είδη μπορεί να εκτελεστεί με τη χρήση δίσκου νοβοβοκίνης των 5 μg είτε πάνω σε Ρ άγαρ (**Kloos WE et al, 1975**), είτε σε Mueller Hinton άγαρ (**Almeida RJ et al, 1982**), είτε σε αιματούχο άγαρ προβάτου πρωτοταγούς σόγιας (**Goldstein J et al, 1983**). Με ένα μικροβιακό ενοφθάλμισμα ισοδύναμο σε θολερότητα με 0.5 McFarland πρότυπο αδιαφάνειας και επώαση στους 35 με 37 °C για 24 ώρες, η αντοχή στη νοβοβοκίνη υποδεικνύεται από ζώνη αναστολής διαμέτρου ≤ 16 mm με οποιοδήποτε από αυτά τα θρεπτικά μέσα. Η αντοχή στη νοβοβοκίνη είναι εγγενής στον *S. saprophyticus* και σε πολλά άλλα είδη, αλλά σπάνια στα υπόλοιπα κλινικά σημαντικά είδη.

Μία απλή δοκιμασία έγχυσης σε δίσκο για τον υπολογισμό της ευαισθησίας στην πολυμυξίνη Β για να διαχωριστούν πολλά από τα κλινικά σημαντικά είδη μπορεί να γίνει με την χρήση ενός δίσκου πολυμυξίνης Β των 300 μονάδων (**Herbert GA et al, 1988**). Η δοκιμασία αυτή μπορεί να εκτελεστεί σε οποιοδήποτε από τα μέσα που προαναφέρθηκαν και στο προσδιορισμό της αντοχής στη νοβοβοκίνη. Ωστόσο, η μεγαλύτερη βάση δεδομένων έχει εξασφαλιστεί με τη χρήση του αιματούχου άγαρ προβάτου πρωτοταγούς σόγιας. Οι συνθήκες δοκιμασίας θα έπρεπε να είναι παρόμοιες με αυτές της αντοχής της νοβοβοκίνης. Το δισκίο των 5 μg νοβοβοκίνης και το δισκίο των 300 μονάδων πολυμυξίνης Β μπορούν να

χρησιμοποιηθούν στο ίδιο ενοφθαλμισμένο τρυβλίο. Η αντοχή στην πολυμυξίνη Β ορίζεται από μία ζώνη αναστολής διαμέτρου <10 mm. Τα είδη *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hyicus* και *S. chromogenes* είναι συνήθως ανθεκτικά όπως επίσης μερικά στελέχη του *S. lugdunensis* (Herbert GA, 1990).

Η παραγωγή οξέων από υδατάνθρακες μπορεί να ανιχνευθεί χρησιμοποιώντας τη μέθοδο σε τρυβλία άγαρ των Kloos και Schleifer (Kloos WE *et al*, 1975). Οι αντιδράσεις υδατανθράκων επίσης ενσωματώνονται σε ποικίλα εμπορικά βιοχημικά πάνελ δοκιμασίας για την ταυτοποίηση σταφυλοκοκκικών ειδών. Αυτά τα συστήματα χρησιμοποιούν ένα, πιο ευαίσθητο στα οξέα, δείκτη από το μωβ της βρωμοκρεσόλης ($\text{pH} \leq 5.2$) που χρησιμοποιείται στη μέθοδο με τα τρυβλία με άγαρ. Για αυτόν και άλλους λόγους, τα αποτελέσματα των συμβατικών δοκιμασιών υδατανθράκων μπορεί να είναι ελαφρώς διαφορετικά από αυτά που λαμβάνονται από τα εμπορικά πάνελ δοκιμασίας.

Η παραγωγή οξέων από μαλτόζη και σουκρόζη και η απουσία παραγωγής οξέων από τρεχαλόζη και μαννιτόλη μπορούν να διαχωρίσουν τον *S. epidermidis* από άλλα είδη ευαίσθητα στη νοβοβιοκίνη. Μερικά ασυνήθη στελέχη αυτών των ειδών παράγουν οξέα από τρεχαλόζη. Αυτά τα στελέχη μπορούν να διαχωριστούν από άλλα είδη βασιζόμενα στην δραστικότητα φωσφατάσης, στην αναερόβια ανάπτυξη σε θειογλυκολικό, στην αντοχή στην πολυμυξίνη Β, στη μορφολογία των αποικιών και στην απουσία της δραστικότητας της αποκαρβξυλάσης της ορνιθίνης και της πυρρολιδονάσης.

Παραγωγή οξέων από τρεχαλόζη, μανόζη, μαλτόζη και σακχαρόζη και απουσία παραγωγής από μανιτόλλη βοηθάνε στην ταυτοποίηση του *S. lugdunensis*. Ο *S. schleiferi* παράγει οξέα από μανόζη και ορισμένες φορές από τρεχαλόζη αλλά δεν παράγει οξέα από μανιτόλλη, μαλτόζη και σακχαρόζη. Η παραγωγή οξέων από σακχαρόζη και τυρανόζη και απουσία παραγωγής από μανόζη, ξυλόζη, σελοβιόζη, αραβινόζη και ραφινόζη μπορούν να διαχωρίσουν τον *S. saprophyticus* από άλλα νοβοβιοκίνη-ανθεκτικά είδη.

Π.4.2 Ταυτοποίηση με Εμπορικά Συστήματα

Πολλοί κατασκευαστές εμπορικών συστημάτων ταυτοποίησης και αυτοματοποιημένων μηχανημάτων έχουν δημιουργήσει προϊόντα που μπορούν να ταυτοποιήσουν ένα μεγάλο αριθμό σταφυλοκοκκικών ειδών με ακρίβεια από 70 έως > 90% με σχετική ταχύτητα και απλοϊκότητα (Kloos WE *et al*, 1994, Pfaller MA *et al*, 1988). Από την εισαγωγή τους τα συστήματα αυτά έχουν εξελιχθεί και πλέον ταυτοποιούν περισσότερα είδη. Η αξιοπιστία τους θα συνεχίσει να αυξάνει σαν αποτέλεσμα μιας συνεχώς αυξανόμενης βάσης δεδομένων και ανάπτυξη πιο ικανών να διακρίνουν δοκιμασιών. Οι *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. simulans* και *S. intermedius* μπορούν να ταυτοποιηθούν αξιόπιστα από τα περισσότερα εμπορικά συστήματα που είναι τώρα διαθέσιμα.

Τα συστήματα ταυτοποίησης που είναι τώρα διαθέσιμα είναι τα RAPIDEC Staph (ταυτοποίηση του *S. aureus*, *S. epidermidis* και *S. saprophyticus*) και API Staph (bioMérieux Vitek; Inc., Hazelwood, Mo.), το Vitek ένα εντελώς αυτοματοποιημένο μικροβιολογικό σύστημα που χρησιμοποιεί μία κάρτα ταυτοποίησης Gram-θετικών βακτηρίων (Gram Positive Identification Card, GPI Card) (bioMérieux Vitek; Inc., Hazelwood, Mo.), το πάνελ MicroScan ταυτοποίησης Gram-θετικών βακτηρίων (μπορεί να ερμηνευτεί χειροκίνητα ή με τη βοήθεια του μηχανήματος MicroScan) και το πάνελ MicroScan ταχείας ταυτοποίησης Gram-θετικών βακτηρίων (που ερμηνεύεται με τα συστήματα WalkAway, επιπρόσθετα τα πάνελ ταυτοποίησης είναι διαθέσιμα με αντιμικροβιακούς παράγοντες για δοκιμασίες ευαισθησίας) (Dade MicroScan, Inc., West Sacramento, Calif.), το σύστημα ταυτοποίησης Gram-θετικών βακτηρίων Crystal, το σύστημα ταχείας ταυτοποίησης Gram-θετικών βακτηρίων Crystal, το πάνελ Gram-θετικών βακτηρίων Pasco MIC/ID και το Phoenix ένα αυτοματοποιημένο σύστημα ταυτοποίησης (Becton Dickinson Biosciences), το GP MicroPlate πάνελ δοκιμασίας (ερμηνεύεται χειροκίνητα χρησιμοποιώντας το σύστημα Biolog MicroLog ή αυτόματα με το σύστημα Biolog MicroStation) (Biolog, Hayward, Calif.), το μικροβιακό σύστημα ταυτοποίησης MIDI Sherlock (MIS), που αυτοματοποιεί τη μικροβιακή ταυτοποίηση συνδυάζοντας ανάλυση των λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία υψηλής-ανάλυσης με χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή (MIDI, Newark, Del.) και το σύστημα μικροβιακού χαρακτηρισμού RiboPrinter (Qualicon, Inc. Wilmington, Del.), που βασίζεται στην ανάλυση προτύπων ριβοτυπίας. Ταχεία ταυτοποίηση του είδους *S.*

aureus μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας το σύστημα ταυτοποίησης καλλιιεργειών AccuProbe για τον *S. aureus* (Gen-Probe, Inc., San Diego, Calif.). Η δοκιμασία αυτή είναι ένας ιχνηθέτης DNA που συνδέεται άμεσα με το rRNA και είναι αυξημένης ακρίβειας ($\geq 95\%$ ειδικότητα) (Allaouchiche B *et al*, 1996).

Π.4.3 Επιδημιολογική Τυποποίηση με Μοριακές Μεθόδους

Η τυποποίηση στελεχών μπορεί να επιτευχθεί με μία ποικιλία μεθόδων συμπεριλαμβανομένης της εξέτασης των φαινοτυπικών και γενοτυπικών χαρακτηριστικών. Οι περισσότερες δοκιμασίες απαιτούν ειδικά θρεπτικά μέσα, τεχνικές και/ή εξοπλισμό και θα γίνονταν καλύτερα σε ένα εργαστήριο αναφοράς.

Τα περισσότερα είδη σταφυλοκόκκων φέρουν ποικιλία διαφορετικών πλασμιδίων (Kloos WE *et al*, 1981). Συνεπώς, η πλασμιδιακή σύνθεση ενός στελέχους μπορεί να χρησιμεύσει ως πολύτιμο όργανο τυποποίησης στελεχών. Στα περισσότερα σταφυλοκοκκικά είδη υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στο πρότυπο αντιμικροβιακής αντοχής και στην παρουσία συγκεκριμένων πλασμιδίων που φέρουν γονίδια αντοχής. Εν προκειμένω, η πλασμιδιακή σύνθεση δεν είναι απολύτως ανεξάρτητη από το αντιβιογράμμα. Για πλασμίδια με ίδιο μέγεθος, η ανάλυση θραυσμάτων με ενδονουκλεάσες περιορισμού μπορεί να μας παρέχει συμπληρωματικές πληροφορίες για τον προσδιορισμό της ταυτότητας. Τέτοιου είδους πλασμίδια είναι διαφορετικά αν τα πρότυπα των θραυσμάτων τους είναι διαφορετικά σε μέγεθος. Δυστυχώς, ορισμένα κοινά πλασμίδια είναι υψηλά συντηρημένα (για παράδειγμα μικρά πλασμίδια με αντοχή στην τετρακυκλίνη [*tetK*] ή μικρά πλασμίδια με αντοχή στην ερυθρομυκίνη [*ermC*]) και συχνά έχουν πανομοιότυπα πρότυπα θραυσμάτων ανεξαρτήτως ποιο στέλεχος ή ποιο είδος τα φέρει. Μερικά στελέχη, επίσης, παρουσιάζουν κλωνικές διαφορές στα πλασμιδιακά προφίλ τους. Η προσθήκη ή η διαγραφή ενός ολόκληρου πλασμιδίου ή ενός θραύσματος περιορισμού μέσα σε ένα πλασμίδιο πολύ συχνά αντιπροσωπεύει αυτή την παραλλαγή, αν και παρατηρούνται ανασυνδυασμένα πλασμίδια.

Η ανάλυση του προφίλ των κυτταρικών λιπαρών οξέων μπορεί να είναι χρήσιμη σαν εργαλείο προσυμπτωματικού ελέγχου στις επιδημιολογικές μελέτες, όπως επίσης και στην χρήση του στην τυποποίηση των σταφυλοκοκκικών ειδών και υποειδών. Η ηλεκτροφορητική ανάλυση ενζύμων πολλαπλών τόπων έχει αποδειχθεί να είναι χρήσιμη στη διάκριση στελεχών *S. aureus* που έχουν απομονωθεί από

διαφορετικές πηγές. Οι μοριακές τεχνικές τυποποίησης που εξετάζουν το χρωμόσωμα, όπως η ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου του γενωμικού DNA που έχει υποστεί πέψη με *SmaI* (Bannerman TL *et al*, 1995, George CG *et al*, 1994) και η ριβοτυπία (Hadorn K *et al*, 1990, Thomson-Carter FM *et al*, 1989), έχουν επιτυχώς οριοθετήσει σταφυλοκοκκικά στελέχη. Η PFGE είναι μία από τις πιο χρήσιμες και αξιόπιστες μεθόδους τυποποίησης και θεωρείται το ‘gold standard’ για την επιδημιολογική ανάλυση των εντεροκοκκικών λοιμώξεων. Λόγω της ανάγκης για εξειδικευμένο εξοπλισμό αλλά και λόγω της έλλειψης τυποποιημένων συνθηκών ηλεκτροφόρησης και κριτήρια ερμηνείας των αποτελεσμάτων ακόμα περιορίζει την πιο εκτεταμένη εφαρμογή της τεχνικής αυτής, ειδικά για μελέτες μεγάλης χρονικής διάρκειας. Αν και θα αναμέναμε τα πρότυπα των θραυσμάτων περιορισμού να είναι σχετικά σταθερά και παρόμοια ανάμεσα στα μέλη του ίδιου κλώνου, μερική κλωνική διαφοροποίηση παρατηρείται σε συγκεκριμένα στελέχη σε σχέση με τον αριθμό και μέγεθος των θραυσμάτων που είναι παρόντα. Η απόκτηση ή η απώλεια προφάγων, γεγονότα μετατόπισης και/ή γεγονότα ανασυνδυασμού με εξω-χρωμοσωμικό DNA μπορεί να εξηγήσει τέτοιες διαφοροποιήσεις. Η PCR χρησιμοποιείται σαν μέθοδος γρήγορου ελέγχου για επιδημιολογικές μελέτες σταφυλοκόκκων. Αλληλουχίες στόχους της αποτελούν το γονίδιο της κοαγκουλίας (Chiou CS *et al*, 2000), το γονίδιο της πρωτεΐνης A (Oliveira DC *et al*, 2001), η διαγονιδιακή περιοχή των γονιδίων 16S και 23S rRNA (Villard L *et al*, 2000), το τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (Olmos A *et al*, 2000). Επίσης δύο μέθοδοι βασισμένες στη χρήση της PCR για την τυποποίηση στελεχών σταφυλοκόκκων είναι η PCR που ενισχύει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Repetitive sequence-based PCR, rep-PCR) (Wieser M *et al*, 2000) και η ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR) (Chaeib K *et al*, 2005). Το 1998 η τυποποίηση αλληλουχίας πολλαπλών τόπων (MLST) προτάθηκε σαν προσέγγιση βασισμένη στη νουκλεοτιδική αλληλουχία που μπορεί να εφαρμοστεί σε πολλά βακτηριακά παθογόνα, ένα εκ των οποίων και το γένος του σταφυλοκόκκου (Urwin R *et al*, 2003).

II.5 ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Ο *S. aureus* είναι καλά τεκμηριωμένο ότι αποτελεί σημαντικό ανθρώπινο παθογόνο. Σαν νοσοκομειακό παθογόνο, ο *S. aureus* έχει αποτελέσει σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνητότητας. Οι πυογόνες λοιμώξεις από *S. aureus* συχνά, αν δεν αντιμετωπιστούν, μπορούν να εξαπλωθούν γρήγορα στους περιβάλλοντες ιστούς ή μέσω βακτηριαμίας και μακρινές εστίες. Μερικές από τις λοιμώξεις που προκαλούνται από τον *S. aureus* περιλαμβάνουν το δέρμα όπως δοθήνες, φλεγμονές, έλζεμα, προσώπου και μετεγχειρητικές λοιμώξεις τραυμάτων σε διάφορες τοποθεσίες. Μερικές από τις πιο σοβαρές λοιμώξεις που παράγονται από τον *S. aureus* είναι η βακτηριαμία, πνευμονία, οστεομυελίτιδα, οξεία ενδοκαρδίτιδα, μυοκαρδίτιδα, περικαρδίτιδα, μηνιγγίτιδα, χοριοαμνιονίτιδα (Negishi H *et al*, 1998) και αποστήματα των μυών, του ουρογεννητικού συστήματος, του κεντρικού νευρικού συστήματος και ποικίλων ενδοκοιλιακών οργάνων. Στελέχη του *S. aureus* που σχηματίζουν μικρές αποικίες (SCVs) είναι ένας φυσικά εμφανιζόμενος υποπληθυσμός που μεγαλώνει αργά και παράγει μικρές αποικίες σε μέσα ρουτίνας. Ο πληθυσμός αυτός του *S. aureus* είναι πιο κοινός σε πληθυσμούς ασθενών που φέρουν ασυνήθιστα επίμονες λοιμώξεις, όπως η κυστική ίνωση ή η χρόνια οστεομυελίτιδα και που είναι χρόνια εκτεθειμένοι σε αμινογλυκοσίδες και τριμεθοπρίμη-μεθοξαζόλη (Looney WJ, 2000, Proctor RA *et al*, 1998). Αν και οι λοιμώξεις από *S. aureus* σε παιδιά ή ενήλικους με κυστική ίνωση δεν επηρεάζουν σημαντικά την αναπνευστική λειτουργία (Miall LS *et al*, 2001, Thomas SR *et al*, 1998), η συνεχής χρήση ανισταφυλοκοκκικής αντιμικροβιακής θεραπείας αυξάνει τον κίνδυνο αποικισμού με *Pseudomonas aeruginosa* (Ratjen F *et al*, 2001).

Η παρουσία του *S. aureus* στα τρόφιμα μπορεί να αποτελέσει πιθανό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία αφού πολλά στελέχη *S. aureus* παράγουν εντεροτοξίνες (Downes FP *et al*, 2001). Τα πιο κοινά συμπτώματα της σταφυλοκοκκικής τροφικής δηλητηρίασης συμπεριλαμβάνουν έμετο και διάρροια, που λαμβάνουν χώρα 2 έως 4 ώρες μετά την πέψη της τοξίνης. Η ασθένεια μπορεί να είναι σχετικά ήπια (με διάρκεια μόνο λίγες ώρες), αλλά μερικές περιπτώσεις μπορεί να χρήζουν νοσοκομειακής περίθαλψης. Τροφές που συνήθως σχετίζονται με σταφυλοκοκκική τροφική δηλητηρίαση είναι το κρέας, παράγωγα του κρέατος, σαλάτες, είδη αρτοποιίας με γέμιση κρέμας και γαλακτοκομικά προϊόντα.

Το σύνδρομο τοξικού σοκ (Toxic shock syndrome, TSS), μία εξωνοσοκομειακή ασθένεια, έχει επίσης αποδοθεί σε λοίμωξη ή αποικισμό από *S. aureus*. Ένας συγκεκριμένος κλώνος έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί την πλειοψηφία των περιπτώσεων (Musser JM *et al*, 1990). Το TSS ήταν επικρατές σε νέες γυναίκες κατά τη διάρκεια της έμμηνου ρύσης που χρησιμοποιούσαν ένα συγκεκριμένο τύπο υψηλά απορροφητικών ταμπόν (Tierno Jr PM *et al*, 1989). Το TSS συσχετίζεται με στελέχη που παράγουν και εκκρίνουν την εξοτοξίνη 1 συνδρόμου τοξικού σοκ (TSST-1) (Schlievert PM *et al*, 1981). Η TSST-1 είναι μέλος της οικογένειας υπεραντιγόνων η οποία έχει την ικανότητα να διεγείρει τα T κύτταρα (Choi Y *et al*, 1989) και επάγει τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (Parsonnet J *et al*, 1988) και την κυτοκίνη ιντερλευκίνη-1 (Parsonnet J *et al*, 1985). Οι μέθοδοι για αναγνώριση παραγωγής της TSST-1 συμπεριλαμβάνουν τη ραδιοανοσολογική δοκιμασία, τη δοκιμασία ανοσοαπορρόφησης συνδεδεμένη με ένζυμα (Miwa K *et al*, 2000), την ανεστραμμένη παθητική συγκόλληση σε λάτεξ (Espersen F *et al*, 1988, Wieneke AA, 1988) και την PCR (Becker K *et al*, 1998, Johnson WM *et al*, 1993, Mehrotra M *et al*, 2000). Επίσης προκαλούνται λοιμώξεις από στελέχη που παράγουν αποφολιδωτική τοξίνη (Exfoliative Toxin, ET), η οποία προκαλεί το σύνδρομο του «ζεματισμένου δέρματος» (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome, SSSS), μία ασθένεια που προσβάλλει κυρίως βρέφη και χαρακτηρίζεται από την απώλεια των επιφανειακών στιβάδων του δέρματος, αφυδάτωση, και δευτερογενείς μολύνσεις (Bukowski M *et al*, 2010).

Ο μεθικιλίνη ανθεκτικός *S. aureus* (MRSA) άρχισε να εμφανίζεται τη δεκαετία του 1980 σαν μείζων κλινικό και επιδημιολογικό πρόβλημα στα νοσοκομεία. Επί του παρόντος, νοσοκομεία όλων των μεγεθών αντιμετωπίζουν πρόβλημα με τους MRSA. Συστάσεις για τη διαχείριση και τον έλεγχο των MRSA έχουν γίνει διαθέσιμες από πολλαπλούς φορείς (Halcomb EJ *et al*, 2008, Gerber SI *et al*, 2006, Cooper BS *et al*, 2004). Η ρινική μεταφορά του MRSA έχει προταθεί ως παράγοντας επικινδυνότητας για την ανάπτυξη λοιμώξεων. Στρατηγικές για την εξάλειψη της κλινικής μεταφοράς των ειδών αυτών, με επακόλουθο να μειωθούν τα ποσοστά λοίμωξης, έχει προτείνει ο Kluytmans (Kluytmans J *et al*, 1997).

Τα είδη των κοαγκουλάση-αρνητικών σταφυλοκόκκων (Coagulase-negative *Staphylococcus*, CoNS) συνιστούν μείζων συστατικό της φυσιολογικής μικροχλωρίδας των ανθρώπων. Ο ρόλος των CoNS ειδών στο να προκαλούν νοσοκομειακές λοιμώξεις έχει αναγνωριστεί και καταγραφεί τις τελευταίες τρεις

δεκαετίες, ειδικά για το είδος *S. epidermidis*. Τα ποσοστά μόλυνσης σχετίζονται με την αύξηση στη χρήση προσθετικών και μόνιμων συσκευών και τον αυξανόμενο αριθμό των ανασοκατασταλμένων ασθενών στα νοσοκομεία. Υφίσταται ανάγκη για ακριβή ταυτοποίηση των CoNS για να καταστεί δυνατή η ακριβής σκιαγράφηση της κλινικής ασθένειας που παράγεται από την βακτηριακή αυτή ομάδα και ο προσδιορισμός του αιτιολογικού παράγοντα (Beekmann SE *et al*, 2005). Ο *S. epidermidis* έχει καταγραφεί ως παθογόνο σε ποικίλες περιπτώσεις όπως βακτηριαιμία, ενδοκαρδίτιδα έμφυτης και προσθετικής βαλβίδας, λοιμώξεις χειρουργικών τραυμάτων, ουροποιητικού συστήματος, προσθετικών κλειδώσεων, εγκεφαλονωτιαίου υγρού, οφθαλμολογικές και σχετιζόμενες με ενδοαγγειακούς καθετήρες (Crossley KB *et al*, 1997, Isaacs D, 2003). Ο *S. saprophyticus* είναι σημαντικό ευκαιριακό παθογόνο στις ανθρώπινες λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, ειδικά σε νέες, σεξουαλικά ενεργές γυναίκες. Έχει προταθεί ως αίτιο μη γονοκοκκικής ουριθρίτιδας σε άνδρες ή σαν αίτιο άλλων σεξουαλικά μεταδιδόμενων ασθενειών, προστατίτιδας, λοιμώξεων τραυμάτων και σηψαιμίας. Ο *S. haemolyticus*, το δεύτερο πιο συχνά απαντούμενο είδος CoNS που σχετίζεται με ανθρώπινες λοιμώξεις, έχει ενοχοποιηθεί για ενδοκαρδίτιδα έμφυτης και προσθετικής βαλβίδας, σηψαιμία, περιτονίτιδα, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, και λοιμώξεις τραυμάτων, οστών και κλειδώσεων (Kloos WE *et al*, 1994, Rupp ME *et al*, 1994). Ο *S. lugdunensis* έχει αναφερθεί ότι αποτελεί κύρια αιτία ενδοκαρδίτιδας (Patel R *et al*, 2000). Η επιθετική φύση των λοιμώξεων αυτών, η ανάγκη για αντικατάσταση βαλβίδων και το υψηλό ποσοστό θνητότητας υποδηλώνουν ότι η γρήγορη αναγνώριση του *S. lugdunensis* είναι απαραίτητη έτσι ώστε να χορηγείται η απαραίτητη αντιμικροβιακή θεραπεία και να έχουν καλύτερη έκβαση οι ασθενείς. Ο *S. lugdunensis* έχει επίσης συσχετιστεί με αρθρίτιδα, βακτηριαιμία, λοιμώξεις καθετήρων, λοιμώξεις προσθετικών αρθρώσεων και λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος.

Άλλα είδη CoNS έχουν συσχετιστεί με πληθώρα λοιμώξεων. Για παράδειγμα τα είδη *S. capitis*, *S. caprae*, *S. saccharolyticus*, *S. simulans* και *S. warneri* εμπλέκονται σε περιστατικά ενδοκαρδίτιδας, τα είδη *S. capitis*, *S. hominis*, *S. Schleiferi*, *S. simulans* και *S. warneri* εμπλέκονται σε περιστατικά σηψαιμίας, τα είδη *S. warneri* και *S. simulans* εμπλέκονται σε περιστατικά οστεομυελίτιδας, το είδος *S. cohnii* εμπλέκεται σε περιστατικά ενδοκαρδίτιδας έμφυτης και προσθετικής βαλβίδας και πνευμονίες, τα είδη *S. cohnii*, *S. xylosum*, *S. schleiferi*, *S. hominis* και *S. caprae*

εμπλέκονται σε λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, τα είδη *S. caprae* και *S. cohnii* εμπλέκονται με περιστατικά αρθρίτιδας, τα είδη *S. schleiferi* και *S. caprae* εμπλέκονται με λοιμώξεις τραυμάτων και αρθρώσεων και περιστατικά οστεομυελίτιδας, και τα είδη *S. capitis*, *S. schleiferi* και *S. Warneri* εμπλέκονται με λοιμώξεις καθετήρων (Calvo J *et al*, 2000, Kloos WE *et al*, 1994, Rupp ME *et al*, 1994). Σε πολλές περιπτώσεις ασθενείς με λοιμώξεις που προκαλούνται από CoNS έχουν προδιάθεση για κάποια ασθένεια ή υποκείμενες νόσους που επηρεάζουν το ανοσοποιητικό τους σύστημα και έχουν επίσης χειρουργηθεί ή είχαν δεχτεί ενδοαγγειακούς χειρισμούς.

II.6 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

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 η πρόσθια ρινική κοιλότητα 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 (Mevissen-Verhage EAE *et al*, 1997, Kauffman CA *et al*, 1997). 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 (Hollis RJ *et al*, 1995). 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 (Frenay HME *et al*, 1992, Boyce JM, 1997).

Η κατάσταση φορείας είναι κλινικά σημαντική γιατί οι φορείς έχουν περισσότερες λοιμώξεις μετεγχειρητικά από αυτούς που δεν είναι φορείς. Αυτό έχει οδηγήσει στην εφαρμογή μουπιροκίνης (τοπικού αντιβιοτικού) στο ανώτερο αναπνευστικό σε μερικά κέντρα πριν από τις εγχειρήσεις ανοιχτής καρδιάς για να μειωθούν οι περιπτώσεις μετεγχειρητικών μολύνσεων των τραυμάτων (**Kluytmans JA et al, 1995**). Η διασπορά μέσω των φορέων είναι πολύ σημαντική, γιατί αυτοί 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 διασπαρθούν όταν αυτά μετακινηθούν. Μόρια σκόνης που φέρουν σταφυλοκόκκους μπορούν να μεταφερθούν για σημαντικές αποστάσεις.

II.6.1 Κοαγκουλάση-Αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι

Η υψηλή επικράτηση των κοαγκουλάση-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 κοαγκουλάση αρνητικούς σταφυλοκόκκους:

- Είναι συνήθως νοσοκομειακοί
- Ο *S. epidermidis* είναι το πιο σύνηθες κλινικά είδος
- Συσχετίζονται με εμφυτευμένες ξένες συσκευές όπως ενδοαγγειακοί καθετήρες ή προσθετικές βαλβίδες καρδιάς.

Η αξιολόγηση της νοσοκομειακής δεξαμενής κοαγκουλάση-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 (**John JF et al, 1993**), στην αξιολόγηση της μετάδοσης τους και τον προσδιορισμό των επιδημιών νοσοκομειακών λοιμώξεων, λίγα είναι γνωστά για τη νοσοκομειακή δεξαμενή των κοαγκουλάση-αρνητικών σταφυλοκόκκων, περιλαμβάνοντας τα μεθικιλίνη ανθεκτικά στελέχη. Αυτά τα στελέχη λειτουργούν ως δεξαμενή γονιδίων αντιμικροβιακής αντοχής που μπορούν να μεταφερθούν σε άλλους Gram-θετικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων στελεχών *S.aureus*. Η National Nosocomial

Infection Survey, NNIS των ΗΠΑ ανακάλυψε ότι, ανάμεσα στο 1980 και στο 1989, η εμφάνιση των κοαγκουλάση-αρνητικών σταφυλοκόκκων σαν αιτία των νοσοκομειακών βακτηριαμιών 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 κοαγκουλάση-αρνητικών σταφυλοκόκκων αυξήθηκε από 20% στο 60%. Στοιχεία από την παγκόσμια μελέτη SENTRY υποδεικνύουν ότι ανεξάρτητα από γεωγραφική προέλευση, 70-75% των κοαγκουλάση-αρνητικών σταφυλοκόκκων είναι ανθεκτικοί στη μεθικιλίνη.

Οι κοαγκουλάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (CoNS) είναι τα πιο σημαντικά παθογόνα που προκαλούν μολυσματικές ασθένειες. Οι CoNS έχουν αναφερθεί ως οι τρίτοι πιο διαδεδομένοι αιτιολογικοί παράγοντες νοσοκομειακών λοιμώξεων (Murray PR *et al*, 2003, Mayhall CG, 2004). Οι CoNS είναι σημαντικά παθογόνα και εμφανίζονται συχνά σε νοσοκομειακούς χώρους και αντιπροσωπεύουν την πλειοψηφία των νοσοκομειακών λοιμώξεων (Von Eiff C *et al*, 2001). Η λοίμωξη είναι η κύρια επιπλοκή που σχετίζεται με τη χρήση ξένων σωμάτων, όπως είναι οι καθετήρες. Βασίζόμενοι στον τύπο της συσκευής και στην περιοχή εισαγωγής της, δημιουργούνται ποικίλα σύνδρομα λοιμώξεων σε συνδυασμό με τους CoNS όπως για παράδειγμα: περιτονίτιδα, σηψαιμία, ενδοκαρδίτιδα (Heilman C *et al*, 2000). Αυτά τα βακτήρια συνήθως μολύνουν ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, όπως πρόωρα νεογνά και ασθενείς με λευχαιμία ή επάγουν άλλες κακοήθεις ασθένειες που προκαλούν ουδετεροπενία μετά από λήψη κυτοτοξικών παραγόντων (Souvenir D *et al*, 1998). Μόνο 16 κοαγκουλάση-αρνητικά είδη έχουν εντοπιστεί σε δείγματα ανθρώπινης προέλευσης. Ανάμεσα στους CoNS, ο *Staphylococcus epidermidis* αποτελεί κύρια αιτία λοιμώξεων κυρίως σε νοσοκομειακούς ασθενείς με μόνιμα ξένα σώματα και σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς (Piette A *et al*, 2009). Ο *S. epidermidis* έχει προκαλέσει σε ορισμένες περιπτώσεις βακτηριαμίες, λοιμώξεις χειρουργικών τραυμάτων (Livermore DM, 2000), κερατίτιδες, οστεομυελίτιδες, λοιμώξεις τραυμάτων, ωτίτιδες, ενοφθαλμίτιδες και λοιμώξεις ουροποιητικού συστήματος (Heilman C *et al*, 2000).

Πρόσφατα η χρήση αντιβιοτικών ευρέως φάσματος για θεραπεία λοιμώξεων οδηγούν σε CoNS βακτήρια που αυξάνουν την ανάπτυξη της αντοχής στα αντιβιοτικά. Αποτέλεσμα αυτού ήταν η ανάπτυξη μεγάλων ποσοτήτων νοσοκομειακών στελεχών CoNS που είναι ανθεκτικά σε ποικίλα αντιβιοτικά (Shubhra S *et al*, 2008) και αποδείχθηκε ότι 80 με 90% των CoNS στελεχών που

απομονώνονται από ανθρώπινα δείγματα παράγουν β-λακταμάσες (**Diekema et al, 2001**). Οι *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. hominis* και *S. saprophyticus* ανάμεσα στα CoNS είδη έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζουν ανεβασμένα επίπεδα αντοχής σε ποικιλία αντιβιοτικών (**York MK et al, 1996**). Τα περισσότερα από αυτά τα στελέχη ήταν ανθεκτικά και σε πολλούς άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες (**Diekema DJ et al, 2001**). Υπάρχει, λοιπόν, μία συσχέτιση ανάμεσα στη δραματική αύξηση των κοαγκουλάση-αρνητικών σταφυλοκόκκων σαν αιτία των νοσοκομειακών λοιμώξεων και στην αντοχή των παθογόνων αυτών σε αντιμικροβιακούς παράγοντες (**Archer GL et al, 1994**).

III. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ

III.1 ΓΕΝΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ ΣΤΑ ANTIBIOTIKA

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της επικράτησης των εντεροκόκκων σαν αιτία νοσοκομειακών λοιμώξεων είναι η συνεχώς αυξανόμενη αντοχή τους σε μεγάλο εύρος αντιμικροβιακών παραγόντων. Παρουσιάζουν ενδογενή αλλά και επίκτητη αντοχή (**Hunt CP, 1998**).

III.1.1 Ενδογενής Αντοχή

Οι εντερόκοκκοι εμφανίζουν ενδογενή αντοχή στις κεφαλοσπορίνες, τις μονοβακτάμες, τις αμινογλυκοσίδες (χαμηλά επίπεδα), την κλινδαμυκίνη και την κοτριμοξαζόλη. Η αντοχή τους στις κεφαλοσπορίνες οφείλεται στη χαμηλή συγγένειά τους με τις πενικιλίνο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (**penicillin binding proteins**, **PBPs**), που τους επιτρέπει να συνθέσουν συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος ακόμα και παρουσία των εν λόγω αντιβιοτικών (**Murray BE et al, 1990B**). Τα είδη *E. gallinarum* και *E. casseliflavus* έχουν ενδογενή αντοχή στη βανκομυκίνη (**Murray PR et al, 2003**).

Οι εντερόκοκκοι εμφανίζουν ενδογενώς χαμηλού επιπέδου αντοχή στις αμινογλυκοσίδες (**Minimum Inhibitory Concentration, MIC** 6.2 έως 50 µg/ml) που σχετίζεται με μειωμένη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος για τις αμινογλυκοσίδες, η οποία μπορεί να αυξηθεί όταν οι εντερόκοκκοι εκτεθούν σε μία β-λακτάμη (**Isenberg HD, 1992**).

III.1.2 Επίκτητη Αντοχή

Η επίκτητη αντοχή στους εντεροκόκκους μπορεί να προκύψει είτε μέσω μεταλλάξεων που συμβαίνουν στο ήδη υπάρχον DNA είτε μέσω απόκτησης πλασμιδίων ή τραπεζονίων. Έτσι, υψηλού επιπέδου αντοχή στις αμινογλυκοσίδες ($MIC \geq 2000 \mu g/ml$) προκαλείται συνήθως από παραγωγή ενζύμων και οφείλεται σε μεταφερόμενα πλασμίδια. Η υψηλή αντοχή στη γενταμικίνη συσχετίζεται με ένα διλειειτουργικό ένζυμο που φέρει δράσεις ακετυλάσης (6') και φωσφοτρανσφεράσης (2') (**Isenberg HD, 1992**) και το οποίο προκαλεί αντοχή σε όλες τις αμινογλυκοσίδες εκτός από τη στρεπτομυκίνη. Η υψηλού επιπέδου αντοχή στη στρεπτομυκίνη μπορεί να είναι ριβοσωμικά φερόμενη ή λόγω της παραγωγής αδενυλοτρανσφεράσης της στρεπτομυκίνης. Αυτά τα στελέχη παραμένουν ευαίσθητα στη γενταμικίνη.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες πεπτιδογλυκανικής σύνθεσης στους εντεροκόκκους, δύο μόρια D-Ala συνδέονται μέσω μίας λιγάσης για να σχηματίσουν το D-Ala-D-Ala, που κατόπιν προστίθεται στο UDP-N-ακετυλομουραμυλ-τριπεπτίδιο για να σχηματίσουν ένα UDP-N-ακετυλομουραμυλ-πενταπεπτίδιο. Αυτό το πενταπεπτίδιο, όταν ενσωματώνεται στη γέννηση της πεπτιδογλυκάνης (τρανσγλυκοζυλίωση), επιτρέπει τον σχηματισμό γεφυρών (τρανσπεπτιδίωση) και συνισφέρει στην ενδυνάμωση του πεπτιδογλυκανικού στρώματος (**Eliopoulos GM, 1997**). Η βανκομυκίνη προσδένεται με μεγάλη συγγένεια στο άκρο του D-Ala-D-Ala των πενταπεπτιδικών πρόδρομων μονάδων, μπλοκάροντας την πρόσδεσή τους στο αυξανόμενο πεπτιδογλυκανικό στρώμα (**Wu Z et al, 1995**). Μέχρι σήμερα 6 γονίδια έχουν σχετιστεί με την αντοχή στα γλυκοπεπτίδια στα εντεροκοκκικά είδη: *vanA* έως *vanG*.

Η αντοχή στη βανκομυκίνη στον *E. faecium* έχει συσχετιστεί με ταυτόχρονη αντοχή στην αμπικιλίνη. Η αντοχή των στελεχών *E. faecium* στην αμπικιλίνη εντοπίζεται συνήθως πριν ανιχνευθεί η αντοχή στη βανκομυκίνη. Η γενετική σύνδεση στον *E. faecium* ανάμεσα στην αμπικιλίνη, την PBP-5 και τη βανκομυκίνη (**Suppola JP et al, 1999**) μαζί με κλινικές μελέτες που έχουν δείξει την πρότερη χρήση β-λακταμών σαν κύριο προδιαθεσικό παράγοντα, υποδεικνύουν ότι αντιμικροβιακοί παράγοντες όπως οι κεφαλοσπορίνες συμβάλλουν στην εμφάνιση αντοχής στη βανκομυκίνη στον *E. faecium* (**Loeb M et al, 1999**).

III.2 ΓΕΝΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΣΤΑ ANTIBIOTIKA

Η αντοχή των σταφυλοκόκκων σε αντιμικροβιακούς παράγοντες είναι ένα συνεχώς αυξανόμενο πρόβλημα παγκοσμίως, ειδικά ανάμεσα στα νοσοκομειακά παθογόνα. Οι σταφυλόκοκκοι έχουν γίνει μία από τις πιο σημαντικές πηγές νοσοκομειακών λοιμώξεων. Οι πολυανθεκτικοί σταφυλόκοκκοι αποτελούν ένα αυξανόμενο πρόβλημα για την ανθρώπινη υγεία. Η αύξηση λοιμογόνων *S. aureus* στελεχών ανθεκτικών, και ειδικά στη μεθικιλίνη (MRSA), αποτελούν ένα σημαντικό πρόβλημα στη θεραπεία και στον περιορισμό των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων (Livermore DM, 2000, M *et al*, 2008).

Όταν η πενικιλίνη παρουσιάστηκε στην κλινική πράξη το 1944, περισσότερα από το 94% των στελεχών *S. aureus* ήταν ευαίσθητα. Πολύ σύντομα μετά την εισαγωγή της στην κλινική πράξη, μέχρι το 1950, το 50% των στελεχών *S. aureus* ήταν ανθεκτικά. Μέχρι το 1960 πολλά νοσοκομεία είχαν επιδημίες από πενικιλίνη-ανθεκτικούς *S. aureus*. Η εισαγωγή της μεθικιλίνης προκάλεσε την ανάδυση ήδη από το 1960 στελεχών *S. aureus* ανθεκτικών στη μεθικιλίνη (Livermore DM, 2000).

Η αντοχή στη μεθικιλίνη στους σταφυλοκόκκους έχει αναφερθεί ότι συσχετίζεται με την παρουσία μιας επιπρόσθετης πρωτεΐνης, της PBP2' (PBP2a), που χαρακτηρίζεται από χαμηλή συγγένεια για τα β-λακταμικά και κωδικοποιείται από το γονίδιο *mecA* (Zapum M *et al*, 2008, Choi SM *et al*, 2003, Yadegar A *et al*, 2009). Έχει παρατηρηθεί επίσης αυξανόμενη αντοχή στα γλυκοπεπτίδια, που σε λίγα στελέχη έχει συσχετιστεί με το γονίδιο *vanA* (González-Zorn B *et al*, 2003), ενώ στα περισσότερα οφείλεται στην ποσοτική σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος (VISA/GISA) (Murray PR *et al*, 2003).

Τα ένζυμα μετατροπής των αμινογλυκοσιδών (Aminoglycoside modifying enzymes, AMEs) αποτελούν βασικούς παράγοντες υπεύθυνους για την αντοχή στις αμινογλυκοσίδες στους σταφυλοκόκκους. Μέχρι τώρα, τρεις τάξεις των AMEs έχουν αναγνωριστεί: η ακετυλοτρανσφεράση (AAC), η αμινογλυκοσιδική φωσφοτρανσφεράση (APH) και η αμινογλυκοσιδική νουκλεοτιδυλτρανσφεράση (ANT) (Choi SM *et al*, 2003). Ο πιο σημαντικός μηχανισμός αντοχής στις αμινογλυκοσίδες στους σταφυλοκόκκους είναι η απενεργοποίηση των φαρμάκων με AMEs, όπως με τις αμινογλυκοσιδικές νουκλεοτιδυλτρανσφεράσες (APHs). Οι

AMEs μπορούν να είναι είτε ενδογενείς είτε να φέρονται πλασμιδιακά. Στα σταφυλοκοκκικά στελέχη η πιο κοινή AME είναι η *aac(6')/aph(2'')*. Το διλειειτουργικό αυτό ένζυμο κωδικοποιείται από το γονίδιο *aac(6')/aph(2'')*. Επίσης, το ένζυμο APH(3')-III που κωδικοποιείται από το γονίδιο *aph(3')-IIIa* και το ένζυμο ANT(4')-I που κωδικοποιείται από το γονίδιο *ant(4')-Ia*, εντοπίζονται σε σταφυλοκοκκικά στελέχη (Yadegar A *et al*, 2009, Sekiguchi J *et al*, 2004).

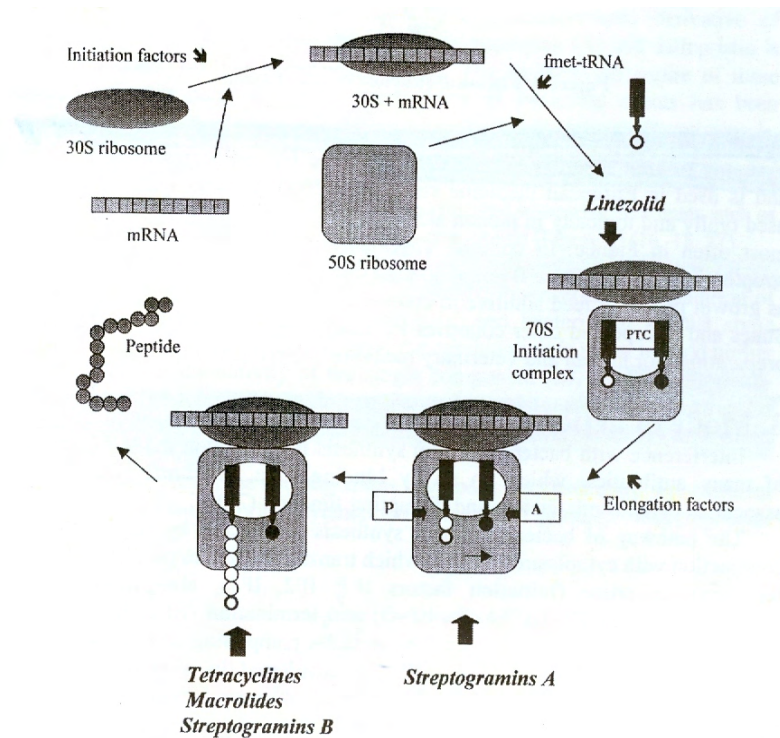
Οι σταφυλόκοκκοι εμφανίζουν επίσης αυξημένα ποσοστά αντοχής στις μακρολίδες. Οι μακρολίδες αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση. Τα πρώτα κλινικά στελέχη σταφυλοκόκκων με αντοχή στις μακρολίδες περιγράφηκαν σε αναφορές στη Γαλλία, την Αγγλία, την Ιαπωνία και τις ΗΠΑ λίγο διάστημα μετά την παρουσίαση της ερυθρομυκίνης στην κλινική πράξη το 1953. Με βάση τη βιοχημική δράση της ερυθρομυκίνης, η αντοχή στα περισσότερα στελέχη που έχει περιγραφεί μπορεί να αποδοθεί σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του 23S rRNA από μία αδενινοειδική N-μεθυλοτρανσφεράση που καθορίζεται από μία ομάδα γονιδίων που ονομάζονται *erm* γονίδια (erythromycin ribosome methylation, *erm*) και προκαλούν διασταυρούμενη αντοχή στις λινκοσαμίδες και τη στρεπτογραμίνη Β. Την τελευταία δεκαετία έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί περίπου 30 γονίδια *erm* από διάφορες πηγές, που κυμαίνονται από κλινικά παθογόνα έως ακτινομύκητες που παράγουν αντιβιοτικά (Bernard Weisblum, 1995). Άλλος μηχανισμός είναι η αντλία MsrA που επηρεάζει μόνο τις μακρολίδες (Murray PR *et al* 2007).

III.3 ΟΞΑΖΟΛΙΔΙΝΟΝΕΣ – ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

Μετά την πρώτη αναφορά ανθεκτικών στην πενικιλίνη στελεχών *S. aureus* (Spink WW *et al*, 1945), 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 (Panlilio AL *et al*, 1992, Schwalbe RS *et al*, 1987), εντεροκόκκων ανθεκτικών στα γλυκοπεπτίδια (Jones RN *et al*, 1995) και στρεπτοκόκκων *viridans* (Pfaller MA *et al*, 1998) και *Streptococcus pneumoniae* ανθεκτικών στην πενικιλίνη (Doern GV *et al*, 1998). Αυτή η αυξανόμενη αντοχή ανάμεσα στα Gram-θετικά είδη συνοδεύεται από την αυξανόμενη υπεροχή τους ως αιτίες νοσοκομειακών λοιμώξεων. Ο *S. aureus*, οι κοαγκουλάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (CoNS) και ο *Enterococcus* spp. αντιπροσωπεύουν τις 3 από τις 5

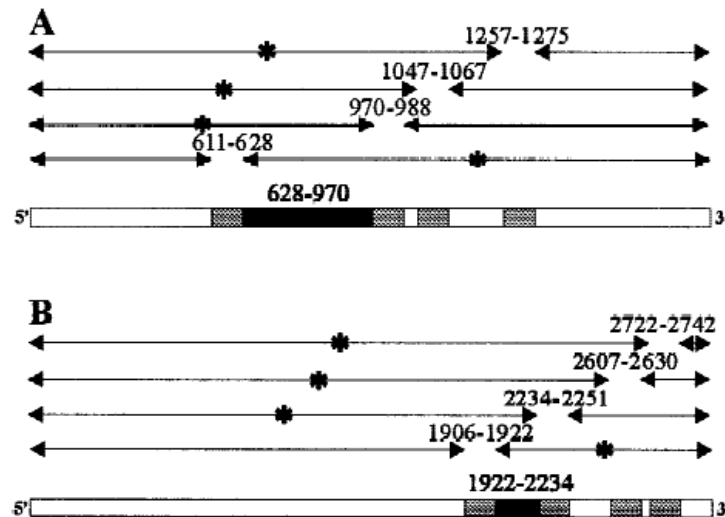
βασικές αιτίες βακτηριαμίας σε νοσηλευόμενους ασθενείς στις ΗΠΑ και τον Καναδά (**Banerjee SN *et al*, 1991, Marshall SA *et al*, 1998**). Η ευρεία εμφάνιση αντοχής στα γλυκοπεπίδια μεταξύ των *Enterococcus* spp., και ειδικά στους *E. faecium*, είναι ιδιαίτερα επικίνδυνη, μιας και μερικά στελέχη είναι ανθεκτικά σε όλους σχεδόν τους διαθέσιμους αντιμικροβιακούς παράγοντες (**Moellering RC, 1998**). Σαν αποτέλεσμα αυτού δημιουργήθηκαν νέοι αντιμικροβιακοί παράγοντες, και ορισμένοι παλιοί επαναξιολογούνται, σαν πιθανές εναλλακτικές για τη διαχείριση των λοιμώξεων εξαιτίας πολυανθεκτικών Gram-θετικών μικροοργανισμών.

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, η τάξη οξαζολιδινών, με τη λινεζολίδη σαν κύριο εκπρόσωπο. 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 (**Franceschi F *et al*, 2006, Wilson DN, 2004**). Παρόλαυτα, 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 (**Leach KL *et al*, 2007**).



Εικόνα 1 (Maniatis AN *et al*, 2006). Σχηματική αναπαράσταση πρόσδεσης και δράσης αντιβιοτικών στο ριβόσωμα.

Οι οξαζολιδινόνες έχουν προκαλέσει σημαντικό ενδιαφέρον την τελευταία δεκαετία, όμως οι πληροφορίες που σχετίζονται με το κέντρο πρόσδεσης και το πρότυπο αναστολής αυτής της τάξης φαρμάκων έχουν συχνά υπάρξει αντιφατικές. Για παράδειγμα, και η μικρή και η μεγάλη υπομονάδα έχουν συσχετιστεί με την πρόσδεση φαρμάκων, με δύο ξεχωριστές περιοχές, η L1 stalk/E περιοχή (Matassova NB *et al*, 1999) και το PTC (Lin AH *et al*, 1997), σαν στόχοι πάνω στη μεγάλη υπομονάδα.

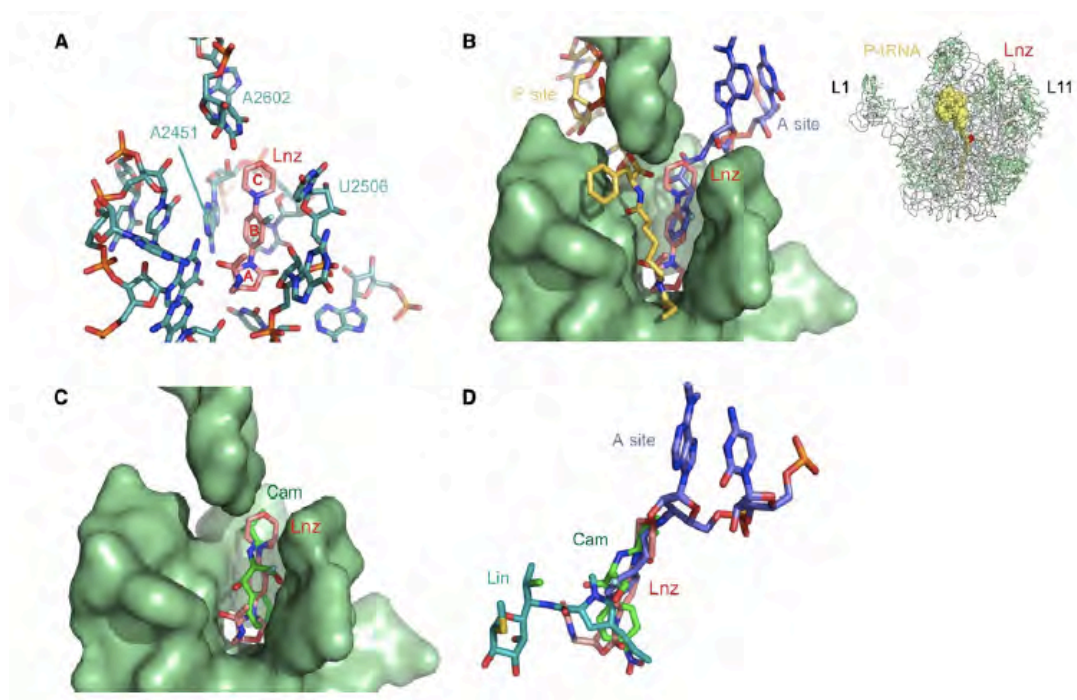


Εικόνα 2 (Matassova NB *et al*, 1999). Εντοπισμός σημείου πρόσδεσης οξαζολιδινών με πειράματα cross linking με πέψη με RNάση H, A. στο 16S, B. στο 23S. Τα oligonucleotide σημεία πρόσδεσης παρουσιάζονται με γκρι χρώμα, οι αναγνωρισμένες περιοχές πρόσδεσης της οξαζολιδινώνης με μαύρο χρώμα. Από τα δύο θραύσματα που λήφθηκαν από πέψη με RNάση H (γραμμές με βέλη), το ραδιενεργά σημασμένο τμήμα υποδεικνύεται με αστερίσκο.

Παρομοίως, οι οξαζολιδινόνες έχει προταθεί ότι αναστέλλουν μία ποικιλία από λειτουργικά στάδια του ριβοσώματος, εκτεινόμενα από την έναρξη και τη δημιουργία του πρώτου πεπτιδικού δεσμού μέχρι και την EF-G εξαρτώμενη μετακίνηση και λήξη (Colca JR *et al*, 2003, Wilson DN, 2004). Πιο συνεπής εικόνα της δράσης των οξαζολιδινών λαμβάνεται όταν εξετάζονται μεταλλάξεις στο ριβοσωμικό RNA (ribosomal RNA, rRNA) που παρέχουν αντοχή ενάντια στις οξαζολιδινόνες: όλες τους εδράζονται στην περιοχή γύρω και μέσα στο PTC (Sander P *et al*, 2002, Xiong L *et al*, 2000), δηλαδή μακριά από την περιοχή E και τον μίσχο L1. Κατά συνέπεια, οι οξαζολιδινόνες έχει αποδειχτεί ότι ανταγωνίζονται *in vitro* με τα αντιβιοτικά λινκομυκίνη και χλωραμφενικόλη όπου προσδένονται στο PTC του ριβοσώματος (Lin AH *et al*, 1997). Μια εντυπωσιακή παρουσίαση του πώς στην πραγματικότητα προσδένονται οι οξαζολιδινόνες στο PTC προέρχεται από *in vivo* πρόσδεση (crosslinking) της ¹²⁵I-σημασμένης οξαζολιδινώνης σε ριβοσώματα κυττάρων *Staphylococcus aureus* (Colca JR *et al*, 2003). Παρατηρήθηκαν σημεία πρόσδεσης (crosslinks) 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 (Qin Y *et al*, 2006). 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 (Wilson DN *et al*, 2007), το crosslink της LepA μπορεί να αντικατοπτρίζει ότι οι οξαζολιδινόνες παγιδεύουν τα λειτουργικά ριβοσώματα στην κατάσταση POST.

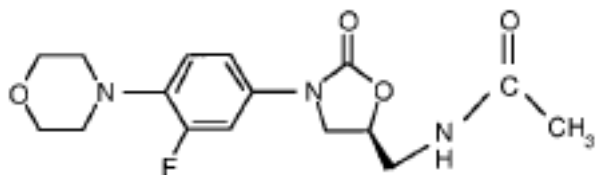
Σε ένα πρόσφατο τεύχος του Molecular Cell, ο Mankin και οι συνεργάτες του έχουν για άλλη μία φορά εφαρμόσει την *in vivo* τεχνική crosslinking για να αποσαφηνίσουν καλύτερα το σημείο πρόσδεσης των οξαζολιδινών, όχι μόνο στα βακτηριακά ριβοσώματα του *Staphylococcus aureus* αλλά επίσης και σε ευκαρυωτικά μιτοχονδριακά ριβοσώματα (Leach KL *et al*, 2007). 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 3, A). 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 3, B) και εξηγεί γιατί οι οξαζολιδινόνες ανταγωνίζονται με τα PTC-συνδεόμενα φάρμακα λινκομυκίνη και χλωραμφενικόλη (Εικόνα 3, C και D). 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 (Bashan A *et al*, 2003).



Εικόνα 3 (Wilson DN, 2007). Προσανατολισμός της λινεζολίδης στο κέντρο πεπτιδυλοτρανσφεράσης (PTC) του ριβοσώματος.

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

III.4 ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ



Εικόνα 4 (Xiong L *et al*, 2000). Δισδιάστατη δομή μορίου λινεζολίδης.

Η λινεζολίδη αποτελεί τον κύριο εκπρόσωπο της τάξης των οξαζολιδινών, μίας νέας τάξης αντιβιοτικών που παρουσιάστηκε στον χώρο της ιατρικής θεραπείας τις τρεις τελευταίες δεκαετίες. Η λινεζολίδη είναι ενεργή έναντι σε Gram-θετικά βακτήρια. Συγκεκριμένα, είναι ενεργή ενάντια και στα ευαίσθητα στη μεθικιλίνη στελέχη σταφυλοκόκκων αλλά και στα MRS στελέχη, αναστέλλοντας πρακτικά όλα τα στελέχη σε συγκεντρώσεις 4 µg/ml και λιγότερο (Noskin GA *et al*, 1999, Rybak MJ *et al*, 2000). Ο Rybak και η ομάδα του ανακάλυψαν ότι η λινεζολίδη ήταν ενεργή *in vitro* (1-2 µg/ml) ενάντια σε τρία κλινικά στελέχη *S. aureus* ενδιάμεσης αντοχής στη βανκομυκίνη. Η λινεζολίδη επίσης έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τους CoNS (με εύρος MIC 0.5-4 µg/ml), συμπεριλαμβανομένων των μεθικιλίνη ανθεκτικών στελεχών. Το προτεινόμενο όριο της MIC για τον χαρακτηρισμό της ευαισθησίας στη λινεζολίδη στους σταφυλοκόκκους είναι 4 µg/ml ή λιγότερο (Livermore DM *et al*, 2001, CLSI 2011).

Η λινεζολίδη, επίσης, αναστέλλει στελέχη εντεροκόκκων ανεξάρτητα από το πρότυπο αντοχής τους στη βανκομυκίνη σε MICs ανάμεσα στο 0.5-4 µg/ml. Το προτεινόμενο όριο στη λινεζολίδη για προσδιορισμό της ευαισθησίας στους εντεροκόκκους έχει οριστεί ως 2 µg/ml, ως ενδιάμεσης αντοχής ορίζονται τα 4 µg/ml και ανθεκτικά τα στελέχη με MIC από 8 µg/ml και άνω σύμφωνα με τα όρια ευαισθησίας που έχουν οριστεί από το Ινστιτούτο Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) (CLSI, 2011). Αν και έχουν εξεταστεί λιγότερα στελέχη, η λινεζολίδη στα 4 µg/ml και λιγότερο αναστέλλει επίσης την ανάπτυξη των *Bacillus* spp, *Corynebacterium* spp, *Listeria monocytogenes*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Leuconostoc* spp, *Pediococcus* spp και

Rodococcus equi (Zurenko GE *et al*, 1996, Jones RN *et al*, 1996, Bowersock TL *et al*, 2000). Για τη *Nocardia* spp το όριο της MIC₉₀ είναι 2-8 µg/ml (Brown-Elliott BA *et al*, 2001).

Η λινεζολίδη είναι λιγότερο ενεργή ενάντια σε Gram-αρνητικά αερόβια στελέχη. Αν και έχει κάποια *in vitro* δράση έναντι των ειδών *Mycoplasma* και *Chlamydia* spp (Moellering RC Jr, 1999), περισσότερες μελέτες είναι απαραίτητες για τον προσδιορισμό της δράσης της έναντι αυτών των κοινών άτυπων παθογόνων του αναπνευστικού. Τέτοιες πληροφορίες θα είναι απαραίτητες ώστε να εξεταστεί η δυνατότητα χρήσης της λινεζολίδης ή μελλοντικών οξαζολιδινών για τη θεραπεία πνευμονίας φερόμενης από την κοινότητα. Λίγα στοιχεία έχουν εκδοθεί που περιγράφουν τη δράση της λινεζολίδης ενάντια σε αναερόβια βακτηριακά στελέχη. Η λινεζολίδη είναι ενεργή ενάντια στο *Mycobacterium tuberculosis* (Zurenko GE *et al*, 1996, Ashtekar DR *et al*, 1991), στο σύμπλεγμα *Mycobacterium avium* (Peters J *et al*, 1995, Wu M *et al*, 1998) και στα ταχέως αναπτυσσόμενα μυκοβακτηρίδια (Wallace RJ Jr *et al*, 2001).

Όπως και με τους περισσότερους αντιμικροβιακούς παράγοντες που αναστέλλουν τη βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση, έτσι και η λινεζολίδη εμφανίζει βακτηριοστατική δράση (Slee AM *et al*, 1987, Zurenko GE *et al*, 1996, Jones RN *et al*, 1996, Mercier RC *et al*, 1997). Εξαιρέσεις βακτηριοκτόνου δράσης έχουν παρουσιαστεί σε αναφορές για τα είδη *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* και μερικά στελέχη στρεπτοκόκκων, συμπεριλαμβανομένου του είδους *S. pneumoniae* (Zurenko GE *et al*, 1996). Η προσθήκη μιας αμινογλυκοσίδης δεν επωξάνει τη βακτηριοστατική δράση της λινεζολίδης (Jones RN *et al*, 1996).

III.5 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΣΕ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΥΣ - ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΥΣ

Ένα από τα πιο σημαντικά προτερήματα της λινεζολίδης συγκριτικά με αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται σήμερα, είναι η πλήρως συνθετική φύση της. Αυτό σημαίνει ότι δεν έχει ένα φυσικό πρωτότυπο, και, λόγω των χαρακτηριστικών της, υπήρχε η άποψη ότι δεν θα αναπτυσσόταν σύντομα μικροβιακή αντοχή. Είναι ευρέως γνωστό, ότι όλοι οι αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης προέρχονται από φυσικά αντιβιοτικά μικροβιακής προέλευσης, των οποίων οι παραγωγοί δρουν σαν φυσικές δεξαμενές

γονιδίων αντοχής που μπορούν να μεταφερθούν μέσω οριζόντιας μεταβίβασης σε κλινικά παθογόνα (Toh SM *et al*, 2007).

III.5.1 Αντοχή λόγω μεταλλάξεων στην περιοχή V του 23S rRNA

Την τελευταία δεκαετία, ένας συνεχώς αυξανόμενος αριθμός στελεχών που είναι ανθεκτικά στις μακρολίδες, στις λινκοζαμίδες, στις στρεπτογραμμίνες, στις κετολίδες και στις οξαζολιδινόνες (Macrolides-Lincosamides-Ketolides-StreptoGramines-Oxazolidinones, **MLKSO**) έχουν καταγραφεί που περιέχουν μεταλλάξεις στην περιοχή V των γονιδίων 23S rRNA και/ή σε γονίδια που κωδικοποιούν τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες L3, L4 και L22 (Franceschi F *et al*, 2004). Η πλειοψηφία των ανθεκτικών στη λινεζολίδη βακτηρίων φέρουν μεταλλάξεις σε ένα από τα τέσσερα αυτά γονίδια. Αυτές οι αλλαγές που λαμβάνουν χώρα λόγω αυτών των μεταλλάξεων, έχουν περιγραφεί σε Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια και μεταβάλλουν τη λειτουργία του 23S rRNA και/ή πρωτεϊνών καταλήγοντας έτσι σε μειωμένη ευαισθησία σε ένα ή περισσότερα από τα MLSKO αντιβιοτικά (Roberts MC, 2008). Η αντοχή έχει συσχετιστεί με μεταλλάξεις στον κεντρικό βρόχο της περιοχής V. Σχεδόν όλα τα βακτήρια έχουν πολλαπλά αντίγραφα του γονιδίου 23S rRNA, που θεωρούνταν ότι θα έκανε την ανάπτυξη αντοχής σε αυτούς τους παράγοντες λιγότερο πιθανή (Prystowsky J *et al*, 2001). Η G2576T αμφιμετατροπή (βασισμένη στην αρίθμηση του γονιδίου 23S rRNA του *Escherichia coli*), είναι υπεύθυνη για την αντοχή στη λινεζολίδη στους μικροοργανισμούς *S. aureus*, CoNS, στρεπτοκόκκους της ομάδας viridans, *Enterococcus faecium* και *E. faecalis* (Vardakas KZ *et al*, 2009, Hill RL *et al*, 2010). Ο Tsiodras ανέφερε το 2001 το πρώτο κλινικό στέλεχος *S. aureus* με αντοχή στη λινεζολίδη, που περιείχε μία μετάλλαξη G2576T στην περιοχή V του γονιδίου του 23S rRNA (Tsiodras S *et al*, 2001). Σε μία επακόλουθη μελέτη, αυτό το στέλεχος βρέθηκε να έχει 5 αντίγραφα του γονιδίου αυτού, καθένα από τα οποία περιείχαν τη μετάλλαξη G2576T (Pillai SK *et al*, 2002). Ο αριθμός των μεταλλαγμένων rRNA γονιδίων εξαρτάται από τη διάρκεια έκθεσης στη λινεζολίδη και από τη δόση, και έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει το επίπεδο της αντοχής στη λινεζολίδη (Arias CA *et al*, 2008). Ο Pillai περιέγραψε μία σειρά από στελέχη MRSA αυξανόμενης αντοχής που περιείχαν αυξανόμενο αριθμό μεταλλαγμένων αντιγράφων (G2576T) του γονιδίου 23S rRNA. Σε αυτή τη μελέτη με στελέχη *S. aureus* ανθεκτικά στη λινεζολίδη που έχουν προκύψει με

εργαστηριακές τεχνικές, καταδείχθηκε ότι οι MICs αυξάνουν αναλογικά με τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου 23S rRNA που φέρουν μεταλλάξεις (**Pillai SK et al, 2002**). Αν και σε ορισμένες μελέτες έχει καταγραφεί η αντιστροφή της μετάλλαξης G2576T στην απουσία της επιλογής λόγω πίεσης λινεζολίδης (**Meka VG et al, 2004, Swoboda S et al, 2005**), μία πρόσφατη αναφορά δείχνει ότι η μετάλλαξη αυτή διατηρήθηκε σε ένα στέλεχος *Staphylococcus haemolyticus* ακόμα και ύστερα από τριάντα περάσματα σε μέσο χωρίς αντιβιοτικό (**Mazzariol A et al, 2012**).

Ο Meka ανέλυσε διαδοχικά κλινικά στελέχη *S. aureus* που μετατράπηκαν σε ανθεκτικά στη λινεζολίδη μετά από αρκετούς μήνες έκθεσης στο φάρμακο. Εντόπιστηκε για πρώτη φορά η μετάλλαξη T2500A στην περιοχή V του γονιδίου 23S rRNA, μαζί με την απώλεια ενός αντιγράφου αυτού του γονιδίου στα πιο ανθεκτικά στελέχη (**Arias CA et al, 2004, Meka VG et al, 2004**). Παρά τα στοιχεία για το κόστος προσαρμογής που συσχετίζεται με ορισμένες μεταλλάξεις στο 23S rRNA (**Besier S et al, 2008**), έχουν απομονωθεί ομόλογα μεταλλαγμένα κλινικά στελέχη στο 23S rRNA με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη των ειδών *S. aureus*, *S. epidermidis*, και *E. faecalis*. Αν και μέχρι σήμερα οι μεταλλάξεις G2576T και T2500A είναι οι πιο κοινές που εντοπίζονται σε κλινικά στελέχη, έχει αναγνωριστεί μία ποικιλία από μεταλλάξεις που προσδίδουν αντοχή στη λινεζολίδη και συμπεριλαμβάνει τις εξής μεταλλάξεις: C2192T (**Howe RA et al, 2003**), G2447T (**Swaney SM et al, 1998**), A2503G (**Livermore DM et al, 2007**), T2504A (**Liakopoulos A et al, 2009**), T2504C (**Livermore DM et al, 2007**), G2505A (**North SE et al, 2005**), G2766T (**Livermore DM et al, 2009**). Επίσης, έχουν εντοπιστεί πρόσθετες μεταλλάξεις στις θέσεις G2603T (**Lincopan N et al, 2009**) και C2534T (**Wong A et al, 2010**) σε κλινικά στελέχη με μειωμένη ευαισθησία στη λινεζολίδη, αλλά μια άμεση σχέση μεταξύ αυτών των μεταλλάξεων και της αντοχής στη λινεζολίδη είναι ασαφής.

Μεταλλάξεις που σχετίζονται με την περιοχή V του 23S rRNA γονιδίου έχουν αναφερθεί και για τους λινεζολίδη-ανθεκτικούς εντεροκόκκους (G2505A, G2512T, G2513T και C2610G), *S. aureus* (G2447T), *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmatis* και *Halobacterium halobium* (**Kloss P et al, 1999, Xiong L et al, 2000, Sander P et al, 2002**).

III.5.2 Μηχανισμός συσχετιζόμενος με τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες L3, L4 και L22

Ένας πιο σπάνιος μηχανισμός αντοχής στη λινεζολίδη εμπλέκει μεταλλάξεις στις ριβοσωμικές πρωτεΐνες L4, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *rplD*, και την L3, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *rplC*. Αυτοί οι δύο μηχανισμοί, που προηγουμένως είχαν αναγνωριστεί στους στρεπτοκόκκους, συσχετίστηκαν πρόσφατα με αντοχή στη λινεζολίδη σε σταφυλοκόκκους κλινικής προέλευσης (Locke JB *et al*, 2009A). Ο Locke και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν μία μελέτη επιλογής με στελέχη MRSA και ευαίσθητα στη μεθικιλίνη και τις οξαζολιδινόνες, λινεζολίδη και TR-700. Έλαβαν ποικίλες μεταλλάξεις του 23S rRNA όπως και μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες L3 και L4. Όπως αναφέρουν οι συγγραφείς, μελέτες κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης και ετερόλογης έκφρασης είναι απαραίτητες για να συνδεθούν άρρηκτα οι μεταλλάξεις αυτές με την αντοχή στη λινεζολίδη. Παρ'όλα αυτά, οι θέσεις των μεταλλάξεων είναι συσχετισμένες με το σημείο πρόσδεσης της λινεζολίδης σε δομή ακτίνων X και ένας πιθανός μηχανισμός δομικών διαταραχών εξηγείται, που μαζί με την έλλειψη μεταλλάξεων σε άλλες πεπτιδικές περιοχές και στην L22, υποδεικνύουν τον πιθανό ρόλο τους στην ανάπτυξη αντοχής. Οι μεταλλάξεις που έχουν μέχρι στιγμής συσχετιστεί με αντοχή στη λινεζολίδη στην πρωτεΐνη L3 είναι οι F147L, A157R (Locke JB *et al*, 2009A) και G152D (Locke JB *et al*, 2009B) και μία απάλειψη αμινοξέος στη θέση Ser145 (Locke JB *et al*, 2009A).

Μέρος της ριβοσωμικής πρωτεΐνης L4 επίσης εδράζεται σχετικά κοντά στο PTC, αλλά στο τούνελ μέσω του οποίου αρτιγενή πεπτίδια εξέρχονται από το ριβόσωμα. Τέσσερις διαφορετικές μεταλλάξεις έχουν εντοπιστεί στην πρωτεΐνη αυτή σε μία μελέτη λινεζολίδη-ανθεκτικών στελεχών *S. epidermidis*, αλλά δύο από αυτές παρευρίσκονταν σε στελέχη που έφεραν μεταλλάξεις και στο 23s rRNA. Η μετάλλαξη N158S έχει βρεθεί και σε στελέχη λινεζολίδη-ευαίσθητα *S. epidermidis* οπότε θεωρείται ότι πιθανώς αποτελεί ένα κλωνικό δείκτη παρά μία μετάλλαξη αντοχής (Wong A *et al*, 2010). Οι μεταλλάξεις που εντοπίζονται στις πρωτεΐνες L3 και L4 συνοψίζονται στον **πίνακα 3** που ακολουθεί.

III.5.3 Μηχανισμός Cfr

Ένας νέος φαινότυπος αντοχής στη χλωραμφενικόλη και την κλινδαμυκίνη έχει πρόσφατα βρεθεί ότι προκαλείται από μία RNA μεθυλοτρανσφεράση που ονομάζεται Cfr. Μία λεπτομερής ανάλυση με μελέτες footprinting του φαρμάκου και flight/tandem mass spectrometry, δείξαν ότι η Cfr προσθέτει μία επιπλέον μεθυλική ομάδα στη θέση A2503 του 23S rRNA. Εφόσον η A2503 εδράζεται κοντά στα επικαλυπτόμενα κέντρα πρόσδεσης της χλωραμφενικόλης και την κλινδαμυκίνης, συνήχθει το συμπέρασμα ότι η Cfr-μεσολαβούμενη μεθυλίωση προσδίδει αντοχή σε αυτές τις δύο τάξεις των αντιμικροβιακών παραγόντων με το να παρεμβαίνει στην τοποθέτηση των αντιβιοτικών (Kehrenberg C *et al*, 2005). Αυτό το γονίδιο σχετίζεται με αντοχή στη χλωραμφενικόλη, λινκοσαμίδες, οξαζολιδινόνες, πλευρομυτοουλίνες και στρεπτογραμίνη Α αλλά όχι στις μακρολίδες (Roberts MC, 2008).

Η Cfr πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *cfr* εντοπίστηκε σχετικά πρόσφατα σε στελέχη σταφυλοκόκκων που απομονώθηκαν από άνθρωπο (Toh S *et al*, 2009, Mendes RE *et al*, 2008). Κατά τη διάρκεια του προγράμματος LEADER 2007 ένα στέλεχος *S. aureus* ανθεκτικό στη λινεζολίδη και ένα *S. epidermidis* στάλθηκαν στα εργαστήρια JMI (North Liberty, IA) για να εξεταστούν για ευαισθησία με τη μέθοδο ζωμού μικροαραιώσης σύμφωνα με τα κριτήρια του CLSI (CLSI, 2011). Και τα δύο στελέχη ήταν ανθεκτικά στη λινεζολίδη και δεν έφεραν μεταλλάξεις στα γονίδια του 23S rRNA αλλά έφεραν θετικό αποτέλεσμα στην PCR για το γονίδιο *cfr* (Mendes RE *et al*, 2008). Οι Bongiorno *et al* το 2010 εντόπισαν σε ανθεκτικά στη λινεζολίδη κλινικά στελέχη *S. epidermidis* το γονίδιο *cfr* σε ένα πλασμίδιο μεγέθους ~ 50kb (Bongiorno D *et al*, 2010).

Γενετικός Μηχανισμός	Μεταλλάξεις	Μικροοργανισμοί
Μεταλλάξεις στην περιοχή V του γονιδίου 23S rRNA	G2576T	<i>S. aureus</i>
		CoNS
		Viridans streptococci
		Enterococci
		<i>S. cohnii</i>
	G2505A	Enterococci <i>S. aureus</i>
	G2512T	Enterococci
	G2513T	Enterococci
	C2610G	Enterococci
	G2447T	<i>S. aureus</i> (μεταλλαγμένο εργαστηριακό στέλεχος)
	T2500A	<i>S. aureus</i>
	C2192T	<i>S. aureus</i>
	G2447T	<i>S. aureus</i>
	A1743T	<i>S. pneumoniae</i>
	A2503G	<i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> (μεταλλαγμένο εργαστηριακό στέλεχος)
	C2534T	<i>S. epidermidis</i>
	T2504A	<i>S. epidermidis</i>
	T2504C	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>
	G2766T	<i>S. aureus</i>
	G2613T	<i>S. epidermidis</i>
Μεταλλάξεις στο <i>rplD</i> (πρωτεΐνη L4)*	⁶⁵ WR ₆₆ και ⁶⁸ KG ₆₉ απαλειφή	<i>S. pneumoniae</i>
	A202C, K68Q	<i>S. aureus</i> (μεταλλαγμένο εργαστηριακό στέλεχος)
	K68N, L108S, N158S αντικαταστάσεις 71GR72 and 71GGR72 εισαγωγές	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. pneumoniae</i>
Μεταλλάξεις στο <i>rplC</i> (πρωτεΐνη L3)*	G455A, G463C, A505T, Δser145	<i>S. aureus</i>
	F147L/A157R, A157R, S158F/D159Y	<i>S. epidermidis</i>
<i>cfr</i> μεθυλοτρανσφεράση	A2503	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i>

Πίνακας 3 (Stefania S *et al*, 2010, Long KS *et al*, 2012). Μηχανισμοί αντοχής στη λινεζολίδη σε Gram-θετικούς κόκκους.

*: αρίθμηση *E. coli*

III.6 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ

Επίκτητη αντοχή στη λινεζολίδη τεκμηριώθηκε πρώτη φορά το 1999 και περιελάμβανε 2 στελέχη (1.2%) από 2/169 ασθενείς που είχαν λάβει λινεζολίδη για τη θεραπεία εντεροκοκκικής λοίμωξης. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι και οι δύο ασθενείς είχαν λάβει παρατεταμένη θεραπεία λινεζολίδης για βακτηριαμία από παρουσία μόνιμων ενδοαγγειακών συσκευών (Zurenko GE *et al*, 1999). Ακολούθως,

έχουν δημοσιευθεί αρκετές αναφορές περιστατικών από σποραδικά κλινικά στελέχη *E. faecium* και *E. faecalis* που εμφανίζουν αντοχή στη λινεζολίδη. Στις περισσότερες περιπτώσεις η αντοχή συσχτίστηκε με τη χρήση λινεζολίδης (Gonzales RD *et al*, 2001, Johnson AP *et al*, 2002, Auckland C *et al*, 2002, Bassetti M *et al*, 2003, Swoboda S *et al*, 2005), αν και έχουν γίνει αναφορές γρήγορης εμφάνισης της αντοχής μετά από θεραπεία μικρής διάρκειας (Seedat J *et al*, 2006), ή και αντοχής μη εξαρτώμενης σε θεραπεία με λινεζολίδη (Jones RN *et al*, 2002, Rahim S *et al*, 2003). Αρκετά ανησυχητικές είναι αναφορές επιδημιών από στελέχη που είναι ανθεκτικά ταυτόχρονα στη λινεζολίδη και τη βανκομυκίνη (Jones RN *et al*, 2002, Rahim S *et al*, 2003).

Παρά την ευρεία χρήση της λινεζολίδης για θεραπεία νοσοκομειακών λοιμώξεων από VRE, στελέχη εντεροκόκκων ανθεκτικά στη λινεζολίδη (linezolid resistant enterococci, LRE) είναι σπάνια σε μεγάλης κλίμακας επιδημιολογικές μελέτες (Ross JE *et al*, 2007, Sader HS *et al*, 2009) συμπεριλαμβανομένων μεγάλων συλλογών VRE από την Ευρώπη (Bourdon N *et al*, 2011B). Ομοίως και στα ελληνικά νοσοκομεία, η αντοχή στη λινεζολίδη πρωτοεμφανίστηκε το 2003 (Bersos Z *et al*, 2004) και παραμένει ακόμη σπάνια σε κλινικά στελέχη *E. faecalis* and *E. faecium* (Pratti A *et al*, 2007, Protonotariou E *et al*, 2010).

Περιορισμένες μελέτες υπάρχουν επίσης σε κλινικές επιδημίες λοιμώξεων που οφείλονται σε LRE και οι διαθέσιμες αναφορές διαπραγματεύονται κλωνική διασπορά των στελεχών αυτών (Dobbs TE *et al*, 2006, Souli M *et al*, 2009). Από το Μάιο του 2004 έως και τον Ιούλιο του 2005 μελετήθηκε στην Αλαμπάμα των ΗΠΑ η πρώτη κλωνική επιδημία μεγάλης κλίμακας με 21 λινεζολίδη- και βανκομυκίνη-ανθεκτικά κλινικά στελέχη εντεροκόκκων (linezolid- and vancomycin- resistant enterococcal isolates, LRVRE), τα οποία και αποδείχθηκε ότι σχετίζονταν με νοσοκομειακή διασπορά (Dobbs TE *et al*, 2006). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι μόνο στο 15% των ασθενών αυτών είχε χορηγηθεί λινεζολίδη πριν την απομόνωση των LRVRE. Επίσης το 2005 πέντε κλινικά στελέχη αναγνωρίστηκαν ως LRVRE *E. faecium* (Souli M *et al*, 2009). Μοριακή τυποποίηση με τη χρήση της PFGE έδειξε ότι τα τέσσερα από τα πέντε αυτά στελέχη είχαν κλωνική συγγένεια. Ανάμεσα στον Σεπτέμβριο του 2005 και τον Οκτώβριο του 2006 στην πρώτη αναφορά για κλωνική επιδημία από λινεζολίδη-ανθεκτικούς *E. faecalis* στην Ισπανία, δώδεκα κλινικά στελέχη συλλέχθηκαν και χαρακτηρίστηκαν ως LRE. Τα στελέχη αυτά ήταν, επίσης, σχεδόν πανομοιότυπα μετά από σύγκριση με PFGE και με PCR επαναλαμβανόμενης

εξωγονιδιακής παλινδρομικής αλληλουχίας (repetitive extragenic palindromic sequence PCR, REP-PCR) (Gomez-Gil R *et al*, 2009). Μόλις το 2011 στην Ελλάδα δημοσιεύθηκε η πρώτη επιδημιολογική μελέτη που αναφέρει 14 LRE στελέχη (6 *E. faecium* και 8 *E. faecalis*) που λήφθηκαν από τον Ιανουάριο ως τον Απρίλιο του 2009 από νοσοκομειακούς ασθενείς σε 4 ΜΕΘ ελληνικών Νοσοκομείων. Η εξάπλωση των κλωνικών αυτών στελεχών σε μονάδες εντατικής θεραπείας ανά την Ελλάδα τονίζει τη σημασία της εφαρμογής μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων για την πρόληψη της εξάπλωσης των εν λόγω στελεχών (Spiliopoulou I *et al*, 2011).

Μελέτες επιτήρησης υποδεικνύουν ότι η αντοχή στη λινεζολίδη είναι ιδιαίτερα σπάνια σε κλινικά MRSA και CoNS. Πρόσφατα επιδημιολογικά στοιχεία υποδεικνύουν ότι η αντοχή στη λινεζολίδη εμφανίζεται σε $\leq 1\%$ των στελεχών *S. aureus* και $\leq 0.1\%$ των CoNS στις ΗΠΑ (Jones RN *et al*, 2007A, Farrell DJ *et al*, 2009). Μία μελέτη που τελέστηκε για την παρακολούθηση της εμφάνισης αντοχής στη λινεζολίδη σε στελέχη από 16 χώρες εντόπισε μόνο λίγα στελέχη CoNS και όλα έφεραν τη μετάλλαξη G2576T (Jones RN *et al*, 2007B).

Η εμφάνιση της αντοχής στη λινεζολίδη σε στελέχη *S. epidermidis* είναι ιδιαίτερα περιορισμένη σε παγκόσμιο επίπεδο. Σε μία πρόσφατη μελέτη από 22 χώρες η αντοχή στη λινεζολίδη ανιχνεύτηκε σε πολύ μικρό αριθμό στελεχών *S. epidermidis* (Biedenbach DJ *et al*, 2010). Ωστόσο, έχουν καταγραφεί ορισμένες επιδημίες από στελέχη λινεζολίδη-ανθεκτικά *S. epidermidis* (linezolid-resistant *S. epidermidis* isolates, LRSE) (Seral C *et al*, 2011, Bonilla H *et al*, 2010, Mulanovich VE *et al*, 2010, Kelly S *et al*, 2008) ενώ στην Ελλάδα έχει παρατηρηθεί διασπορά κλώνων *S. epidermidis* σε διάφορα Ελληνικά Νοσοκομεία (Liakopoulos A *et al*, 2010).

Το γονίδιο *cfr* έχει ταυτοποιηθεί σε δομικά συγγενικά πολυανθεκτικά πλασμίδια από ζωικούς σταφυλοκόκκους και μπορεί πιθανώς να μεταφερθεί ανάμεσα στους σταφυλοκόκκους. Ωστόσο, μελέτες στη Γερμανία έχουν ταυτοποιήσει μόνο 6 σταφυλοκοκκικούς κλώνους που φέρουν το γονίδιο *cfr* τα τελευταία 17 έτη (Kehrenberg C *et al*, 2006). Η αντοχή στη λινεζολίδη που προκαλείται από την παρουσία της Cfr είναι ακόμα ιδιαίτερα σπάνια, αλλά οφείλουν οι κλινικοί ιατροί να λάβουν υπόψιν τους την πιθανή διάδοση από τα ζώα στους ανθρώπους λόγω της ικανότητας της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων που συμβαίνει ανάμεσα σε σταφυλοκόκκους και εντεροκόκκους που απομόνωσαν από ζώα και ανθρώπους (Arias CA *et al*, 2008).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

I.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Η συλλογή των βακτηριακών στελεχών διεξήχθη σε δύο νοσοκομεία. Εικοσιπέντε στελέχη εντεροκόκκων προήλθαν από κλινικά δείγματα ασθενών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, το μεγαλύτερο νοσοκομείο Κεντρικής Ελλάδας με περισσότερες από 400 κλίνες (415) από τον Ιανουάριο του 2007 έως και τη ΜΕΘ του Γενικού Νοσοκομείου «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 °C σε ζωμό brain heart infusion με συμπλήρωμα 15% glycerol πριν από την περαιτέρω εξέταση τους.

I.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ – ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

Η απομόνωση των στελεχών έγινε στα κοινά στερεά θρεπτικά υλικά, όπως: Αιματούχο άγαρ και Mueller Hinton άγαρ μετά από επώαση των υλικών σε αερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 24 ώρες.

I.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

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 έλεγχος ευαισθησίας σε διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες των στελεχών έγινε αρχικά με το σύστημα αυτό.

1.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ (MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION, MIC)

1.4.1 Προσδιορισμός της 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 στιλεού 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 λεπτών 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 °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 °C μετά από 18-24 ώρες 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), όπως ορίζεται από τις οδηγίες του κατασκευαστή και τα ερμηνευτικά κριτήρια του Ινστιτούτου Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (CLSI, 2011). Τα στελέχη κατηγοριοποιήθηκαν ως ευαίσθητα και ανθεκτικά βάση των CLSI κριτηρίων. Το όριο ευαισθησίας για τους εντεροκόκκους ήταν για την βανκομυκίνη $\leq 4 \mu\text{g/ml}$, για την τεϊκοπλανίνη $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ και για τη λινεζολίδη ήταν $2 \mu\text{g/ml}$ ενώ για τους κοαγκουλάση-αρνητικούς σταφυλοκόκκους το όριο ευαισθησίας για την βανκομυκίνη ήταν $\leq 4 \mu\text{g/ml}$, για την τεϊκοπλανίνη $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ και για τη λινεζολίδη ήταν $\leq 4 \mu\text{g/ml}$, σύμφωνα με τα κριτήρια του CLSI (CLSI, 2011).

1.4.2 Προσδιορισμός της MIC στη λινεζολίδη με τη μέθοδο των αραιώσεων σε άγαρ

Σε όλα τα στελέχη σταφυλοκόκκων και εντεροκόκκων προσδιορίστηκε η MIC της λινεζολίδης με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων του αντιβιοτικού σε άγαρ σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI (CLSI, 2011). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο στέλεχος *S. aureus* ATCC 29213 για τα στελέχη σταφυλοκόκκων και το *E. faecalis* ATCC 29212 για τα στελέχη εντεροκόκκων. Μετά την παρασκευή του μητρικού διαλύματος λινεζολίδης 2 mg/ml με προτυποποιημένη καθαρή σκόνη λινεζολίδης, παρασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις τρυβλία Mueller Hinton άγαρ (Biolife) που περιείχαν υποδιπλάσιες συγκεντρώσεις λινεζολίδης από 0.25 έως 512 µg/ml. Συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν για τους σταφυλοκόκκους ήταν 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 και 512 µg/ml, ενώ για τους εντεροκόκκους μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 32, 64, 128 και 256 µg/ml. Οι συγκεντρώσεις αυτές επιλέχθηκαν, αντίστοιχα, βασιζόμενοι στα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό της MIC στη λινεζολίδη με E-test. Η ετοιμασία του ενοφθαλμίσματος των στελεχών έγινε με την εναιώρηση αποικιών από πρόσφατη καλλιέργεια 24 ωρών σε MH άγαρ, σε H₂O έως ότου επιτευχθεί πυκνότητα ισοδύναμη με της κλίμακας McFarland 0.5 McF η οποία αντιστοιχεί σε περίπου 10⁸ cfu/ml. Στα τρυβλία ενοφθαλμίστηκαν 10 µl (10⁴ cfu/spot) από εναιώρημα που περιείχε περίπου 10⁶ cfu/ml με τη βοήθεια ειδικού διανεμητή (Denley Instruments, Sussex, UK) που μεταφέρει το μικροβιακό εναιώρημα. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37 °C για 24 ώρες. Η μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν επέτρεπε την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού καθόρισε την MIC στη λινεζολίδη.

1.5 ΕΞΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ DNA

Η απομόνωση βακτηριακού DNA έγινε από τα στελέχη εντεροκόκκων και σταφυλοκόκκων ανθεκτικών στη λινεζολίδη. Μεμονωμένες αποικίες από 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 Qiampr DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA). Αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

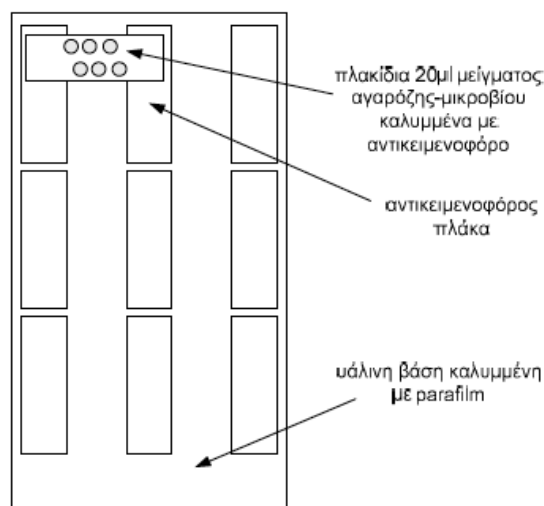
Δύο έως τρεις μεμονωμένες αποικίες εναιωρούνται σε 180 µl λυτικού διαλύματος (ATL Buffer) με ανάδευση για 15 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 20 µl Proteinase K, γίνεται ανάδευση και επώαση στους 56 °C για 2 ώρες και ενδιάμεση ανάδευση έτσι ώστε στο διάστημα αυτό επιτυγχάνεται η λύση. Μετά το τέλος της 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 °C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 200 µl απόλυτης αιθανόλης και αναδεύεται για 15 λεπτά. 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 έκπλύσεως (AE Buffer). Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, φυγοκέντρωση για 1 λεπτά στις 8000 rpm και μεταφορά σε σωληνάρια τύπου erppendorf και συντήρηση στους -20 °C μέχρι τη χρήση τους.

1.6 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΑΛΛΟΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ (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 ξεκινάει αρχικά με καλλιέργεια των στελεχών σε τρυβλία που περιέχουν Tryptic Soy άγαρ και επωάζονται στους 37 °C για 20h. Ακολουθεί ανακαλλιέργεια από μία αποικία από τα τρυβλία σε 5 ml Tryptic Soy ζωμό (Biolife) και επωάζονται στους 37 °C για 20h. Κατόπιν το διάλυμα αυτό φυγοκεντρείται στις 3500 rpm για 5 λεπτά 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 λεπτά, απορρίπτεται το υπερκείμενο και γίνεται ανασύσταση του ιζήματος σε 200 μ l PIV. Κατόπιν παρασκευάζεται διάλυμα αгарόζης 2% χαμηλού σημείου τήξεως (Low Melting Temperature Agarose, Cambrex Bio Science Rockland Inc., ME, USA) σε 10 ml ρυθμιστικό διάλυμα PIV και διατηρείται σε υδατόλουτρο στους 42 °C μαζί με τα ελαιωρημένα στελέχη για τουλάχιστον 10 λεπτά. Όγκος 100 μ l πηκτής αгарόζης αναμειγνύεται με 100 μ l δείγματος και τοποθετούνται 6-8 πλακίδια μείγματος αгарόζης-μικροβίου των 20 μ l για κάθε στέλεχος, επάνω σε γυάλινο εκμαγείο (γυάλινη πλάκα) και καλύπτονται με αντικειμενοφόρους πλάκες (**Εικόνα 5**).



Εικόνα 5. Δημιουργία πλακιδίων μείγματος αгарόζης-μικροβίου.

Τοποθετείται το εκμαγείο με τις κηλίδες στις οποίες έχει εγκλωβιστεί το μικροβιακό ελαιώρημα στους -20 °C για αυστηρά 5 λεπτά και στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. 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 μ g/ml lysozyme (Sigma-Aldrich), 50 μ g/ml RNaseA (Sigma-Aldrich) και 50 μ g/ml lysostaphin (Sigma-Aldrich) τοποθετείται η πηκτή αгарόζης με τα μικροβιακά κύτταρα και επωάζεται στους 37 °C για 20 ώρες έτσι ώστε να καταστραφεί το μικροβιακό τοίχωμα. Αφήνεται το υλικό στους 4 °C για 10 λεπτά ώστε να στερεοποιηθεί και πάλι η αгарόζη 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 mg/ml πρωτεΐνωση K (Bioline), περιεκτικότητας 40 U/mg, και τα πλακίδια επωάζονται ολονύκτια στους 60 °C ώστε να γίνει η πέψη όλων των κυτταρικών πρωτεϊνών. Αφαιρείται το διάλυμα ESP και ακολουθούν 5 διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα TE (10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, pH 8.0) ανά 20 λεπτά ώστε να αφαιρεθούν όλα τα υπολείμματα της πρωτεΐνωσης K και των πρωτεϊνικών καταλοίπων. Η αгарόζη (κηλίδα) που περιέχει τώρα μόνο το μικροβιακό DNA μπορεί να αποθηκευτεί στους 4 °C σε διάλυμα TE.

Γίνεται πέψη του DNA με το περιοριστικό ένζυμο *SmaI* (10 U/μl). Για κάθε στέλεχος χρειαζόμαστε 80 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tango 1X, που περιέχει 40 units *SmaI*. Για την πέψη του DNA απαιτείται επώαση ολονύχτια στους 30 °C. Προστίθεται σε κάθε δείγμα 10 μl 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 αгарόζη (κηλίδες) στους 4 °C για 10 λεπτά ώστε να απενεργοποιηθεί η δράση του ενζύμου. Τα κομμάτια της αгарόζης με το γενωμικό DNA τοποθετούνται και ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης (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 °C, V= 6Volts/cm, 120° switch angle, initial switch time 5 δευτερόλεπτα, final switch time 35 δευτερόλεπτα. 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 λεπτά. Η πηκτή αποπλένεται για 5 λεπτά με απεσταγμένο νερό και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία. Το ηλεκτροφόρημα παρατηρείται σε UV ακτινοβολία και τυπώνεται ψηφιακά.

Τα γενετικά αποτυπώματα των στελεχών αναλύθηκαν δια γυμνού οφθαλμού σύμφωνα με τα ερμηνευτικά κριτήρια των Tenover *et al.* (Tenover FC *et al*, 1995). 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 4** 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 4. Κριτήρια αξιολόγησης της PFGE κατά Tenover.

1.7 ΜΕΘΟΔΟΙ PCR

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 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 αλληλούχιση τους. Ανεύρεση της αλληλουχίας βάσεων των προϊόντων της PCR (DNA sequencing)
- σχεδιασμός εκκινητών που να έχουν την δυνατότητα ενίσχυσης μέρος της περιοχής V του γονιδίου 23S rRNA και περιοχές ανοδικά ή καθοδικά αυτού.

- εφαρμογή της PCR φωλιάς (semi-nested) για ενίσχυση μέρους της περιοχής V (909 bp) κάθε αντιγράφου του γονιδίου που κωδικοποιεί για το 23S rRNA ξεχωριστά, καθαρισμός των προϊόντων της PCR και αλληλούχιση τους. Ανεύρεση της αλληλουχίας βάσεων των προϊόντων της PCR (DNA sequencing).

Για τους σταφυλοκόκκους

- 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 μέρους της περιοχής V (419 bp) κάθε αντιγράφου του γονιδίου που κωδικοποιεί για το 23S rRNA ξεχωριστά, καθαρισμός των προϊόντων της PCR και αλληλούχιση τους. Ανεύρεση της αλληλουχίας βάσεων των προϊόντων της PCR (DNA sequencing).
- εφαρμογή της PCR για ανίχνευση του γονιδίου της μεθυλοτρανσφεράσης *Cfr*
- εφαρμογή της PCR για ενίσχυση των γονιδίων *rplC*, *rplD* και *rplV* που κωδικοποιούν για τις πρωτίνες L3, L4 και L22, καθαρισμός των προϊόντων της PCR και αλληλούχιση τους. Ανεύρεση της αλληλουχίας βάσεων των προϊόντων της PCR (DNA sequencing).

1.7.1 ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ

1.7.1.1 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 ολόκληρο 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: AJ295305) (Πίνακας 5) και του στελέχους

Enterococcus faecalis LMG 7937 (Accession number: AJ295306) που ελήφθησαν από την Τράπεζα Γονιδιακών πληροφοριών (GenBank) (Πίνακας 6).

<i>Enterococcus faecium</i>
23S rRNA genome strain LMG 11423 (accession number in core nucleotide AJ295305)
<p>ggttaagtgaataaggcgacgggtggatgccttggcactaggagccgatgaaggacgggactaacaccgatatgctttggggagctgtacgtaa gctatgatccagagatttccgaatgggggaacccaatctttaataggatgttacgattgtgtgaatacatagcacattcgaggtagacgcagagaa ctgaacatctaagtacgtcaggaagagaaagaaaattcgattccctgagtagcggcgagcgaacgggaaagcccaaccagcaagcttgc tgttgggggttaggactccaatatgtagttcttcagatagtcgaatgacttggaaaagtcagtcgaagagggtaaaaaccccgtagacgaatgtg gaagacacctaggaggtatcgtgacggcggaacacgagaaattccgtcggaatccgggaggaccatcctcaaggtctaaatactccctagtga ccgatagtgaaacagtagcgtgagggaaagtgaaaagcaccgggaaggggagtgaaatagaacctgaaccgtgtgcctacaacaagtcaaa gcccgttaatgggtgatggcggtcctttttagaatgaaccggcgagttacgattgcagaggttaagtgaagagacggagccgcagcgaag cgagtcgaataggcggtttagtagttagtcgtagaccgaaacctgtgatctaccatgtccaggttgaggtgcggtgaaacgcactggagga ccgaaccacgtacgttgaagtgcggggatgaggtgtgggtagcggagaaattccaacgaacttgagatagctgttctctccgaatagctt tagggctagcctcggaattgagaatgatggagtagagcactgttggactaggggccatctcggttaccgaattcagataaactccgaatgcc tcattcatatccgggagtcagactgtgagtgaatgccatagtcgaagggaaacagccagaccaccagtaagggtcccaaatatattgtaag tggaaaaggatgtgggtgtgcacagacaactaggatgttggcttagaagcagccaccatttaagagtgctgaatagctcactagtcgagtgacct gcgcggaaaattacccggggcctaacaatattaccgaagctgtgggtacacctttaggtgtattgtaggagagcgttcaaggcgtcgaaggca gatcgtgaggactgctggagcgttagaagtgaatgccggtatgtagtcgaagacaggtgagaatcctgtccaccgaatgactaaggtttcc tggggaaggctcgtccgccagggttagtcgggacctaagccgagggcgacagcgtagggcgtgataacaggttgatattcgttaccgttgc ttttgttgagcaatggaggacgcagggaggtgaaggaatgcagacgatcggaatgtctgtccaagcagtaagtctgaagaggagtaaatgttc ttttcttaaggacaagctgtgatggggagggaaataatagtagcgaagttcctgatgtcacactccgagaaaagcttctagtgaaaaacagcggc ccgtaccgcaaacgcacaggtagtcgaggagagaatcctaaggtgagcgagagaactctgttaaggaaactcgcaaatgacccgtaactt cgggagaaggggtctgatcatagcagccgcagtgatagggccaaagcactgtttatcaaaaacacaggtctctgcaaatcgtaatgaa gtataggggctgacccctgcccgggtgctggaagggttaagaggagtgcttagcgagcgagggtacgaattgaagccccagtaaacggcgccgt aactataacgggtcctaaggtagcgaattccttctcgggtaagttccgaccgcagaaaggcgtaacgatttgggcaactgtcacaagagagactc ggtagaatttttagtacctgtgaagatgcaggttaccgcgacaggacggaaagaccccatggagcttactgtagtgttgaattgagtgctgtaccgc atgtacagtagagtaggagcgtgataatcggaacgctagtgttcgatggagcgcgctggtgggatactaccctgcgttatggccactctaacc gcaccactaatcgtgtgggagacagtgatggcgagtttactggggcggtcgctcctaaaaggtaacggagcgcccaaggttccctc agaatggttggaaatcattcgaagagtgaaggcagaaggagcttgactgcgagaccaacaagtcgagcaggagcgaagtcgggcttagtg atccggtgttccgatggaaggccatcgctcaacggataaaagctaccctggggataacaggttatctccccaagagtcacatcgacggg gaggttggcacctgatgtcggtcgtcgatcctgggctgtagtcggtcccaagggttgggctgttcgccattaaagcggcacgcgagctgg gttcagaacgtcgtgagacagttcggtccctatccgtcgcggttggaaatttgagaggagctgtccttagtacgagaggaccgggatggactta ccgctgtgttaccagttgttctccaaggttttctggtgtagctatgtagggaaaggataaacgctgaagcatctaagtgtgaagccacctaag atgagatttccatttcttaagaaagtaagatccctgagagatgatcaggtagataggtcaggagtggaagtacagtgatgtatggagcggactgata ctaactgatcgaggacttaacca</p>

Πίνακας 5. Γονιδίωματος στελέχους *Enterococcus faecium* LMG 11423.

<i>Enterococcus faecalis</i>
23S rRNA genome strain LMG 7937 (accession number in core nucleotide AJ295306)
<p>ggttaagtgaataaggcgacgggtggatgccttggcactaggagccgatgaaggacgggactaacaccgatatgctttggggagctgtaagtaa gctatgatccagagatttccgaatgggggaacccaatctttataggaattactttcagtgatacatagctgattagaggtagacgcagagaact gaaacatcttagtacctgcaggaagagaaagaaaattcgattccctgagtagcggcgagcgaacgggaaagagcccaaccaaacagcttgc ttgggggttaggactccaatatgtagtctgttagtatagttgaaggatttggaaaattccgctaaagagggtgaaagccccgtagacgaatgctaa caacacctaggaggtatcgtgacggcggaacacgagaaattccgtcggaatccggggaccatcccgaagggtctaaatactccctagtacc cagtagtgaaacagtagcgtgagggaaagtgaaaagcaccgggaaggggagtgaaatagatcctgaaccgtgtgcctacaacaagtcaaaagc tcgttaagttagtgatggcgttgcctttttagaatgaaccggcgagttacgattgcgaggttaagtcgaagagacggagccgcagcgaagcg agtcgaataggcggaatgagtagttagtcgtagaccgaaacctgtgactaccatgtccaggttgaaggtgcggtgaaacgcactggaggac cgaaccacgtacgttgaagagtgcggggatgaggtgtgggtagcggagaaattccaacgaacttgagatagctgtgttctctccgaatagctt agggctagcctcggaattgagaatgatggagtagagcactgttggactaggggccatctcggttaccgaattcagataaactccgaatgccat tcatttatatccgggagtcagactgcgagtgataagatccgtagtcgaaagggaacagccagaccaccagtaagggtcccaaatatattgtaag</p>

tggaaaaggatgtggggtgacagacaactaggatgttgcttagaagcagccaccatttaagagtgcgtaatagctcactagtcgagtaccct
 gcgccgaaaatgtaccggggctaaacatattaccgaagctgtggactacaccattaggtgtagtgtaggagagcgttcaagggcggtgaaggtc
 gatcgtgaggacggctggagcgttagaagtgaatgccggtatgtagtcgaaagacaggtgagaatcctgccaccgtatgactaaggttcc
 tggggaaggctcgtccgccagggttagtcgggacctaagccgagggcgataggcgtaggcgtaggacaacaggttgatattcgttaccagttgt
 tttgtttgagcaatggaggacgcagtaggctaaggaatgcattggaagtcattccaagcaatgagctttagtagagttaaatgctttact
 cttaaggacaagttgtgacggggagcgaataatagtagcgaagttcctgtagtcacactgccaagaaaagctttagtgagaaaacaactgccc
 taccgtaaacggacacaggtagtcgaggagagtatcctaaggtgagcgagcgaactctcgttaaggaaactggcgaataatgacctggtcgg
 gagaaggggtgctgacttcggtcagccgcagtgaaatggcccaagcgactgttatcaaaaacacaggtctctgcaaaatcgaatgaagtata
 gggctgacgcctgccgggtgctggaaggttaagaggtaggggttagcttcggcgaagctcagaattgaagccccagtaaacggcgccgtaactat
 aacggtcctaaggtagcgaatcttctgctggtaagtccgacccgcacgaagggcgtaacgattgggcactgtctaacgagagactcggtga
 aattttagacctgtgaatgacaggttaccggcgacagcggaagacccccatggagcttactgtagtttgatattgagttgttaccacatgtac
 aggataggttaggagccgatgagaccggaacgctagtctggaggagcgctggtgggatactaccctgtgtatgaaccttaacccgaccac
 taatcgtgtgggagacagtgatgagggcagttgactggggcggtcgccctctaaaaggtaacggagggcgcccaaggttcctcagaatggt
 tggaaatcattgaagagtgaagggcagaagggagcttgactgcgagacacaaagtcgagcagggacgaagtcgggcttagtgatccggtgg
 ttccgcatgggaagggccatcgctcaacggtaaaagctaccctggggataacaggttatctccccaagagtcacatcgacggggaggttgga
 cctcgatgctgctgctgcacctcgtgggctgtagtcggccaaaggggtgggctgttcgccattaaagcggcagcgagctgggttcagaacgtc
 gtgagacagttcgtccctatccgtcggggcggttggaatttgagaggagctgtccttagtacgagaggaccgggtagtaccgtggtgtac
 cagttgtctccaagggcattgctgggtgtagttaggggaagggataaacgctgaaagcatctaagtgtgaagccacctaagatgagattccc
 attctttaagaaaagtaagaccctgagagatgacaggtagataggttggaagtggaaggctagttaggttgagcgggaccaataactaactcgtc
 aggacttaacca

Πίνακας 6. Γονιδίωματος στελέχους *Enterococcus faecalis* LMG 7937

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

Πίνακας 7. Εκκινητές και συνθήκες PCR για ενίσχυση του γονιδίου 23S rRNA των εντεροκόκκων

1.7.1.2 Εφαρμογή της PCR για την ενίσχυση ολόκληρου του γονιδίου του 23S rRNA των εντεροκόκκων σε 4 αλληλοεπικαλυπτόμενα ζεύγη

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 για να ανιχνευθούν πιθανές μεταλλάξεις σε όλο το μήκος του γονιδίου αυτού. Επιλέξαμε να ελέγξουμε αρχικά ολόκληρο το 23S rRNA για πιθανές μεταλλάξεις πέρα από την περιοχή V και έπειτα προχωρήσαμε σε ενδελεχή έλεγχο της περιοχής V για κάθε αντίγραφο χωριστά.

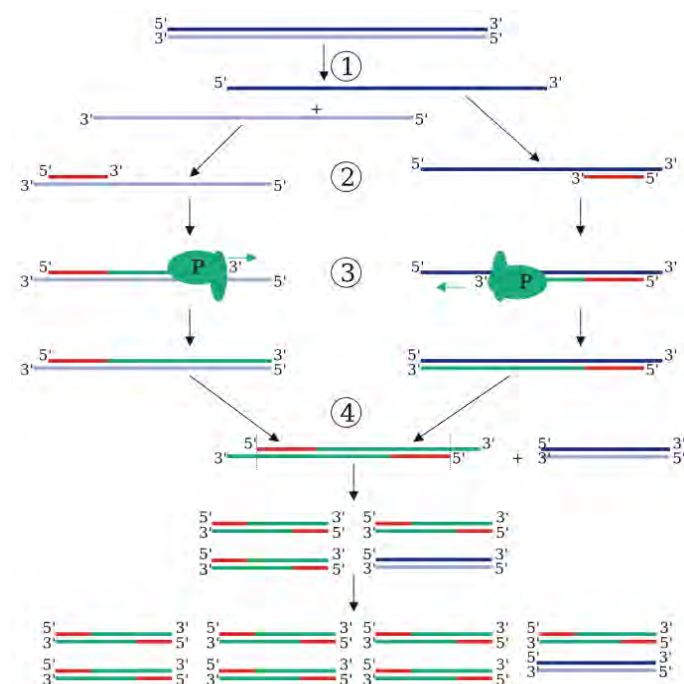
Η χρήση θετικών μαρτύρων δεν ήταν απαραίτητη εφόσον όλα τα βακτηριακά στελέχη φέρουν το γονίδιο που κωδικοποιεί για την μικρή υπομονάδα των ριβοσωμάτων τους. Ως αρνητικός μάρτυρας προς ανίχνευση πιθανής επιμόλυνσης της αντίδρασης με εξωγενές DNA, χρησιμοποιήθηκε νερό ελεύθερο νουκλεασών.

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης για την ενίσχυση των αλληλοεπικαλυπτόμενων 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, MgSO₄ 1 mM και τα ζεύγη των εκκινητών. Στον **πίνακα 8** φαίνονται οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων στο διάλυμα αντίδρασης της PCR, ενώ στον **πίνακα 7** 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 °C για 2 λεπτά. Η PCR διεξαγόταν σε 35 κύκλους που ο καθένας περιελάμβανε την αποδιάταξη (denaturation) στους 94 °C για 45 δευτερόλεπτα, πρόσδεση (annealing) των εκκινητών σε κατάλληλη θέση του γονιδίου στους 58 έως 62 °C (ανάλογα με το ζεύγος εκκινητών) για 30 δευτερόλεπτα και σύνθεση (extension) νέων αλυσίδων DNA στους 68 °C. Η τελική φάση (elongation) μετά την ολοκλήρωση των 35 κύκλων, στους 72 °C διαρκούσε 10 λεπτά (**Εικόνα 6**).

Κατόπιν ακολούθησε ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων και των δύο κλώνων των προϊόντων της PCR, που προέρχονται από ενίσχυση ολόκληρου του γονιδίου 23S rRNA σε 4 αλληλοεπικαλυπτόμενα ζεύγη για εντοπισμό μεταλλάξεων

που προσδίδουν στα στελέχη αυτά αντοχή στη λινεζολίδη. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε με συσκευή αλληλούχησης ABI Prism 377 DNA (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA), στις εταιρείες Lark ή Macrogen.



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση του κύκλου της PCR

- 1) Αποδιάταξη στους 94-96 °C.
- 2) Υβριδισμός στους (π.χ.) 68 °C.
- 3) Επμήκυνση στους 72 °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 ₂ O	38
10X Pfx Amplification Buffer	5
MgSO ₄ 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 8. Σύσταση διαλύματος PCR με την χρήση της Platinum® Pfx DNA Polymerase.

1.7.1.3 Σχεδιασμός εκκινητών με δυνατότητα ενίσχυσης της πιθανής περιοχής σύνδεσης της λινεζολίδης για κάθε αντίγραφο του 23S rRNA ξεχωριστά

Για να ενισχύσουμε την πιθανή περιοχή σύνδεσης της λινεζολίδης για κάθε αντίγραφο του 23S rRNA ξεχωριστά, σχεδιάστηκαν εκκινητές με δυνατότητα ενίσχυσης μέρους της περιοχής V του γονιδίου 23S rRNA και περιοχές ανοδικά ή καθοδικά αυτού (που διαφέρουν για κάθε αντίγραφο). Αφού παράξουμε το ειδικό προϊόν για κάθε αντίγραφο, σχεδιάσαμε ένα δεύτερο, κοινό για όλα τα αντίγραφα, ζεύγος εκκινητών για την ενίσχυση με δεύτερη PCR (μερικής φωλιάς) μέρους της περιοχής V (908 bp) κάθε αντιγράφου του γονιδίου 23S rRNA. Οι ανωτέρω εκκινητές σχεδιάστηκαν με την χρήση του προγράμματος Oligo Explorer 1.2 (Gene Link, 2004). Ο σχεδιασμός έγινε βάση του γονιδιώματος του στελέχους *Enterococcus faecium* LMG 11423 (Accession number: NC_017022.1) και του στελέχους *Enterococcus faecalis* V583 (Accession number: AE016830.1) που ελήφθησαν από την Τράπεζα Γονιδιακών πληροφοριών (GenBank).

1.7.1.4 Εφαρμογή της PCR για την ενίσχυση της πιθανής περιοχής σύνδεσης της λινεζολίδης για κάθε αντίγραφο του 23S rRNA ξεχωριστά

Με τη μέθοδο αυτή ταυτοποιείται η ύπαρξη μεταλλάξεων σε κάθε αντίγραφο του 23S rRNA γονιδίου ξεχωριστά. Έτσι, για να εντοπίσουμε τις μεταλλάξεις που προκαλούν την αντοχή στη λινεζολίδη σε κάθε στέλεχος *E. faecalis* εφαρμόσαμε 8 διαφορετικές αντιδράσεις PCR και σε κάθε στέλεχος *E. faecium* εφαρμόσαμε 12 διαφορετικές αντιδράσεις PCR (μία εξωτερική και μία εσωτερική PCR για καθένα από τα 4 και 6 αντίγραφα του 23S rRNA στους *E. faecalis* και *E. faecium* αντίστοιχα).

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.

Αρχικά, με την χρήση έξι ζευγών εκκινητών ενισχύσαμε τα διαφορετικά αντίγραφα του γονιδίου που κωδικοποιούν για το 23S rRNA των *E. faecium* και με την χρήση 4 ζευγών εκκινητών τα διαφορετικά αντίγραφα του γονιδίου που κωδικοποιούν για το 23S rRNA των *E. faecalis*. 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 Agilent Technologies. Inc, Santa Clara, CA, USA και αυτά ήταν: η πολυμεράση Stratagene® Paq5000 DNA Polymerase, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια dNTPs, 10X Paq5000 DNA Polymerase Buffer που περιέχει την κατάλληλη συγκέντρωση Mg^{+} 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 εντεροκόκκων μήκους 908 bp. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης για την ενίσχυση του εσωτερικού τμήματος του γονιδίου 23S rRNA ήταν 50 μ l που περιείχε 1 μ l PCR προϊόντος από την προηγούμενη PCR και 49 μ l μείγματος αντιδραστηρίων (master mix). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν του οίκου Agilent Technologies. Inc, Santa Clara, CA, USA και αυτά ήταν: η πολυμεράση Stratagene® Paq5000 DNA Polymerase, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια dNTPs, 10X Paq5000 DNA Polymerase Buffer που περιέχει την κατάλληλη συγκέντρωση Mg^{+} και τα ζεύγη των εκκινητών.

Στον **πίνακα 9** φαίνονται οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων στο διάλυμα αντίδρασης της PCR που έγιναν για να ενισχυθεί αρχικά τμήμα της περιοχής V και αλληλουχίες ανοδικά ή καθοδικά αυτής ενώ στον **πίνακα 10** φαίνονται οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων στο διάλυμα αντίδρασης της PCR που έγιναν για να ενισχυθεί το τμήμα 908 bp της περιοχής V για κάθε αντίγραφο του γονιδίου 23S rRNA ξεχωριστά. Στον **πίνακα 11** παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τα στελέχη *E. faecalis* ενώ στον **πίνακα 12** παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τα στελέχη *E. faecium*, μαζί το μέγεθος των προϊόντων των PCR και τις συνθήκες των αντιδράσεων.

Σύσταση διαλύματος PCR (Master Mix)	Ποσότητα (μ l)
H ₂ O	38.7
10X Paq5000 DNA Polymerase Buffer	5
dNTPs 25 mM each	0.4
Εκκινητής 1 (forward) 100 pmol/ μ l	0.2
Εκκινητής 2 (reverse) 100 pmol/ μ l	0.2
Paq5000 DNA Polymerase	0.5

Πίνακας 9. Σύσταση διαλύματος PCR με την χρήση του Stratagene® Paq5000 DNA Polymerase.

Σύσταση διαλύματος PCR (Master Mix)	Ποσότητα (μl)
H ₂ O	42.7
10X Paq5000 DNA Polymerase Buffer	5
dNTPs 25 mM each	0.4
Εκκινητής 1 (forward) 100 pmol/μl	0.2
Εκκινητής 2 (reverse) 100 pmol/ μl	0.2
Paq5000 DNA Polymerase	0.5

Πίνακας 10. Σύσταση διαλύματος PCR με την χρήση του Stratagene® Paq5000 DNA Polymerase.

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή		Μέγεθος Προϊόντος PCR (bp)	Συνθήκες PCR
<i>E. faecalis</i> A	Fw	5'...GTAACGATTTTGGGCACTGTC...3'	1177	95 °C 2 min, [95 °C 20 sec, 54 °C 20 sec, 72 °C 45 sec] x35, 72 °C 5 min
	Rev	5'...GCTCTCCCAGCTGAGCTAAA...3'		
<i>E. faecalis</i> B	Fw	5'...GTAACGATTTTGGGCACTGTC...3'	1167	
	Rev	5'...ACTACCAACTGAGCTATGCCG...3'		
<i>E. faecalis</i> C	Fw	5'...TCCGGCAGTAGGACTCGAA...3'	1218	
	Rev	5'...CGTAACGATTTGGGCACTG...3'		
<i>E. faecalis</i> D	Fw	5'...TTGTAAGGCAGGTGCTCTCC...3'	1191	
	Rev	5'...CGTAACGATTTGGGCACTG...3'		
Πιθανή περιοχή σύνδεσης της λινεζολιδης	Fw	5'...GTAACGATTTTGGGCACTGTC...3'	908 bp	
	Rev	5'...CGATTAGTATTGGTCCGCTC....3'		

Πίνακας 11. Εκκινητές και συνθήκες PCR για ενίσχυση τμήματος της περιοχής V όλων των αντιγράφων του γονιδίου 23S rRNA των *E. faecalis*.

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή		Μέγεθος Προϊόντος PCR (bp)	Συνθήκες PCR
<i>E. faecium</i> A	Fw	5'...GTAACGATTTGGGCACTGTC...3'	1569	95 °C 2 min, [95 °C 20 sec, 54 °C 20 sec, 72 °C 55 sec] x35, 72 °C 5 min
	Rev	5'...ACTGCAACAAAATGCGGTCT...3'		
<i>E. faecium</i> B	Fw	5'...ACCCTTGAGACAGTTTGGCA...3'	1167	
	Rev	5'...CGTAACGATTTGGGCACTG...3'		
<i>E. faecium</i> C	Fw	5'...TCCGGCAGTAGGACTCGAA...3'	1219	
	Rev	5'...CGTAACGATTTGGGCACTG...3'		
<i>E. faecium</i> D	Fw	5'...CATCCATGTCTCCTATACGTTGA...3'	1474	
	Rev	5'...CGTAACGATTTGGGCACTG...3'		
<i>E. faecium</i> E	Fw	5'...CTTATCAGGCGTGCGCTCTA...3'	1192	
	Rev	5'...CGTAACGATTTGGGCACTG...3'		
<i>E. faecium</i> F	Fw	5'...TGACCCTCTGCTTGTAAGGC...3'	1199	
	Rev	5'...CGTAACGATTTGGGCACTG...3'		
Πιθανή περιοχή σύνδεσης της λινεζολίδης	Fw	5'...GTAACGATTTGGGCACTGTC...3'	908 bp	
	Rev	5'...CGATTAGTATTGGTCCGCTC....3'		

Πίνακας 12. Εκκινητές και συνθήκες PCR για ενίσχυση τμήματος της περιοχής V όλων των αντιγράφων του γονιδίου 23S rRNA των *E. faecium*.

Κατόπιν ακολούθησε ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων και των δύο κλώνων των προϊόντων της PCR που προέρχονται από ενίσχυση κάθε αντίγραφο του γονιδίου 23S rRNA ξεχωριστά για εντοπισμό μεταλλάξεων που προσδίδουν στα στελέχη αυτά αντοχή στη λινεζολίδη. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε με συσκευή αλληλούχισης ABI Prism 377 DNA (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA).

1.7.2 ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΙ

1.7.2.1 Εφαρμογή της PCR για κάθε αντίγραφο του 23S rRNA των σταφυλοκόκκων ξεχωριστά

Για να εντοπίσουμε τις μεταλλάξεις που προκαλούν την αντοχή στη λινεξολίδη σε κάθε στέλεχος εφαρμόσαμε 12 διαφορετικές αντιδράσεις PCR (μία εξωτερική και μία εσωτερική PCR για καθένα από τα 6 αντίγραφα του 23S rRNA). Οι δεύτερες (εσωτερικές) PCR για κάθε αντίγραφο, είχαν σαν αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό μέρους (419 bp) του 23S rRNA που είναι πιθανώς η περιοχή πρόσδεσης της λινεξολίδης και ανίχνευση με αλληλούχιση των μεταλλάξεων σε κάθε αντίγραφο του γονιδίου ξεχωριστά. Η ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων και των δύο κλώνων των προϊόντων της PCR, πραγματοποιήθηκε με συσκευή αλληλούχισης ABI Prism 377 DNA (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA).

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.

Πιο αναλυτικά, 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 μ l που περιείχε 2 μ l μικροβιακού DNA και 48 μ l μείγματος αντιδραστηρίων. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν του οίκου Invitrogen. Inc, Carsbad, CA, USA και αυτά ήταν: μείγμα ενζύμων ελονγκάσης (Elongase® 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 μ l που περιείχε 1 μ l μικροβιακού DNA και 49 μ l μείγματος αντιδραστηρίων (master mix). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν του οίκου Invitrogen. Inc, Carsbad, CA, USA και αυτά ήταν: ένζυμο, DNA πολυμεράση (Platinum® Pfx DNA Polymerase),

τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια dNTPs, 10X Pfx Amplification Buffer ρυθμιστικό διάλυμα, MgSO₄ 1 mM και τα ζεύγη των εκκινητών.

Στον **πίνακα 13** φαίνονται οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων στο διάλυμα αντίδρασης της PCR που έγιναν με την χρήση του μείγματος ελονγκάσης, σ τον **πίνακα 14** με την Platinum® Pfx DNA Polymerase, ενώ στον **πίνακα 15** οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, το μέγεθος των προϊόντων των PCR καθώς και οι συνθήκες των αντιδράσεων.

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

Πίνακας 13. Σύσταση διαλύματος PCR με την χρήση του Elongase® Enzyme Mix

Σύσταση διαλύματος PCR (Master Mix)	Ποσότητα (μl)
H ₂ O	39
10X Pfx Amplification Buffer	5
MgSO ₄ 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 14. Σύσταση διαλύματος PCR με την χρήση της Platinum® Pfx DNA Polymerase

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή		Μέγεθος Προϊόντος PCR (bp)	Συνθήκες PCR	Αναφορά
<i>rrlA</i>	F	5´...AAACCAATTGGGATTAAAGT...3´	5548	94 °C 30 sec, [94 °C 30 sec, 50 °C 30 sec, 68 °C 6 min] x35,	Liakopoulos <i>et al</i> , 2009
	R	5´...TTCGAGGGATCTTATAACCG...3´			
<i>rrlB</i>	F	5´...CCTCCAACCTGGTGGTCTAGG...3´	6371	94 °C 30 sec, [94 °C 30 sec, 48 °C 30 sec, 68 °C 6 min] x35,	
	R	5´...TCCTTGCCATTGTCACCAGA...3´			
<i>rrlC</i>	F	5´...GAGTCCACTTAGGCCACCA...3´	5999	94 °C 30 sec, [94 °C 30 sec, 50 °C 30 sec, 68 °C 6 min] x35,	
	R	5´...CTACTCTTTTATAGCAATG...3´			
<i>rrlD</i>	F	5´...GCCTGGCAACGTCCTACTCT...3´	7362	94 °C 30 sec, [94 °C 30 sec, 56 °C 30 sec, 68 °C 6 min] x35,	
	R	5´...AACATTTATTCTCGATGAAA...3´			
<i>rrlE</i>	F	5´...TGTTGATGGAGCTTCAGTAG...3´	4358	94 °C 30 sec, [94 °C 30 sec, 57 °C 30 sec, 68 °C 6 min] x35,	
	R	5´...TAACCATTTGGAGCTAGCCG...3´			
<i>rrlF</i>	F	5´...TCTTGATCTCTTCCTACTA...3´	6058	94 °C 30 sec, [94 °C 30 sec, 55 °C 30 sec, 68 °C 6 min] x35,	
	R	5´...TAACCATTTGGAGCTAGCCG...3´			
<i>Εσωτερικό τμήμα της περιοχής V</i>	L1	5´...GCGGTCGCCTCCTAAAAG...3´	419 bp	94 °C 2 min, [94 °C 45 sec, 58 °C 30 sec, 68 °C 35 sec] x35, 72 °C 10 min	
	L2	5´...ATCCCGGTCCTCTCGTACTA...3´			

Πίνακας 15. Εκκινητές και συνθήκες PCR για ενίσχυση των αντιγράφων του γονιδίου 23S rRNA των σταφυλοκόκκων

1.7.2.2 Εφαρμογή της PCR για ανίχνευση του γονιδίου της μεθυλοτρανσφεράσης Cfr

Όλα τα στελέχη σταφυλοκόκκων εξετάστηκαν για την πιθανή παρουσία του γονιδίου *cfr* που κωδικοποιεί για τη Cfr μεθυλοτρανσφεράση και η οποία προσδίδει στα στελέχη CoNS αντοχή στη λινεζολίδα. Σε κάθε στέλεχος εφαρμόσαμε PCR με τους κατάλληλους εκκινητές, η οποία είχε σαν στόχο τη μοριακή ενίσχυση του γονιδίου *cfr* μεγέθους 740 bp (Kehrenberg C *et al*, 2005).

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης για την ενίσχυση του γονιδίου *cfr* ήταν 50 µl που περιείχε 5 µl μικροβιακού DNA και 45 µl μείγματος αντιδραστηρίων (master

mix). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν του οίκου Invitrogen. Inc, Carlsbad, CA, USA και αυτά ήταν: ένζυμο, DNA πολυμεράση (Platinum® DNA Polymerase), τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια dNTPs, 10X Amplification Buffer ρυθμιστικό διάλυμα, MgCl₂ 50 mM και τα ζεύγη των εκκινητών. Ως αρνητικός μάρτυρας προς ανίχνευση πιθανής επιμόλυνσης της αντίδρασης με εξωγενές DNA, χρησιμοποιήθηκε νερό ελεύθερο νουκλεασών.

Στον **πίνακα 16** φαίνονται οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων στο διάλυμα αντίδρασης της PCR που έγιναν με την χρήση του μείγματος Platinum® DNA Polymerase, ενώ στον **πίνακα 17** οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, το μέγεθος των προϊόντων των PCR καθώς και οι συνθήκες των αντιδράσεων.

Σύσταση διαλύματος PCR (Master Mix)	Ποσότητα (μl)
H ₂ O	36.35
10X Amplification Buffer	5
MgCl ₂ 50 mM	1.5
dNTPs 10 mM each	1.25
Εκκινητής 1 (forward) 100 pmol/μl	0.2
Εκκινητής 2 (reverse) 100 pmol/ μl	0.2
Platinum DNA Polymerase 5 U/ μl	0.5

Πίνακας 16. Σύσταση διαλύματος PCR με την χρήση της Platinum® DNA Polymerase

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή		Μέγεθος Προϊόντος PCR (bp)	Συνθήκες PCR	Αναφορά
<i>cfr</i>	Fw	5'...TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGT CA...3'	740	94 °C 2 min, [94 °C 1 min, 48 °C 1 min, 72 °C 1 min] x35, 72 °C 10 min	Kehrenberg C et al, 2005
	Rv	5'...ACCATATAATTGACCACAAGCAGC. ...3'			

Πίνακας 17. Εκκινητές και συνθήκες PCR για ενίσχυση του γονιδίου *cfr* των σταφυλοκόκκων

1.7.2.3 Εφαρμογή της PCR για ενίσχυση των γονιδίων *rplC*, *rplD* και *rplV* που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες L3, L4 και L22.

Σε 8 στελέχη LRSE που αντιπροσώπευαν όλους του τύπους PFGE, που επιλέχθηκαν για να μελετηθεί η κινητική της ανάπτυξής τους ενισχύθηκαν τα γονίδια *rplC*, *rplD* και *rplV* που κωδικοποιούν για τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες L3, L4 και L22

σε κάθε στέλεχος εφαρμόζοντας PCR με τους κατάλληλους εκκινητές. Οι PCR αυτές είχαν σαν στόχο τη μοριακή ενίσχυση των γονιδίων *rplC*, *rplD* και *rplD* που κωδικοποιούν για τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες L3, L4 και L22 με επακόλουθη αλληλούχιση και ανάλυση των αλληλουχιών τους για τον εντοπισμό τυχόν μεταλλάξεων (Mendes RE *et al*, 2010). Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε με συσκευή αλληλούχισης ABI Prism 377 DNA (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA).

Η χρήση θετικών μαρτύρων δεν ήταν απαραίτητη εφόσον όλα τα βακτηριακά στελέχη φέρουν τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις απαραίτητες αυτές ριβοσωμικές πρωτεΐνες. Ως αρνητικός μάρτυρας προς ανίχνευση πιθανής επιμόλυνσης της αντίδρασης με εξωγενές DNA χρησιμοποιήθηκε νερό ελεύθερο νουκλεασών.

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 50 μ l που περιείχε 5 μ l μικροβιακού DNA και 45 μ l μείγματος αντιδραστηρίων (master mix). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν του οίκου Invitrogen. Inc, Carsbad, CA, USA και αυτά ήταν: ένζυμο, DNA πολυμεράση (Platinum® DNA Polymerase), τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια dNTPs, 10X Amplification Buffer ρυθμιστικό διάλυμα, $MgCl_2$ 50 mM και τα ζεύγη των εκκινητών.

Σύσταση διαλύματος PCR (Master Mix)	Ποσότητα (μ l)
H ₂ O	36.35
10X Amplification Buffer	5
MgCl ₂ 50 mM	1.5
dNTPs 10 mM each	1.25
Εκκινητής 1 (forward) 100 pmol/ μ l	0.2
Εκκινητής 2 (reverse) 100 pmol/ μ l	0.2
Platinum DNA Polymerase 5 U/ μ l	0.5

Πίνακας 18. Σύσταση διαλύματος PCR με την χρήση της Platinum® DNA Polymerase

Στον **πίνακα 18** φαίνονται οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων στο διάλυμα αντίδρασης της PCR που έγιναν με την χρήση του μείγματος Platinum® DNA Polymerase, ενώ στον **πίνακα 19** οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, το μέγεθος των προϊόντων των PCR καθώς και οι συνθήκες των αντιδράσεων.

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή		Μέγεθος Προϊόντος PCR (bp)	Συνθήκες PCR	Αναφορά
<i>rplC</i>	rplC-F	5´...ACC CTG ATT TAG TTC CGT CTA...3´	822	94 °C 2 min, [94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 1 min] x35, 72 °C 10 min	Mendes RE <i>et al</i>, 2010
	rplC-R	5´...GTT GAC GCT TTA ATG GGC TTA...3´			
<i>rplD</i>	rplD-F	5´...TCG CTT ACC TCC TTA ATG...3´	1200	94 °C 2 min, [94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 1 min] x35, 72 °C 10 min	
	rplD-R	5´...GGT AAC ACT GTA ACT G...3´			
<i>rplV</i>	rplV-F	5´... CAA CAC GAA GTC CGA TTG GA...3´	350	94 °C 2 min, [94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min] x35, 72 °C 10 min	
	rplV-R	5´... GCA GAC GAC AAG AAA ACA AG...3´			

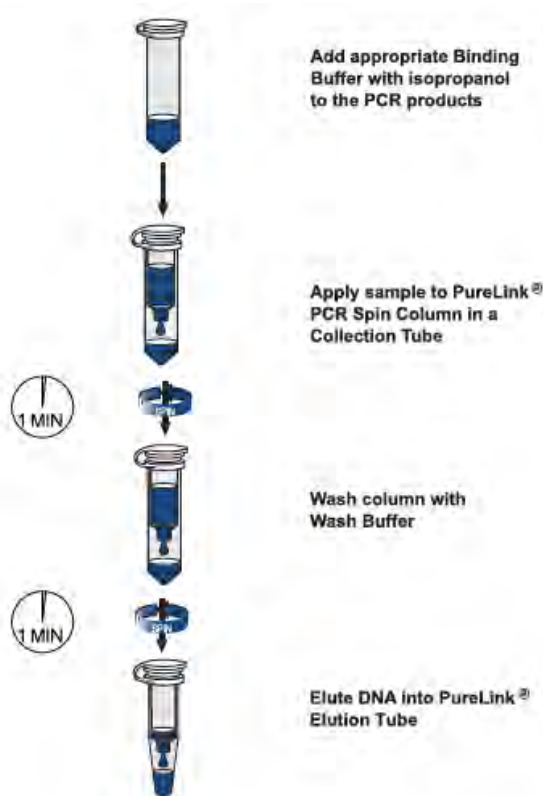
Πίνακας 19. Εκκινητές και συνθήκες PCR για ενίσχυση των γονιδίων *rplC*, *rplD* και *rplV* των σταφυλοκόκκων

1.8 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

Στα PCR προϊόντα που επρόκειτο να υποβληθούν στη διαδικασία ανεύρεσης αλληλουχίας βάσεων εφαρμόστηκε καθαρισμός με το σύστημα του εμπορικού kit Purelink® PCR Purification 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 160 µl ρυθμιστικού διαλύματος καθαρισμού PureLink Binding Buffer με ισοπροπανόλη και αναδεύουμε ελαφρά μέχρι να ομογενοποιηθεί το διάλυμα. Μεταφέρουμε το δείγμα σε μία στήλη PureLink Spin Column. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στα 10,000 x g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να προσδεθεί το δίκλωνο DNA στη στήλη. Απορρίπτουμε το υγρό που έχει εισρεύσει από τη στήλη. Προσθέτουμε στη στήλη 650 µl ρυθμιστικό διάλυμα πλύσεως Wash Buffer με αιθανόλη. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στα 10,000 x g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτουμε το υγρό που έχει εισρεύσει από τη στήλη. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στη μέγιστη ταχύτητα για 2-3 λεπτά για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης. Τοποθετούμε τη στήλη σε ένα σωληνάριο eppendorf του 1.5 ml. Προσθέτουμε στο

κέντρο της στήλης 50 µl διαλύματος έκλουσης Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5). Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στη μέγιστη ταχύτητα για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα έκλουσης περιέχει το καθαρό PCR προϊόν (**Εικόνα 7**) που αποθηκεύεται στους -20 °C για περαιτέρω χρήση.



Εικόνα 7. Διαδικασία καθαρισμού προϊόντων PCR με το εμπορικό kit Purelink® PCR Purification Kit

Η μέθοδος της ανεύρεσης αλληλουχίας βάσεων εφαρμόστηκε για τον ακριβή εντοπισμό των μεταλλάξεων που εδράζονται σε ποικίλα γονίδια των στελεχών εντεροκόκκου και σταφυλοκόκκου. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε με ένα μηχάνημα αλληλούχισης ABI Prism 377 DNA (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA).

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 σωληνάρια 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.

1.9 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Για τη μελέτη της ανάπτυξης και της βιωσιμότητας των σταφυλοκοκκικών στελεχών εκτελέστηκαν καμπύλες ανάπτυξης απουσία και παρουσία λινεζολίδης εφαρμόζοντας ένα πρωτόκολλο που περιγράφηκε παλαιότερα (**Moubareck *et al*, 2009**), με τροποποιήσεις. Επιλέχθηκαν για το σκοπό αυτό 8 στελέχη LRSE με ποικίλες MIC στη λινεζολίδη που αντιπροσώπευαν όλους του τύπους PFGE και ένα στέλεχος ευαίσθητο στη λινεζολίδη (MIC 2 $\mu\text{g/ml}$) (Linezolid Susceptible *Staphylococcus epidermidis*, LSSE) που χρησιμοποιήθηκε σαν στέλεχος ελέγχου. Επίσης σαν στέλεχος ελέγχου χρησιμοποιήθηκε και το πρότυπο στέλεχος ATCC 29213 *S. aureus* (MIC στη λινεζολίδη 0.5 $\mu\text{g/ml}$).

Όλα τα δείγματα δοκιμάστηκαν εις τριπλούν, για να διασφαλιστεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου, παρουσία και απουσία λινεζολίδης. Οι συγκεντρώσεις λινεζολίδης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0, 8, 16, 32, 64 και 128 $\mu\text{g/ml}$ για τα 5 στελέχη με MIC >256 $\mu\text{g/mL}$ και για τρία στελέχη με χαμηλού επιπέδου αντοχή στη λινεζολίδη και τα στελέχη ελέγχου ήταν το μισό της MIC και 0 $\mu\text{g/ml}$.

Το πρωτοκόλλο που ακολουθήθηκε ξεκινάει αρχικά με καλλιέργεια των στελεχών σε τρυβλία που περιέχουν Mueller Hinton άγαρ και επωάζονται στους 37 °C για 24h. Κατόπιν ακολουθεί υγρή ανακαλλιέργεια των ίδιων στελεχών (μία αποικία ενοφθαλμίζεται σε 5 ml Mueller Hinton ζωμό και επωάζεται στους 37 °C για 18h). Ακολουθεί και δεύτερη υγρή ανακαλλιέργεια (σε 2 ml MH ζωμού με την κατάλληλη συγκέντρωση λινεζολίδης, ενοφθαλμίζονται 20 µl από την πρώτη υγρή καλλιέργεια και επωάζονται στους 37 °C για 36 ώρες με συνεχή ήπια ανάδευση).

Λαμβάνονται μετρήσεις σε μετρητή κλίμακας McFarland μετά από ήπια ανάδευση των σωληναρίων για 15 s με vortex από κάθε δείγμα στις 0, 6, 12, 18, 24, 30 και 36 h.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση της δοκιμασίας *t*-test. Για όλα τα πειράματα, τιμή $P \leq 0.05$ θεωρήθηκε ενδεικτική της στατιστικής σημαντικότητας. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με τη χρήση του λογισμικού Minitab software (version 13.31).

II. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

II.1 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΕΙΔΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

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

Από τα στελέχη αυτά 19 άνηκαν στο είδος *E. faecium* και 6 στο είδος *E. faecalis*. LR *E. faecium* απομονώθηκαν από 13 ασθενείς και LR *E. faecalis* από 5 ασθενείς. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ένας ασθενής έφερε ένα στέλεχος *E. faecium* και ένα στέλεχος *E. faecalis* ταυτόχρονα που είχαν αντοχή στη λινεζολίδη. Ένα LR στέλεχος απομονώθηκε από 14 ασθενείς, 2 LR στελέχη από 4 ασθενείς και 3 LR στελέχη από έναν ασθενή. Εικοσιδύο στελέχη απομονώθηκαν από την μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) και 3 από την παθολογική κλινική. Τα κλινικά δείγματα, από τα οποία απομονώθηκαν τα LR στελέχη, ήταν: 8 αίμα, 11 ορθικό, 3 πύο, 1 ενδοαγγειακός καθετήρας, 1 ούρα και 1 τραύμα.

Περιοχή απομόνωσης	Στέλεχη (n)
Αίμα	8
Ορθικό	11
Πύο	3
Ενδοαγγειακός Καθετήρας	1
Ούρα	1
Τραύμα	1

Πίνακας 20. Περιοχή απομόνωσης εντεροκόκκων

Είδος	Στέλεχη (n)
<i>E. faecium</i>	19
<i>E. faecalis</i>	6

Πίνακας 21. Διάταξη ειδών εντεροκόκκου

Περιλήφθηκαν ακόμη στη μελέτη 72 ανθεκτικά στη λινεζολίδη (**Linezolid Resistant, LR**) κλινικά στελέχη κοαγκουλάση-αρνητικών σταφυλοκόκκων, που απομονώθηκαν από 41 ασθενείς του Τζάνειου Γενικού Νοσοκομείου Πειραιά κατά το χρονικό διάστημα Νοέμβριος 2008 έως Απρίλιος 2010.

Από τα στελέχη αυτά σύμφωνα με το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK2, 55 άνηκαν στο είδος *S. epidermidis*, 8 στο είδος *S. capitis*, 4 στο είδος *S. hominis*, 3 στο είδος *S. lentus* και τέλος 2 στο είδος *S. warneri*. Όλα τα στελέχη απομονώθηκαν από ασθενείς που νοσηλεύονταν στην μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ). Τα

κλινικά δείγματα, από τα οποία απομονώθηκαν τα LR στελέχη, ήταν: αίμα 63, κεντρική φλεβική γραμμή 7 και πλευριτικό υγρό 2. Από τον συνολικό αριθμό των 72 στελεχών σταφυλοκόκκων περαιτέρω μελετήθηκαν τα 30 που ελήφθησαν πρώτα.

Περιοχή απομόνωσης	Στελέχη (n)
Αίμα	63
Κεντρική Φλεβική Γραμμή	7
Πλευριτικό Υγρό	2

Πίνακας 22. Περιοχή απομόνωσης σταφυλοκόκκων

Είδος	Στελέχη (n)
<i>S. epidermidis</i>	55
<i>S. capitis</i>	8
<i>S. hominis</i>	4
<i>S. lentus</i>	3
<i>S. warneri</i>	2

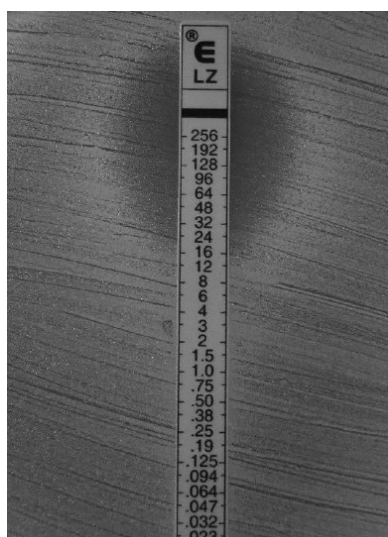
Πίνακας 23. Διάταξη ειδών σταφυλόκοκκου

II.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ (MIC) ΣΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ, BANKOMYKINΗ ΚΑΙ ΤΕΙΚΟΠΛΑΝΙΝΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ E-TEST

Η εφαρμογή των ταινιών E-test που χρησιμοποιήσαμε προσδιορίζει την MIC μέχρι και την συγκέντρωση των 256 µg/ml για τη λινεζολίδη, τη βανκομυκίνη και την τεϊκοπλανίνη. Τα αποτελέσματα παρατίθενται συγκεντρωτικά στους ακόλουθους πίνακες. Στον **πίνακα 24** παρατίθενται τα αποτελέσματα προσδιορισμού των MIC των εντεροκόκκων με E-test για τη βανκομυκίνη και την τεϊκοπλανίνη. Στον **πίνακα 25** παρατίθενται τα αποτελέσματα προσδιορισμού των MIC των σταφυλοκόκκων με E-test για τη βανκομυκίνη και την τεϊκοπλανίνη. Τα αποτελέσματα για την MIC όλων των στελεχών στη λινεζολίδη παρουσιάζονται με την πρότυπη μέθοδο αραίωσης σε άγαρ.

α/α στελέχους εντεροκόκκου	Είδος	Βανκομυκίνη MIC (μg/ml)	Τεϊκοπλανίνη MIC (μg/ml)
1	<i>E. faecium</i>	>256	16
2A	<i>E. faecium</i>	>256	16
2B	<i>E. faecium</i>	>256	32
3	<i>E. faecium</i>	>256	16
4A	<i>E. faecium</i>	1.5	1
4B	<i>E. faecium</i>	1	0.75
4C	<i>E. faecium</i>	1	0.75
5	<i>E. faecium</i>	>256	16
6A	<i>E. faecium</i>	>256	24
7	<i>E. faecium</i>	0.75	0.38
8	<i>E. faecium</i>	8	1
9A	<i>E. faecium</i>	>256	16
9B	<i>E. faecium</i>	>256	24
10	<i>E. faecium</i>	1.5	0.25
11A	<i>E. faecium</i>	1	1
11B	<i>E. faecium</i>	1	1
12	<i>E. faecium</i>	>256	24
13	<i>E. faecium</i>	2	1
14	<i>E. faecium</i>	4	0.75
15	<i>E. faecalis</i>	>256	>256
6B	<i>E. faecalis</i>	1	0.38
16	<i>E. faecalis</i>	>256	12
17	<i>E. faecalis</i>	1.5	0.25
18	<i>E. faecalis</i>	>256	24
19	<i>E. faecalis</i>	>256	48

Πίνακας 24. Προσδιορισμός των MIC των εντεροκόκκων με E-test για τη βανκομυκίνη και την τεϊκοπλανίνη.



Εικόνα 8. Προσδιορισμός MIC λινεζολίδης με Etest σε στέλεχος σταφυλοκόκκου.

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

Πίνακας 25. Προσδιορισμός των MIC των σταφυλοκόκκων με E-test για τη βανκομυκίνη και την τεϊκοπλανίνη

II.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ MIC ΣΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΩΝ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΝ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ

Ο προσδιορισμός της MIC στη λινεζολίδη έγινε σε όλα τα στελέχη σταφυλοκόκκων για 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 26** εμφανίζονται τα αποτελέσματα προσδιορισμού της MIC στη λινεζολίδη με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων για τα στελέχη εντεροκόκκου και στον **πίνακα 27** εμφανίζονται τα αποτελέσματα προσδιορισμού της MIC στη λινεζολίδη με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων για τα στελέχη σταφυλοκόκκου. Λόγω της ιδιαίτερα υψηλής αντοχής των

περισσότερων στελεχών σταφυλοκόκκου στη λινεζολίδη ήταν αδύνατος ο ακριβής προσδιορισμός της MIC αυτών.

α/α στελέχους εντεροκόκκου	Είδος	Λινεζολίδη MIC (μg/ml)
1	<i>E. faecium</i>	16
2A	<i>E. faecium</i>	12
2B	<i>E. faecium</i>	8
3	<i>E. faecium</i>	12
4A	<i>E. faecium</i>	12
4B	<i>E. faecium</i>	12
4C	<i>E. faecium</i>	8
5	<i>E. faecium</i>	16
6A	<i>E. faecium</i>	16
7	<i>E. faecium</i>	16
8	<i>E. faecium</i>	8
9A	<i>E. faecium</i>	8
9B	<i>E. faecium</i>	8
10	<i>E. faecium</i>	8
11A	<i>E. faecium</i>	8
11B	<i>E. faecium</i>	8
12	<i>E. faecium</i>	8
13	<i>E. faecium</i>	8
14	<i>E. faecium</i>	8
15	<i>E. faecalis</i>	6
6B	<i>E. faecalis</i>	12
16	<i>E. faecalis</i>	12
17	<i>E. faecalis</i>	8
18	<i>E. faecalis</i>	16
19	<i>E. faecalis</i>	12

Πίνακας 26. Προσδιορισμός της MIC στη λινεζολίδη με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων για τα στελέχη εντεροκόκκου.

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

Πίνακας 27. Προσδιορισμός της MIC στη λινεζολίδη με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων για τα στελέχη σταφυλοκόκκου.

II.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΥ ΚΑΙ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΥ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΑΛΛΟΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ (PFGE)

Στα πλαίσια του ελέγχου της μοριακής επιδημιολογικής συσχέτισης των ανθεκτικών στη λινεζολίδη 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*

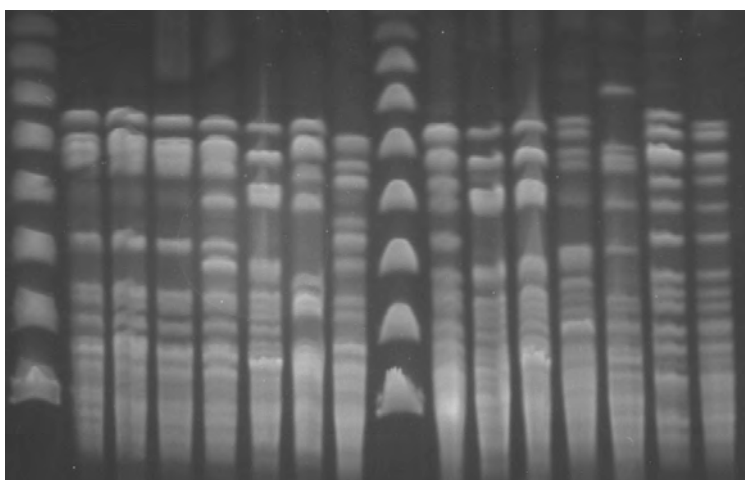
faecalis και τέλος στα στελέχη *Staphylococcus epidermidis* και *Staphylococcus capitis*. Τα γενετικά αποτυπώματα των στελεχών αναλύθηκαν δια γυμνού οφθαλμού σύμφωνα με τα ερμηνευτικά κριτήρια των Tenover *et al.*

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 9** και **10** εμφανίζονται τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο των στελεχών *E. faecium* και των στελεχών *E. faecalis* αντίστοιχα. Επίσης στον **Πίνακα 28** παρατίθενται τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά των εντεροκοκκικών στελεχών σε συνδυασμό με τα PFGE αποτυπώματα τους.

	Ασθενής	Στέλεχος	Μήνας Απομόνωσης (μ/χ)	Υποκείμενες Νόσοι	Κλινικό Δείγμα	VAN MIC (μg/mL)	LZD MIC (μg/mL)	έκθεση στη LZD(ημέρες)	PFGE Τύπος
<i>E. faecium</i>	1	1	01/07	Ασθένεια Wegener / Νεφρική Ανεπάρκεια	Αίμα	>256	16	Ναι (25)	Ia
	2	2A	01/07	Σηπτικό Σοκ	Αίμα	>256	12	Ναι (16)	Ia
		2B	02/07		Πύο	>256	8		Ia
	3	3	02/07	COPD/ Λοίμωξη Αναπνευστικού	Κόπρανα	>256	12	Όχι	Ia
	4	4A	02/07		Αίμα	1.5	12	Όχι	Ib
		4B	03/07		Αίμα	1	12		Ib
		4C	03/07		Πύο	1	8		Ib
	5	5	05/07	Ηπατίτιδα Β/ Πνευμονοφρίτιδα	Αίμα	>256	16	Όχι	II
	6	6A	12/07	Χειρουργείο εγκεφαλικού	Κόπρανα	>256	16	Ναι (15)	III
	7	7	01/08	Τραύμα	Ενδοαγ. Καθετήρας	1	16	Όχι	IV
	8	8	02/08		Κόπρανα	8	8	Ναι (22)	V
	9	9A	05/08	Τραύμα	Κόπρανα	>256	8	Ναι (3)	II
		9B	06/08		Τραύμα	>256	8		II
	10	10	05/08	Όγκος εγκεφάλου	Κόπρανα	1.5	8	Ναι (4)	II
11	11A	08/08	Τραύμα	Αίμα	1	8	Όχι	VIa	
	11B	09/08		Κόπρανα	1	8		VIa	
12	12	09/08	Τραύμα	Κόπρανα	>256	8	Ναι (7)	VII	
13	13	12/08		Ούρα	2	8	Όχι	VIb	
14	14	12/08		Αίμα	4	8	Όχι	VIb	
<i>E. faecalis</i>	6	6B	12/07	Εγκεφαλικό ανεύρυσμα	Αίμα	1	12	Ναι (15)	VIIIa
	15	15	04/07	Υπαραχνοειδής αιμορραγία	Πύο	>256	8	Ναι (13)	IX
	16	16	05/08	Καρδιακή Ανεπάρκεια	Κόπρανα	>256	12	Όχι	VIIIb
	17	17	06/08		Κόπρανα	1.5	8	Όχι	VIIIb
	18	18	06/07		Κόπρανα	>256	16	Όχι	XI
	19	19	10/08	Τραύμα	Κόπρανα	>256	12	Ναι (4)	X

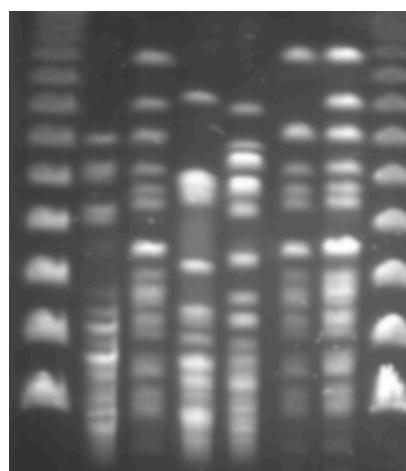
Πίνακας 28. PFGE αποτυπώματα στελεχών *E. faecium* και *E. faecalis*

L 1 2 3 4 5 6 7 L 8 9 10 11 12 13 14



Εικόνα 9. Ηλεκτροφορητικά πρότυπα στελεχών *E. faecium*. L = ladder, 1-14 = αριθμοί ασθενών

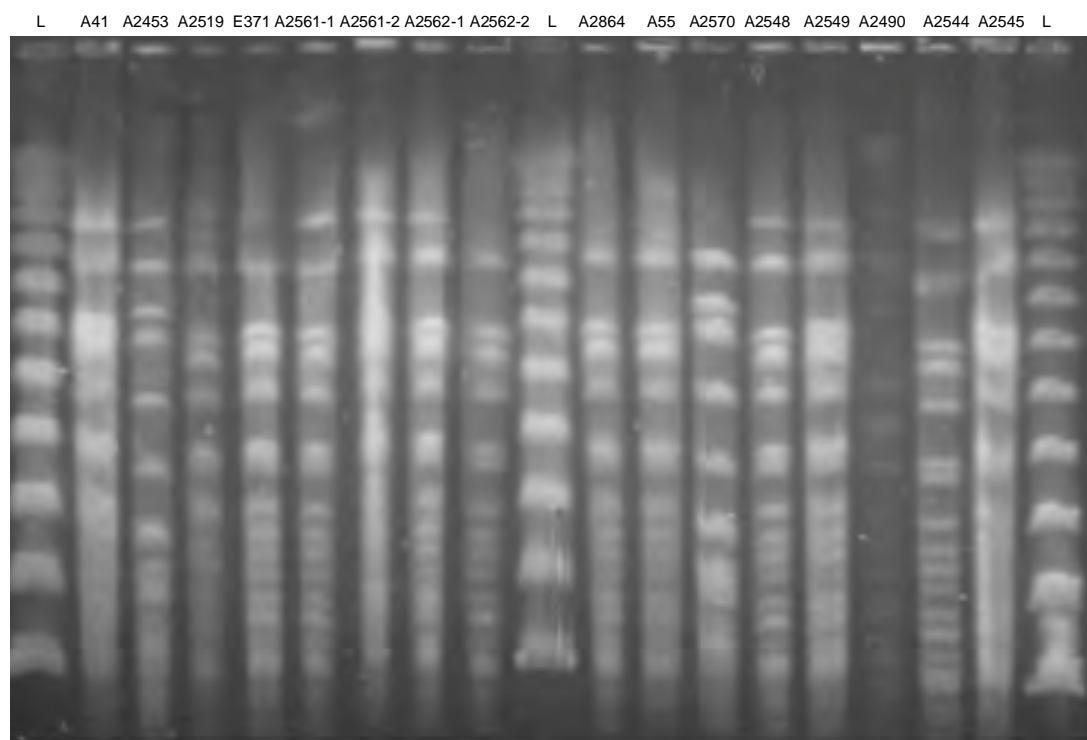
L 19 16 15 18 6 17 L



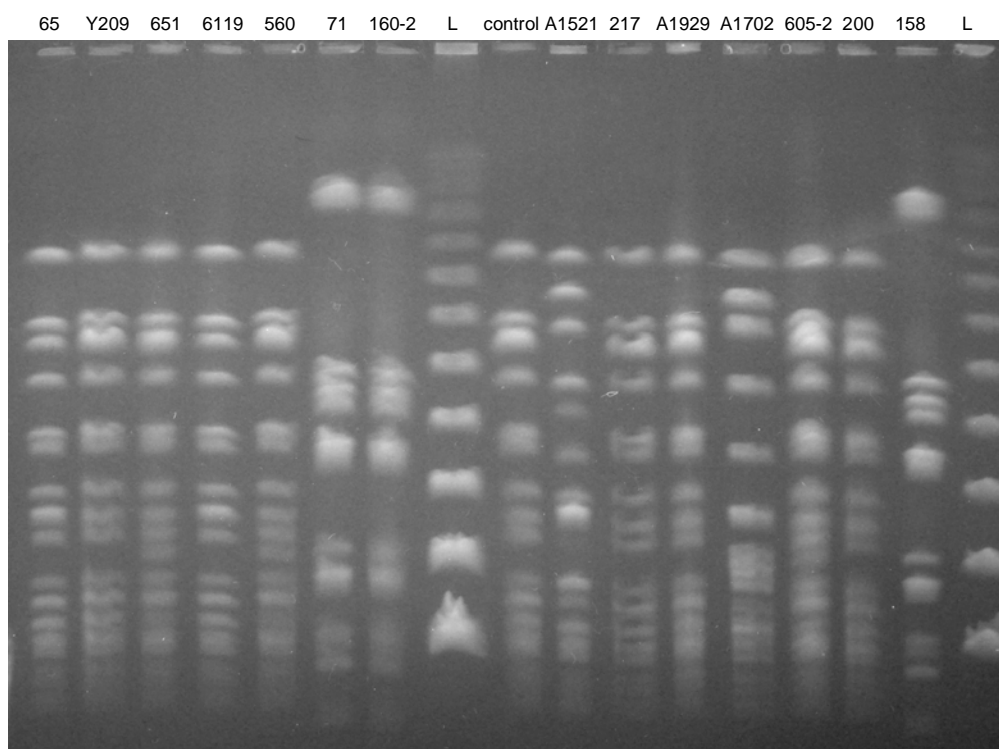
Εικόνα 10. Ηλεκτροφορητικά πρότυπα στελεχών *E. faecalis*. L = ladder, 6,15-19 = αριθμοί ασθενών

Τα στελέχη *S. epidermidis* ανήκουν σε 5 διαφορετικούς κλώνους και τα 3 στελέχη *S. capitis* (158, 71, 160-2) ήταν γενετικά πανομοιότυπα και ανήκουν σε ένα κλών. Εικοσιτρία από τα 27 στελέχη *S. epidermidis* ήταν κλωνικά συσχετιζόμενα ενώ τέσσερα *S. epidermidis* (A2570, A2490, A2453, A1702) στελέχη ήταν κλωνικά μοναδικά. Στις εικόνες 11 και 12 εμφανίζονται τα αποτελέσματα των

ηλεκτροφορήσεων σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο των 27 στελεχών *S. epidermidis* και των 3 στελεχών *S. capitis*.



Εικόνα 11. Ηλεκτροφορητικά πρότυπα στελεχών *S. epidermidis* και *S. capitis*. L = Ladder



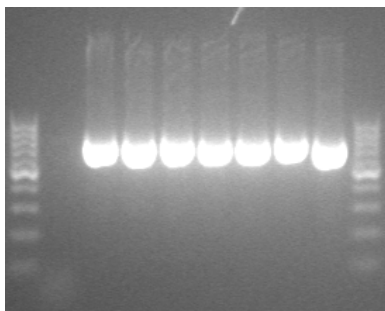
Εικόνα 12. Ηλεκτροφορητικά πρότυπα στελεχών *S. epidermidis* και *S. capitis*. L = Ladder

II.5 ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR

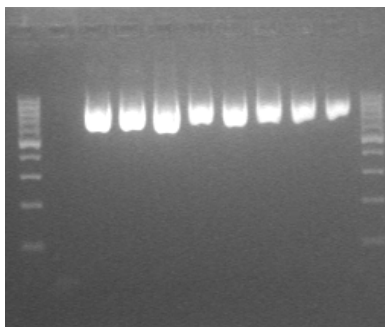
II.5.1 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου 23S rRNA των εντεροκόκκων σε 4 αλληλοεπικαλυπτόμενα ζεύγη

Τα PCR προϊόντα των στελεχών αναλύθηκαν με τη μέθοδο αλληλούχισης του γενετικού υλικού 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: EU547788.1) και *Enterococcus faecalis* strain IJ-12 (Accession number: EU547785.1) που ελήφθησαν από την Τράπεζα Γονιδιακών πληροφοριών (GenBank), ώστε να προσδιοριστούν οι ακριβείς θέσεις των μεταλλάξεων.

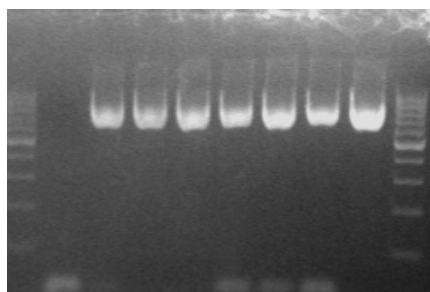
Σε κάθε στέλεχος εφαρμόστηκαν 4 διαφορετικές διαδοχικές αντιδράσεις PCR για την μοριακή ενίσχυση (σε αλληλοεπικαλυπτόμενα τμήματα) ολόκληρου του γονιδίου 23S rRNA που κωδικοποιεί για την μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος (Εικόνες 13-16).



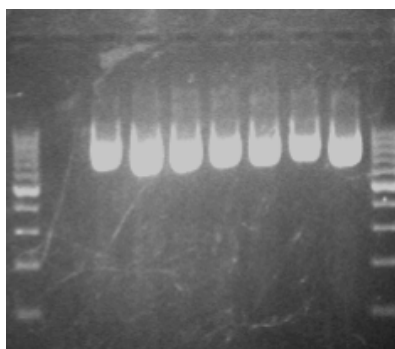
Εικόνα 13. Ενδεικτικά αποτελέσματα ενίσχυσης με την πρώτη PCR για το τμήμα που αντιστοιχεί στις βάσεις 12-731 της περιοχής V του 23S rRNA των εντεροκόκκων. Στα άκρα της εικόνας φαίνεται δείκτης GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas) του μοριακού μεγέθους των 100-1000 bp.



Εικόνα 14. Ενδεικτικά αποτελέσματα ενίσχυσης με την δεύτερη PCR για το τμήμα που αντιστοιχεί στις βάσεις 597-1486 της περιοχής V του 23S rRNA των εντεροκόκκων. Στα άκρα της εικόνας φαίνεται δείκτης GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas) του μοριακού μεγέθους των 100-1000 bp.



Εικόνα 15. Ενδεικτικά αποτελέσματα ενίσχυσης με την τρίτη PCR για το τμήμα που αντιστοιχεί στις βάσεις 1319-2140 της περιοχής V του 23S rRNA των εντεροκόκκων. Στα άκρα της εικόνας φαίνεται δείκτης GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas) του μοριακού μεγέθους των 100-1000 bp.



Εικόνα 16. Ενδεικτικά αποτελέσματα ενίσχυσης με την τέταρτη PCR για το τμήμα που αντιστοιχεί στις βάσεις 1988-2896 της περιοχής V του 23S rRNA των εντεροκόκκων. Στα άκρα της εικόνας φαίνεται δείκτης GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas) του μοριακού μεγέθους των 100-1000 bp.

Η σύγκριση των αλληλουχιών των υπό εξέταση στελεχών με την αλληλουχία αυτή έδωσε μόνο μία νουκλεοτιδική διαφορά, που αντιστοιχεί σ τη βιβλιογραφικά κατατεθειμένη μετάλλαξη **G2576T** σε όλα τα υπό εξέταση στελέχη εντεροκόκκων.

Λόγω της ταυτόχρονης ενίσχυσης όλων των αντιγράφων του 23S rRNA των εντεροκόκκων δεν ήταν εφικτός ο προσδιορισμός του αριθμού των μεταλλαγμένων αντιγράφων του κάθε στελέχους. Ο μοναδικός διαχωρισμός που μπορούσε να εκτελεστεί με την μέθοδο αυτή ήταν σε μεταλλαγμένα ή μη στελέχη. Όλα τα υπό εξέταση στελέχη εντεροκόκκου έφεραν τη μετάλλαξη G2576T. Στους **πίνακες 29** και **30** παρατίθενται παραδείγματα στοίχισης αλληλουχιών *Enterococcus faecium* και *Enterococcus faecalis* με τις αλληλουχίες *Enterococcus faecium* strain ATCC 27273 (Accession number: EU547788.1) και *Enterococcus faecalis* strain IJ-12 (Accession number: gEU547785.1) αντίστοιχα που ελήφθησαν από την Τράπεζα Γονιδιακών πληροφοριών (GenBank). Με μπλε έχει επισημανθεί η μετάλλαξη G2576T (σύμφωνα με την αρίθμηση του 23SrRNA σε *E. coli*).

```
>gi|183673673|gb|EU547788.1| Enterococcus faecium strain ATCC 27273 23S ribosomal
RNA gene,
partial sequence

Query 300   TGGTTGGAAATCATTCTGAAGAGTGTAAGGCAGAGGGAGCTTGACTGCGAGACCAACAA 359
          |||
Sbjct 2303  TGGTTGGAAATCATTCTGAAGAGTGTAAGGCAGAGGGAGCTTGACTGCGAGACCAACAA 2362

Query 360   GTCGAGCAGGGACGAAAGTCGGGCTTAGTGATCCGGTGGTTCCGCATGGAAGGGCCATCG 419
          |||
Sbjct 2363  GTCGAGCAGGGACGAAAGTCGGGCTTAGTGATCCGGTGGTTCCGCATGGAAGGGCCATCG 2422

Query 420   CTCAACGGATAAAAGCTACCCCTGGGGATAACAGGCTTATCTCCCCAAGAGTCCACATCG 479
          |||
Sbjct 2423  CTCAACGGATAAAAGCTACCCCTGGGGATAACAGGCTTATCTCCCCAAGAGTCCACATCG 2482

Query 480   ACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCGTCGCATCCTGGGGCTGTAGTCGGTCCCA 539
          |||
Sbjct 2483  ACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCGTCGCATCCTGGGGCTGTAGTCGGTCCCA 2542

Query 540   AGGGTTGGGCTGTTCGCCCATTAAGAGCGGCACGAGCTGGGTTTCAGAACGTCGTGAGAC 599
          |||
Sbjct 2543  AGGGTTGGGCTGTTCGCCCATTAAGAGCGGCACGCGAGCTGGGTTTCAGAACGTCGTGAGAC 2602

Query 600   AGTTCGGTCCCTATCCGTCGCGGGCGTTGGAAATTTGAGAGGAGCTGTCCTTAGTACGAG 659
          |||
Sbjct 2603  AGTTCGGTCCCTATCCGTCGCGGGCGTTGGAAATTTGAGAGGAGCTGTCCTTAGTACGAG 2662

Query 660   AGGACCGGGATGGACTTACCGCTGGTGTACAGTTGTTCTGCCAAGGGCATTGCTGGGTA 719
          |||
Sbjct 2663  AGGACCGGGATGGACTTACCGCTGGTGTACAGTTGTTCTGCCAAGGGCATTGCTGGGTA 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 29. 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
Query 361 TCGAGCAGGGACGAAAGTCGGGCTTAGTGATCCGGTGGTTCCGCATGGAAGGGCCATCGC 420
|||
Sbjct 2372 TCGAGCAGGGACGAAAGTCGGGCTTAGTGATCCGGTGGTTCCGCATGGAAGGGCCATCGC 2431

Query 421 TCAACGGATAAAAGCTACCCCTGGGGATAACAGGCTTATCTCCCCAAGAGTCCACATCGA 480
|||
Sbjct 2432 TCAACGGATAAAAGCTACCCCTGGGGATAACAGGCTTATCTCCCCAAGAGTCCACATCGA 2491

Query 481 CGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCGTCGCATCCTGGGGCTGTAGTCGGTCCCAA 540
|||
Sbjct 2492 CGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCGTCGCATCCTGGGGCTGTAGTCGGTCCCAA 2551

Query 541 GGGTTGGGCTGTTCGCCCATTAAAGCGGCACGCTAGCTGGGTTCAGAACGTCGTGAGACA 600
|||
Sbjct 2552 GGGTTGGGCTGTTCGCCCATTAAAGCGGCACGCGAGCTGGGTTCAGAACGTCGTGAGACA 2611

Query 601 GTTCGGTCCCTATCCGTCGCGGGCGTTGGAAATTGAGAGGAGCTGTCCTTAGTACGAGA 660
|||
Sbjct 2612 GTTCGGTCCCTATCCGTCGCGGGCGTTGGAAATTGAGAGGAGCTGTCCTTAGTACGAGA 2671

Query 661 GGACCGGGATGGACTTACCGCTGGTGTACCAGTTGTTCTGCCAAGGGCATTTGCTGGGTAG 720
|||
Sbjct 2672 GGACCGGGATGGACTTACCGCTGGTGTACCAGTTGTTCTGCCAAGGGCATTTGCTGGGTAG 2731

Query 721 CTATGTAGGGAAGGGATAAACGCTGAAAGCATCTAAGTGTGAAGCCACCTCAAGATGAG 780
|||
Sbjct 2732 CTATGTAGGGAAGGGATAAACGCTGAAAGCATCTAAGTGTGAAGCCACCTCAAGATGAG 2791

```

Πίνακας 30. Παράθεση παραδείγματος σύγκρισης αλληλουχίας ενός στελέχους *Enterococcus faecalis* με αλληλουχία κατατεθειμένη στην GenBank.

Π.5.2 Αποτελέσματα ενίσχυσης κάθε αντιγράφου του γονιδίου 23S rRNA των εντεροκόκκων ξεχωριστά

Η ενίσχυση των 6 αντιγράφων του γονιδίου 23S rRNA των στελεχών *E. faecium* και των 4 αντιγράφων του γονιδίου 23S rRNA των στελεχών *E. faecalis* έγινε με την εκτέλεση semi-nested PCR. Τα προϊόντα ενίσχυσης με τα 6 και 4 αντίστοιχα ζεύγη εκκινητών (όπου αντιστοιχεί ένα ζεύγος εκκινητών για κάθε αντίγραφο του γονιδίου), κατόπιν ενισχύθηκαν εσωτερικά περαιτέρω με ένα άλλο ζεύγος εκκινητών για την πιθανή περιοχή πρόσδεσης της λινεζολίδης, που είχε ως αποτέλεσμα ένα προϊόν μεγέθους 908 bp.

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 *E. faecalis* συγκρίθηκαν με την αλληλουχία *Enterococcus faecalis* V583 (Accession number: AE016830.1) και τα στελέχη *E. faecium* με την αλληλουχία *Enterococcus faecium* Aus0004 (Accession

number: NC_017022.1) που ελήφθησαν από την Τράπεζα Γονιδιακών πληροφοριών (GenBank), ώστε να προσδιοριστούν οι ακριβείς θέσεις των μεταλλάξεων. Στον **πίνακα 32** παραθέτουμε ένα παράδειγμα στοίχισης μιας αλληλουχίας ενός αντιγράφου του 23S rRNA ενός στελέχους *E. faecalis* με την αλληλουχία *Enterococcus faecalis* V583 (Accession number: AE016830.1) και στον **πίνακα 33** ένα παράδειγμα στοίχισης μιας αλληλουχίας ενός αντιγράφου του 23S rRNA ενός στελέχους *E. faecium* με την αλληλουχία *Enterococcus faecium* Aus0004 (Accession number: NC_017022.1) που ελήφθησαν από την Τράπεζα Γονιδιακών πληροφοριών (GenBank). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης του κάθε αντιγράφου ξεχωριστά σε κάθε στέλεχος εντεροκόκκου παρατίθενται στον **πίνακα 31** και γίνεται συσχέτιση του αριθμού των μεταλλαγμένων αλληλίων με το επίπεδο της MIC στη λινεζολίδη. Η μετάλλαξη που εντοπίστηκε σε όλα αυτά τα στελέχη ήταν η G2576T. Συγκεκριμένα από τα 6 αντίγραφα των στελεχών *E. faecium* στα στελέχη με MIC 8 µg/ml παρατηρήθηκαν 2 αντίγραφα μεταλλαγμένα, στα στελέχη με MIC 12 µg/ml παρατηρήθηκαν 3 αντίγραφα μεταλλαγμένα ενώ στα στελέχη με MIC 16 µg/ml παρατηρήθηκαν 4 αντίγραφα μεταλλαγμένα. Αντίστοιχα στα στελέχη *E. faecalis* από τα 4 αντίγραφα του γονιδίου στα στελέχη με MIC 6 µg/ml και MIC 8 µg/ml παρατηρήθηκαν 2 αντίγραφα μεταλλαγμένα ενώ στα στελέχη με MIC 12 µg/ml και MIC 16 µg/ml παρατηρήθηκαν 3 αντίγραφα μεταλλαγμένα.

Με μπλε έχει επισημανθεί η μετάλλαξη G2576T (σύμφωνα με την αρίθμηση του 23SrRNA σε *E. coli*).

α/α στελέχους Εντεροκόκκου	Αντίγραφο 23S rRNA A	Αντίγραφο 23S rRNA B	Αντίγραφο 23S rRNA C	Αντίγραφο 23S rRNA D	Αντίγραφο 23S rRNA E	Αντίγραφο 23S rRNA F	Δινεζολίδη MIC (μg/ml)
<i>E. faecium</i>							
1	Όχι	G2576T	Όχι	G2576T	G2576T	G2576T	16
2A	G2576T	Όχι	Όχι	G2576T	Όχι	G2576T	12
2B	Όχι	G2576T	G2576T	Όχι	Όχι	Όχι	8
3	Όχι	Όχι	G2576T	G2576T	G2576T	Όχι	12
4A	Όχι	G2576T	Όχι	Όχι	G2576T	G2576T	12
4B	G2576T	G2576T	Όχι	Όχι	Όχι	G2576T	12
4C	G2576T	G2576T	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	8
5	G2576T	G2576T	Όχι	Όχι	G2576T	G2576T	16
6A	Όχι	G2576T	G2576T	G2576T	Όχι	G2576T	16
7	G2576T	G2576T	G2576T	Όχι	G2576T	Όχι	16
8	Όχι	G2576T	G2576T	Όχι	Όχι	Όχι	8
9A	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	G2576T	G2576T	8
9B	Όχι	Όχι	G2576T	G2576T	Όχι	Όχι	8
10	G2576T	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	G2576T	8
11A	G2576T	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	G2576T	8
11B	Όχι	G2576T	G2576T	Όχι	Όχι	Όχι	8
12	G2576T	Όχι	Όχι	G2576T	Όχι	Όχι	8
13	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	G2576T	G2576T	8
14	Όχι	G2576T	Όχι	Όχι	Όχι	G2576T	8
<i>E. faecalis</i>							
15	Όχι	Όχι	G2576T	G2576T	-	-	6
6B	Όχι	G2576T	G2576T	G2576T	-	-	12
16	G2576T	Όχι	G2576T	G2576T	-	-	12
17	G2576T	Όχι	Όχι	G2576T	-	-	8
18	Όχι	G2576T	G2576T	G2576T	-	-	16
19	G2576T	Όχι	G2576T	G2576T	-	-	12

Πίνακας 31. Μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στα αντίγραφα του γονιδίου 23S rRNA με την μέθοδο του προσδιορισμού αλληλουχίας βάσεων στα στελέχη των εντεροκόκκων .

>gb|AE016830.1| *Enterococcus faecalis* V583, complete genome

```

Query 17      ACCTATCTACCTAATCATCTCTCAGGGGTCTTACTTTCTTAAAGAAATGGGAAATCTCAT 76
                |||
Sbjct 253095  ACCTATCTACCTAATCATCTCTCAGGGGTCTTACTTTCTTAAAGAAATGGGAAATCTCAT 253036

Query 77      CTTGAGGTGGGCTTCACACTTAGATGCTTTGAGCGTTTATCCCTTCCCTACATAGCTACC 136
                |||
Sbjct 253035  CTTGAGGTGGGCTTCACACTTAGATGCTTTGAGCGTTTATCCCTTCCCTACATAGCTACC 252976

Query 137     CAGCAATGCCCTTGGCAGAACAACCTGGTACACCAGCGGTAAGTCCATCCCGGTCCTCTCG 196
                |||
Sbjct 252975  CAGCAATGCCCTTGGCAGAACAACCTGGTACACCAGCGGTAAGTCCATCCCGGTCCTCTCG 252916

Query 197     TACTAAGGACAGCTCCTCTCAAATTTCCAACGCCCGCGACGGATAGGGACCGAACTGTCT 256
                |||
Sbjct 252915  TACTAAGGACAGCTCCTCTCAAATTTCCAACGCCCGCGACGGATAGGGACCGAACTGTCT 252856

Query 257     CACGACGTTCTGAACCCAGCTTCGCGTGCCGCTTTAATGGGCGAACAGCCCAACCCCTTGGG 316
                |||
Sbjct 252855  CACGACGTTCTGAACCCAGCTTCGCGTGCCGCTTTAATGGGCGAACAGCCCAACCCCTTGGG 252796


Query 317     ACCGACTACAGCCCCAGGATGCGACGAGCCGACATCGAGGTGCCAAACCTCCCGTCGAT 376
                |||
Sbjct 252795  ACCGACTACAGCCCCAGGATGCGACGAGCCGACATCGAGGTGCCAAACCTCCCGTCGAT 252736

Query 377     GTGGACTCTTGGGGGAGATAAGCCTGTTATCCCCAGGGTAGCTTTTATCCGTTGAGCGAT 436
                |||
Sbjct 252735  GTGGACTCTTGGGGGAGATAAGCCTGTTATCCCCAGGGTAGCTTTTATCCGTTGAGCGAT 252676

```

Query	437	GGCCCTTCCATGCGGAACACCGGATCACTAAGCCCGACTTTCGTCCCTGCTCGACTTGT	496
Sbjct	252675	GGCCCTTCCATGCGGAACACCGGATCACTAAGCCCGACTTTCGTCCCTGCTCGACTTGT	252616
Query	497	AGGTCTCGCAGTCAAGCTCCCTTCTGCCTTTTACACTCTTCGAATGATTTCCAACCATCT	556
Sbjct	252615	AGGTCTCGCAGTCAAGCTCCCTTCTGCCTTTTACACTCTTCGAATGATTTCCAACCATCT	252556
Query	557	GAGGGAACCTTTGGGCGCCTCCGTTACCTTTTAGGAGGCGACCGCCCCAGTCAAACAGCC	616
Sbjct	252555	GAGGGAACCTTTGGGCGCCTCCGTTACCTTTTAGGAGGCGACCGCCCCAGTCAAACAGCC	252496
Query	617	CATCTGACACTGTCTCCACACGATTAGTGGTGCGGGTTAGAGGGTTCATAACACAAGG	676
Sbjct	252495	CATCTGACACTGTCTCCACACGATTAGTGGTGCGGGTTAGAGGGTTCATAACACAAGG	252436
Query	677	GTAGTATCCCACACGCGCTCCTCCGAAACTAGCGTTCCGGTCTCATCGGCTCCTACCTA	736
Sbjct	252435	GTAGTATCCCACACGCGCTCCTCCGAAACTAGCGTTCCGGTCTCATCGGCTCCTACCTA	252376
Query	737	TCCTGTACATGTGGTACAAACACTCAATATCAAACACTACAGTAAAGCTCCATGGGGTCTTT	796
Sbjct	252375	TCCTGTACATGTGGTACAAACACTCAATATCAAACACTACAGTAAAGCTCCATGGGGTCTTT	252316
Query	797	CCGTCCTGTGCGGGTAACCTGCATCTTCACAGGTACTAAAATTTACCGAGTCTCTCGT	856
Sbjct	252315	CCGTCCTGTGCGGGTAACCTGCATCTTCACAGGTACTAAAATTTACCGAGTCTCTCGT	252256

Πίνακας 32. Παράθεση παραδείγματος σύγκρισης αλληλουχίας ενός αντιγράφου του 23S rRNA ενός στελέχους εντεροκόκκου *E. faecalis* με αλληλουχία κατατεθειμένη στην GenBank.

>  gb|CP003351.1| *Enterococcus faecium* Aus0004, complete genome
Length=2955294

Query	17	TCCTGA-CTATCTACCTGATCATCTCTCAGGGATCTTACTTTCTTAAAGAAATGGGAAAT	75
Sbjct	2554180	TCCTGACCTATCTACCTGATCATCTCTCAGGGATCTTACTTTCTTAAAGAAATGGGAAAT	2554239
Query	76	CTCATCTTGAGGTGGGCTTCACACTTAGATGCTTTCAGCGTTTATCCCTTCCTACATAG	135
Sbjct	2554240	CTCATCTTGAGGTGGGCTTCACACTTAGATGCTTTCAGCGTTTATCCCTTCCTACATAG	2554299
Query	136	CTACCCAGCAATGCCCTTGCGAGAACAACCTGGTACACAGCGGTAAGTCCATCCCGGTCC	195
Sbjct	2554300	CTACCCAGCAATGCCCTTGCGAGAACAACCTGGTACACAGCGGTAAGTCCATCCCGGTCC	2554359
Query	196	TCTCGTACTAAGGACAGCTCCTCTCAAATTTCCAACGCCCCGACGATAGGGACCGAAC	255
Sbjct	2554360	TCTCGTACTAAGGACAGCTCCTCTCAAATTTCCAACGCCCCGACGATAGGGACCGAAC	2554419
Query	256	TGTCTCACGACGTTCTGAACCCAGCTGCGTGCCGCTTTAATGGGCGAACAGCCCAACCC	315
Sbjct	2554420	TGTCTCACGACGTTCTGAACCCAGCTGCGTGCCGCTTTAATGGGCGAACAGCCCAACCC	2554479
Query	316	TTGGGACCGACTACAGCCCCAGGATGCGACGAGCCGACATCGAGGTGCCAAACCTCCCCG	375
Sbjct	2554480	TTGGGACCGACTACAGCCCCAGGATGCGACGAGCCGACATCGAGGTGCCAAACCTCCCCG	2554539
Query	376	TCGATGTGGACTCTTGGGGGAGATAAGCCTGTTATCCCCAGGGTAGCTTTTATCCGTTGA	435
Sbjct	2554540	TCGATGTGGACTCTTGGGGGAGATAAGCCTGTTATCCCCAGGGTAGCTTTTATCCGTTGA	2554599
Query	436	GCGATGGCCCTTCCATGCGGAACACCGGATCACTAAGCCCGACTTTCGTCCCTGCTCGA	495
Sbjct	2554600	GCGATGGCCCTTCCATGCGGAACACCGGATCACTAAGCCCGACTTTCGTCCCTGCTCGA	2554659
Query	496	CTTGTGTGGTCTCGCAGTCAAGCTCCCTTCTGCCTTTTACACTCTTCGAATGATTTCCAACC	555
Sbjct	2554660	CTTGTGTGGTCTCGCAGTCAAGCTCCCTTCTGCCTTTTACACTCTTCGAATGATTTCCAACC	2554719
Query	556	ATTCTGAGGGAACCTTTGGGCGCCTCCGTTACCTTTTAGGAGGCGACCGCCCCAGTCAA	615
Sbjct	2554720	ATTCTGAGGGAACCTTTGGGCGCCTCCGTTACCTTTTAGGAGGCGACCGCCCCAGTCAA	2554779

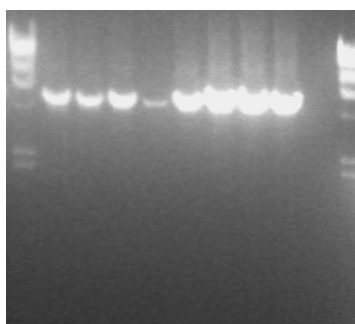
Query	616	CTGCCCATCTGACACTGTCTCCACCACGATTAGTGGTGCGGGTTARAGTGGCCATAACG	675
Sbjct	2554780	CTGCCCATCTGACACTGTCTCCACCACGATTAGTGGTGCGGGTTAGAGTGGCCATAACG	2554839
Query	676	CAGGGGTAGTATCCACCAGCGCCTCCATCGAAACTAGCGTTCCGATTTCTACGGCTCCT	735
Sbjct	2554840	CAGGGGTAGTATCCACCAGCGCCTCCATCGAAACTAGCGTTCCGATTTCTACGGCTCCT	2554899
Query	736	ACCTATCCTGTACATGCGGTACAGACACTCAATATCAAACCTACAGTAAAGCTCCATGGGG	795
Sbjct	2554900	ACCTATCCTGTACATGCGGTACAGACACTCAATATCAAACCTACAGTAAAGCTCCATGGGG	2554959
Query	796	TCTTTCCGTCCTGTGCGGGTAACCTGCATCTTCACAGGTACTAAAATTTACCGAGTCT	855
Sbjct	2554960	TCTTTCCGTCCTGTGCGGGTAACCTGCATCTTCACAGGTACTAAAATTTACCGAGTCT	2555019
Query	856	CTCGTTGAGACAGTGCCCAAATCGTTAC	884
Sbjct	2555020	CTCGTTGAGACAGTGCCCAA-TCGTTAC	2555047

Πίνακας 33. Παράθεση παραδείγματος σύγκρισης αλληλουχίας ενός αντιγράφου του 23S rRNA ενός στελέχους εντεροκόκκου *E. faecium* με αλληλουχία κατατεθειμένη στην GenBank.

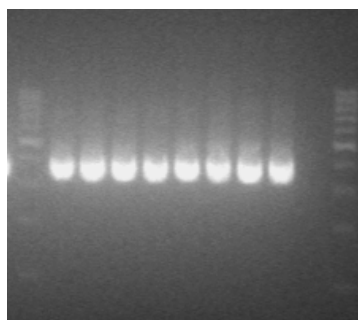
II.6 ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΙ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR

II.6.1 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου 23S rRNA των σταφυλοκόκκων

Τα προϊόντα ενίσχυσης με τα 6 ζεύγη εκκινητών (όπου αντιστοιχεί ένα ζεύγος εκκινητών για κάθε αντίγραφο του γονιδίου 23S rRNA), κατόπιν ενισχύθηκαν εσωτερικά περαιτέρω με ένα άλλο ζεύγος εκκινητών που είχε ως αποτέλεσμα ένα τμήμα μεγέθους 419 bp. Στην **εικόνα 17** φαίνεται ενδεικτικά η ενίσχυση του πρώτου αντιγράφου του γονιδίου 23S rRNA και στην **εικόνα 18** η ενίσχυση του εσωτερικού τμήματος του αντιγράφου αυτού.



Εικόνα 17. Ενδεικτικά αποτελέσματα ενίσχυσης με PCR του πρώτου αντιγράφου του 23S rRNA των σταφυλοκόκκων. Στα άκρα της εικόνας φαίνεται δείκτης lambda DNA/Hind III (Fermentas) του μοριακού μεγέθους των 125-23130 bp.



Εικόνα 18. Ενδεικτικά αποτελέσματα ενίσχυσης με PCR του εσωτερικού τμήματος του πρώτου αντιγράφου του 23S rRNA των σταφυλοκόκκων. Στα άκρα της εικόνας φαίνεται δείκτης GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas) του μοριακού μεγέθους των 100-1000 bp.

Π.6.2 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: 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 έδω σε ποικίλες μεταλλάξεις. Εικοσιτρία 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 34**. Στον **πίνακα 35** παραθέτουμε ένα παράδειγμα στοίχισης μιας αλληλουχίας ενός αντιγράφου του 23S rRNA ενός στελέχους σταφυλοκόκκου με την αλληλουχία *Staphylococcus epidermidis* strain 82-1682A (Accession number: AY204541.1) που ελήφθησε από την Τράπεζα Γονιδιακών πληροφοριών (GenBank). Με μπλε έχουν επισημανθεί οι ανιχνευμένες μεταλλάξεις.

a/a Στελέχους	Είδος	rrlA	rrlB	rrlC	rrlD	rrlE	rrlF
A2548	<i>S. epidermidis</i>	T2504A C2534T	Όχι	C2534T T2504A	T2504A	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A2490	<i>S. epidermidis</i>	C2356T G2576T	T2334C G2576T	Όχι	C2356T G2576T	C2356T G2576T	C2356T G2576T
A2453	<i>S. epidermidis</i>	Όχι	Όχι	G2576T	C2534T G2576T	C2534T G2576T	C2534T G2576T
A2519	<i>S. epidermidis</i>	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A2561(1)	<i>S. epidermidis</i>	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A2561(2)	<i>S. epidermidis</i>	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A2562(1)	<i>S. epidermidis</i>	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A2562(2)	<i>S. epidermidis</i>	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A2570	<i>S. epidermidis</i>	Όχι	Όχι	Όχι	C2534T G2576T	C2534T G2576T	C2534T G2576T
A2549	<i>S. epidermidis</i>	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
E371	<i>S. epidermidis</i>	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A2544	<i>S. epidermidis</i>	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A2545	<i>S. epidermidis</i>	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A41	<i>S. epidermidis</i>	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	C2534T G2576T	T2504A C2534T
A55	<i>S. epidermidis</i>	T2504A C2534T	Όχι	T2504A	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A2864	<i>S. epidermidis</i>	T2504A C2534T	Όχι	T2504A	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
217	<i>S. epidermidis</i>	C2534T	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A	T2504A C2534T
6119	<i>S. epidermidis</i>	T2504A	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
651	<i>S. epidermidis</i>	T2504A C2534T	Όχι	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
605-2	<i>S. epidermidis</i>	T2504A	Όχι	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A1521	<i>S. epidermidis</i>	T2504A C2534T	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
A1702	<i>S. epidermidis</i>	G2576T	G2576T	G2576T	C2534T G2576T	G2576T	C2534T G2576T
Y209	<i>S. epidermidis</i>	T2504A C2534T	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
158	<i>S. capitis</i>	T2319C G2576T	T2319C G2576T	T2319C G257T	T2319C G2576T	T2319C G2576T	T2319C G2576T
560	<i>S. epidermidis</i>	T2504A C2534T	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
71	<i>S. capitis</i>	T2319C G2576T	T2319C G2576T	T2319C G2576T	T2319C G2576T	T2319C G2576T	T2319C G2576T
65	<i>S. epidermidis</i>	T2504A C2534T	T2504A	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
200	<i>S. epidermidis</i>	T2504A C2534T	T2504A C2534T	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T
160-2	<i>S. capitis</i>	T2319C C2354T	T2319C G2576T	T2319C G2576T	T2319C G2576T	T2319C G2576T	T2319C G2576T
A1929	<i>S. epidermidis</i>	T2504A C2534T	T2504A	Όχι	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T

Πίνακας 34 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

```

Query   1      GCGCTCAAAGGTTCCCTCAGAATGGTTGGAAATCATTCATAGAGTGTAAGGCATAAGG   60
          |||
Sbjct   301    GCGCTCAAAGGTTCCCTCAGAATGGTTGGAAATCATTCATAGAGTGTAAGGCATAAGG   360

Query   61      GAGCTTGACTGCGAGACCTACAAGTCGAGCAGGGTCGAAAGACGGACTTAGTGATCCGGT   120
          |||
Sbjct   361    GAGCTTGACTGCGAGACCTACAAGTCGAGCAGGGTCGAAAGACGGACTTAGTGATCCGGT   420

Query   121     GGTTCGCGATGGAAGGGCCATCGCTCAACGGATAAAAGCTACCCCGGGGATAACAGGCTT   180
          |||
Sbjct   421     GGTTCGCGATGGAAGGGCCATCGCTCAACGGATAAAAGCTACCCCGGGGATAACAGGCTT   480

Query   181     ATCTCCCCAAGAGTTTACATCGACGGGGAGGTTTGGCACCTCGAAGTCGGCTCATCGCA   240
          |||
Sbjct   481     ATCTCCCCAAGAGTTTACATCGACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCATCGCA   540

Query   241     TCCTGGGGCTGTAGTTGGTCCCAAGGGTTGGGCTGTTTCGCCCATTAAGCGGTACGCGAG   300
          |||
Sbjct   541     TCCTGGGGCTGTAGTTCGGTCCCAAGGGTTGGGCTGTTTCGCCCATTAAGCGGTACGCGAG   600

Query   301     CTGGGTTTCAGAACGTCGTGAGACAGTTTCGGTCCCTATCCGTCGTGGGCGTAGGAAATTTG   360
          |||
Sbjct   601     CTGGGTTTCAGAACGTCGTGAGACAGTTTCGGTCCCTATCCGTCGTGGGCGTAGGAAATTTG   660

Query   361     AGAGGAGCTGTCCTTAGTACGAGAGGACCGGGA   393
          |||
Sbjct   661     AGAGGAGCTGTCCTTAGTACGAGAGGACCGGGA   693

```

Πίνακας 35. Παράθεση παραδείγματος σύγκρισης αλληλουχίας ενός στελέχους σταφυλοκόκκου με αλληλουχία κατατεθειμένη στην GenBank.

Π.6.3 Αποτελέσματα ανίχνευσης του γονιδίου της μεθυλοτρανσφεράσης Cfr και ενίσχυσης των γονιδίων *rplC*, *rplD* και *rplV* που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες L3, L4 και L22

Το γονίδιο *cfr* δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα 30 υπό μελέτη LR στελέχη σταφυλοκόκκων.

Τα PCR προϊόντα των 8 στελεχών που επιλέχθηκαν (A2562(1), A2570, E371, A2864, 217, 605-2, A1702, A2490) αντιπροσώπευαν 3 τύπους PFGE (5 στελέχη τον τύπο I, 2 στελέχη τον τύπο II και 1 στέλεχος τον τύπο III) και αναλύθηκαν με τη μέθοδο αλληλούχισης του γενετικού υλικού (DNA sequencing), για την ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια *rplC*, *rplD* και *rplV* που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες L3, L4 και L22 (**Πίνακας 38**). Οι αλληλουχίες βάσεων που ανευρέθηκαν στα υπό εξέταση στελέχη συγκρίθηκαν με την αλληλουχία *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (Accession number: NC_004461.1) που ελήφθησε από την Τράπεζα Γονιδιακών πληροφοριών (GenBank), ώστε να προσδιοριστούν οι ακριβείς θέσεις των μεταλλάξεων. Κατόπιν τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν και στο επίπεδο της πρωτεϊνικής αλληλουχίας, για εντοπισμό μη σιωπηλών μεταλλάξεων.

Τα 5 στελέχη που είχαν υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη (MIC >512 µg/ml) έφεραν δύο πιθανά σημαντικές αμινοξικές αντικαταστάσεις (G152D και D159Y) και μία λιγότερο σημαντική (L101V) στην πρωτεΐνη L3. Συγκεκριμένα, η αντικατάσταση G152D περιλαμβάνει τη μετατόπιση από ένα μικρό αμινοξύ σε ένα αρνητικό υδρόφιλο και η αντικατάσταση D159Y αντικαθιστά ένα υδρόφιλο με ένα υδρόφοβο αμινοξύ. Δεν παρατηρήθηκε καμία αμινοξική αλλαγή στις πρωτεΐνες L4 και L22 των στελεχών αυτών. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές αμινοξέων σε καμία από τις πρωτεΐνες L3, L4 και L22 στα υπόλοιπα 3 στελέχη (που εμφανίζουν πιο χαμηλή αντοχή στη λινεζολίδη). Στον **πίνακα 36** παραθέτουμε ένα παράδειγμα στοίχισης μιας αλληλουχίας του γονιδίου *rplC* ενός στελέχους σταφυλοκόκκου με την αλληλο νχία *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (Accession number: NC_004461.1) που ελήφθησε από την Τράπεζα Γονιδιακών πληροφοριών (GenBank). Με μπλε έχουν επισημανθεί οι ανιχνευμένες μετάλλαξεις.

>gi 27316888 gb AE015929.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228, complete genome				
Query	8	AATTAGCCATTATGCAATTTCTCTCCTTTTCGCTTTTAATTAATTTATTACCTtttttttATT	67	
Sbjct	1866354	AATTAGCCATTATGCAATTTCTCTCCTTTTCGCTTCTTAATTAATTTATTACCTTTTTTTTATT	1866413	
Query	68	GAAGTTGTGATTTCTACTAAACCTTTTCTAGGTCCAGGTACATTGCCTTTTACTAAAATC	127	
Sbjct	1866414	GAAGTTGTGATTTCTACTAAACCTTTTCTAGGTCCAGGTACATTGCCTTTTACTAAAATC	1866473	
Query	128	ACACTATTTTCAGTGTCAACTTGAACGACTTCTAAGTTTGAACAGTAACAGTGTTCCTCA	187	
Sbjct	1866474	ACACTATTTTCAGTGTCAACTTGAACGACTTCTAAGTTTGAACAGTAACAGTGTTCCTCA	1866533	
Query	188	CCCATACGTCCTGGCATTTTTGTCTCTTAAACACTTTTGAAGCGTATGATGCCATACCT	247	
Sbjct	1866534	CCCATACGTCCTGGCATTTTTGTCTCTTAAACACTTTTGAAGCGTCTGATGCCATACCT	1866593	
Query	248	ACAGAATCTGGCGCTCTATGGAAATGAGAACCGTGAGCCATTGGTCCACGACCTTGTCCA	307	
Sbjct	1866594	ACAGAGCCTGGCGCTCTATGGAAATGAGAACCGTGAGCCATTGGTCCACGACCTTGTCCA	1866653	
Query	308	TGACGTTTAAATAGCACCTTGGAAACCTTTACCTTTTGAACGCCTGTAACATCAATGATG	367	
Sbjct	1866654	TGACGTTTAAATAGCACCTTGGAAACCTTTACCTTTTGAACGCCTGTAACATCAATGATG	1866713	
Query	368	TCACCAGTTTCGAATGTATCAACTGAGACTTCTTGACCTATTCGTATTCGTCAACGTTA	427	
Sbjct	1866714	TCACCAGTTTCGAATGTATCAACTGAGACTTCTTGACCTAGTTCGTATTCGTCAACGTTA	1866773	
Query	428	ACGTTGCGGAATTCACGAATGAAGCGCTTAGGTGCTGTGTGAGCTTTTTCATGACCT	487	
Sbjct	1866774	ACGTTGCGGAATTCACGAATGAAGCGCTTAGGTGCTGTGTGAGCTTTTTCATGACCT	1866833	
Query	488	TCAGCTGGTTTATTAGCATATTTATTAGATTAGAACCTTTCTTATATGCTTGTATTATCT	547	
Sbjct	1866834	TCAGCTGGTTTATTAGCATATTTATTAGATTAGAACCTTTCTTATATGCTTGTATTATCT	1866893	
Query	548	TCAAAACCTACTTGGATAGCATTATAAACCATCAACTTCTTCAGTTTTCTTTTGTAAATACA	607	
Sbjct	1866894	TCAAAACCTACTTGGATAGCATTATAAACCATCAACTTCTTCAGTTTTCTTTTGTAAATACA	1866953	
Query	608	ACGTTTGTACTAGCTTCTACAACTGTTACAGGGATTAAATTCACCATTTTCACCGAAAAC	667	
Sbjct	1866954	ACGTTTGTACTAGCTTCTACAACTGTTACAGGGATTAAATTCACCATTTTCACCGAAAAC	1867013	

```

Query 668      TGTGTCATCCCAATTTTCTTCCTAAGATTTCCTTTGGTCATCGAAAGTCCACCTCCTATA 727
                |||
Sbjct 1867014  TGTGTCATCCCAATTTTCTTCCTAAGATTTCCTTTGGTCATCGAAAGTCCACCTCCTATA 1867073

Query 728      TTGTTCTATTATAAATTTAATTTTCGATGTCTACACCTGATGGTAAGTTTAAGCCCAT 783
                |||
Sbjct 1867074  TTGTTCTATTATAAATTTAATTTTCGATGTCTACACCTGATGGTAAGTTTAAGCCCAT 1867129

```

Πίνακας 36. Παράθεση παραδείγματος σύγκρισης αλληλουχίας ενός στελέχους σταφυλοκόκκου με αλληλουχία κατατεθειμένη στην GenBank και εντοπισμός των μεταλλάξεων στην αλληλουχία του γονιδίου *rplC* που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη L3.

Κατατέθηκε στη Τράπεζα Γονιδιακών πληροφοριών (GenBank) η αλληλουχία της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης L3 που εντοπίστηκε στα στελέχη *S. epidermidis* με αυξημένη αντοχή στη λινεζολίδη με accession number στην GenBank: JN862970.1 όπως παρατίθεται στον **Πίνακα 37**.

***Staphylococcus epidermidis* isolate E371 50S ribosomal protein L3 (L3) gene, complete cds**

GenBank: JN862970.1

```

LOCUS      JN862970      663 bp DNA linear BCT 17-JAN-2012
DEFINITION Staphylococcus epidermidis isolate E371 50S ribosomal protein L3(L3)
gene, complete cds.
ACCESSION  JN862970
VERSION    JN862970.1  GI:372001236
KEYWORDS   .
SOURCE     Staphylococcus epidermidis
ORGANISM   Staphylococcus epidermidis
Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Staphylococcus.
REFERENCE  1 (bases 1 to 663)
AUTHORS    Ntokou,E., Zarkotou,O., Stathopoulos,C., Tsakris,A. and
Pournaras,S.
TITLE      Linezolid-Dependent Staphylococcus epidermidis
JOURNAL    Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 663)
AUTHORS    Ntokou,E., Zarkotou,O., Stathopoulos,C., Tsakris,A. and
Pournaras,S.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (14-OCT-2011) Microbiology, Medical School, University of
Thessaly, Viopolis, Larissa 41110, Greece
FEATURES   Location/Qualifiers
            source          1..663
                        /organism="Staphylococcus epidermidis"
                        /mol_type="genomic DNA"
                        /isolate="E371"
                        /isolation_source="blood culture"
                        /db_xref="taxon:1282"
gene        complement(1..663)
            /gene="L3"
CDS         complement(1..663)
            /gene="L3"
            /codon_start=1
            /transl_table=11
            /product="50S ribosomal protein L3"
            /protein_id="AEX65808.1"
            /db_xref="GI:372001237"
            /translation="MTKGILGRKIGMTQVFGENGELIPVTVVEASQNVVLQKKTEEVD

```

GYNAIQVGFEDKQAYKKGSKSNKYANKPAEGHAKKADTAPKRFIREFRNVNVDEYEVG
 QEVSVDTFETGDIIDVTGVSKGKFQGAIKRHGQGRGPMAGSHFHRAPDSVGMASYA
 SKVFKGQKMPGRMGNTVTQVNLVVQVDTENSIVLVKGNVPGPKGLVEITTSIKKG
 NK"

ORIGIN

```

1  ttattttatta ctttttttta ttgaagttgt gatttctact aaaccttttt taggtccagg
61  tacattgcct ttactaaaa tcacactatt ttcagtgtca acttgaacga cttctaagtt
121 ttgaacagta acagtgtttc caccatacag tcctggcatt ttttgcctt taaacacttt
181 tgaagcgtaa gatgccatac ctacagaatc tggcgctcta tggaaatgag aaccgtgagc
241 cattgggtcca cgacctgtgc catgacgttt aatagcacct tggaaacctt taccttttga
301 aacgcctgta acatcaatga tgtcaccagt ttcgaatgta tcaactgaga cttcttgacc
361 tacttcgtat tcgtcaacgt taacgttgcg gaattcacga atgaagcgct taggtgctgt
421 gtcagctttt ttagcatgac cttcagctgg tttattagca tatttattag atttagaacc
481 tttcttatat gcttggtttat cttcaaaacc tacttggaata gcattataac catcaacttc
541 ttcagttttt ttttgaata caacgttttg actagcttct acaactgtta cagggtattaa
601 ttcaccattt tcaccgaaaa cttgtgtcat cccaattttt cttcctaaga ttcctttggt
661 cat //
```

Πίνακας 37. Παράθεση αλληλουχία της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης L3 που εντοπίστηκε στα στελέχη *S. epidermidis* με αυξημένη αντοχή στη λινεζολίδη με που κατατέθηκε στη GenBank με accession number GenBank: JN862970.1

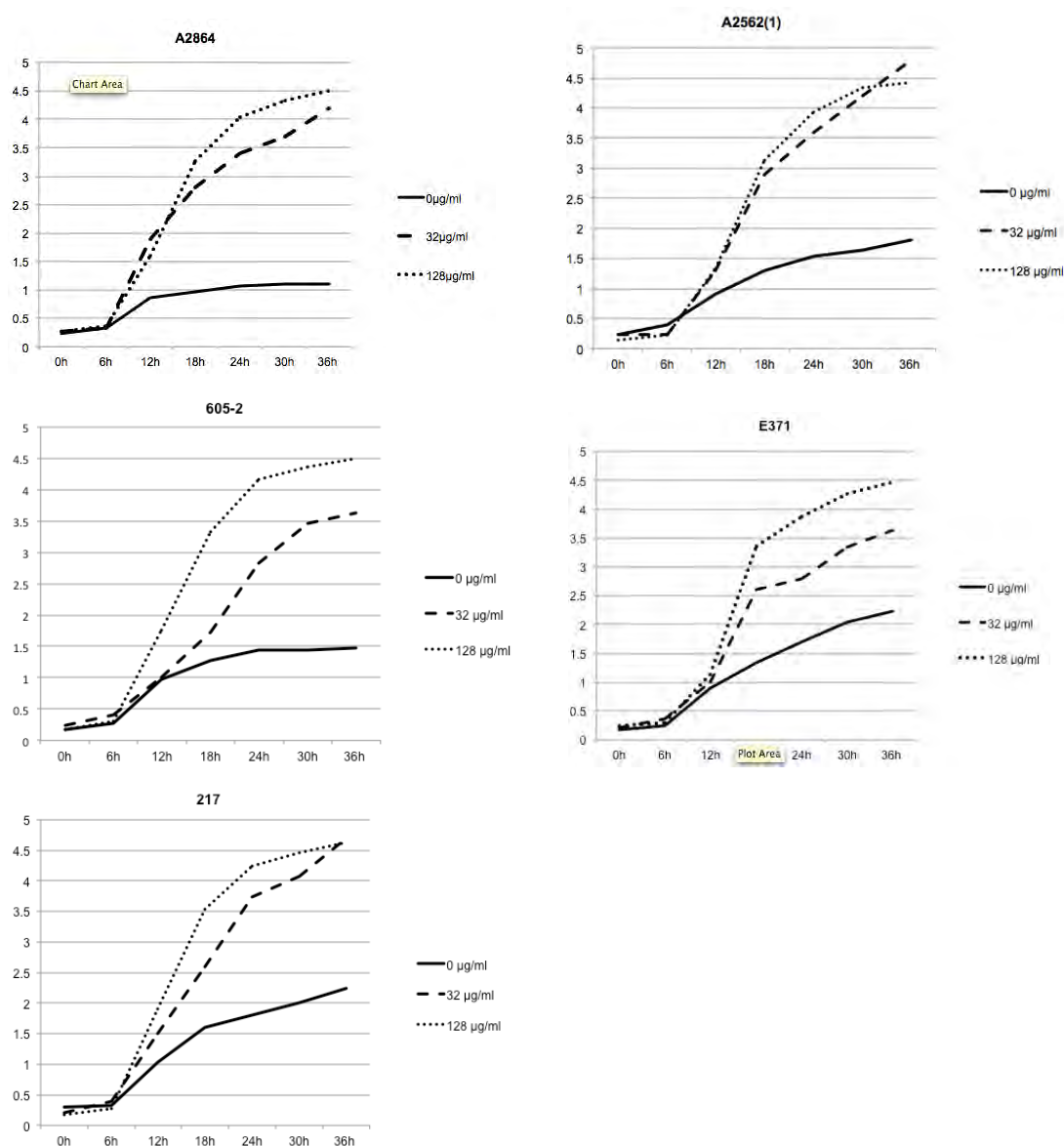
II.7 ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΗ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Παρακάτω θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα των καμπυλών ανάπτυξης παρουσία 8, 32 και 128 $\mu\text{g/ml}$ λινεζολίδης για τα στελέχη LRSE με υψηλές MIC στη λινεζολίδη και σε $\frac{1}{2}$ MIC για τα στελέχη ελέγχου και τα LRSE με χαμηλές MIC στη λινεζολίδη. Απουσία λινεζολίδης, η ανάπτυξη και των οκτώ LRSE ήταν σημαντικά πιο αργή από το στέλεχος ελέγχου ATCC 29213 *S. aureus* ($p < 0.05$ στις 24 και στις 36 ώρες επώσης για όλα τα στελέχη). Η έκθεση σε 8 $\mu\text{g/mL}$ λινεζολίδης δεν επηρέασε ιδιαίτερα την ανάπτυξη των 5 στελεχών με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη ($p > 0.05$ για όλα τα στελέχη). Τα 3 στελέχη LRSE με χαμηλού επιπέδου αντοχή στη λινεζολίδη και το ευαίσθητο στη λινεζολίδη στέλεχος ελέγχου παρουσίασαν σχετικά πιο αργή ανάπτυξη ($p > 0.05$ στις 24 και 36 ώρες) και το *S. aureus* στέλεχος ελέγχου σημαντικά πιο αργή ανάπτυξη ($p < 0.05$ στις 24 και 36 ώρες) παρουσία του $\frac{1}{2}$ MIC λινεζολίδης από ότι χωρίς την παρουσία της. Ωστόσο, η έκθεση των 5 στελεχών με πολύ υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη σε 32 και 128 $\mu\text{g/mL}$ οδήγησε σε **σημαντικά ενισχυμένη** ανάπτυξη σε σύγκριση με την ανάπτυξη τους απουσία λινεζολίδης ($p < 0.05$ στις 24 και 36 ώρες με 32 $\mu\text{g/mL}$ λινεζολίδης και $p < 0.01$ στις 24 και 36 ώρες με 128 $\mu\text{g/mL}$ λινεζολίδης για όλα τα 5 στελέχη), υποδηλώνοντας έτσι μερική εξάρτηση στη λινεζολίδη. Επίσης τα 5 εξαρτώμενα από τη λινεζολίδη στελέχη αναπτύχθηκαν με πιο γρήγορο ρυθμό παρουσία 128 $\mu\text{g/mL}$ από ότι τα 3 στελέχη

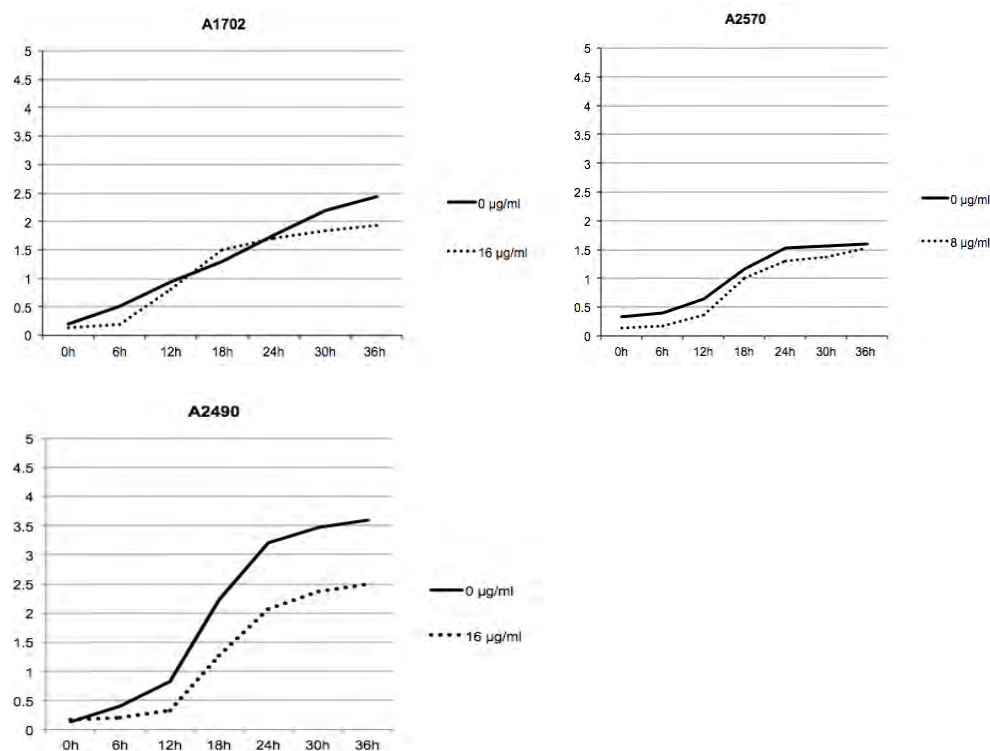
χαμηλής αντοχής στη λινεζολίδη και το ευαίσθητο στέλεχος ελέγχου παρουσία $\frac{1}{2}$ MIC λινεζολίδης αλλά και απουσία λινεζολίδης ($p < 0.05$ στις 24 και 36 ώρες). Τέλος, τρία από τα λινεζολίδη-εξαρτώμενα στελέχη [A2864, A2562(1), 217] αναπτύχθηκαν σημαντικά γρηγορότερα από το στέλεχος ελέγχου *S. aureus* απουσία λινεζολίδης ($p < 0.05$ στις 24 και 36 ώρες). Στην **εικόνα 19** παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης των στελεχών κατά τη διάρκεια 36 ωρών παρουσία και απουσία λινεζολίδης.

Στον **πίνακα 38** παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των 8 LRSE που μελετήθηκε η κινητική της ανάπτυξης τους παρουσία και απουσία λινεζολίδης και τα αποτελέσματα της στατιστικής τους ανάλυσης.

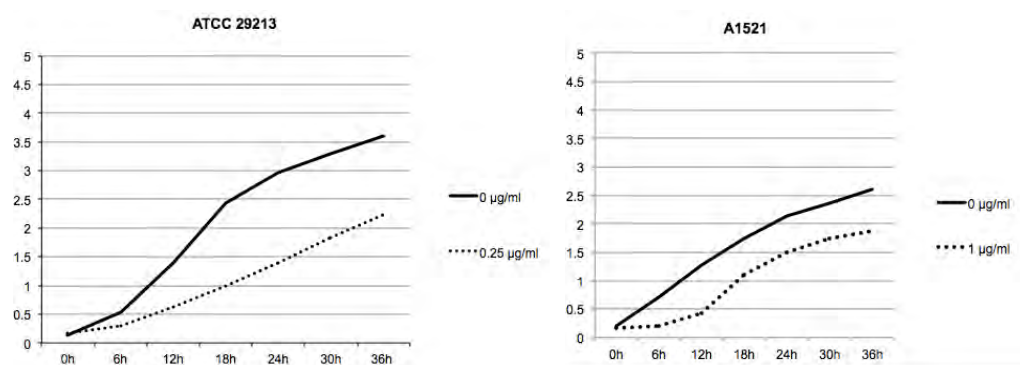
A.



B.



C.



Εικόνα 19. Επίδραση της λινεζολίδης στην ανάπτυξη: Α. στα 128 µg/mL για τα 5 στελέχη με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη [A2562(1), E371, A2864, 217 και 605-2], Β. $\frac{1}{2}$ MIC για τα 3 στελέχη με χαμηλή αντοχή στη λινεζολίδη (A2570, A1702 και A2490), Γ. $\frac{1}{2}$ MIC για τα 2 ευαίσθητα στη λινεζολίδη στελέχη ελέγχου (A1521 και ATCC29213). Υ-άξονας, θολερότητα της καλλιέργειας σε ζωμό σε κλίμακα McFarland; x-άξονας, ώρες επώασης της καλλιέργειας.

Στέλεχος	PFGE τύπος	Μεταλλάξεις σε κάθε αντραφο του γονιδίου 23S rRNA						Τιμή P στις 24 h ανάπτυξης στα 32 έναντι 0 µg/mL λινεζολίδης	Τιμή P στις 24 h ανάπτυξη στα 128 έναντι 0 µg/mL λινεζολίδης
		<i>rrlA</i>	<i>rrlB</i>	<i>rrlC</i>	<i>rrlD</i>	<i>rrlE</i>	<i>rrlF</i>		
A2562(1)	I	T2504A C2534T	- -	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	0.002	0.007
A2570	II	- -	- -	- -	C2534T G2576T	C2534T G2576T	C2534T G2576T		
E371	I	T2504A C2534T	- -	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	0.03	0.0002
A2864	I	T2504A C2534T	- -	T2504A -	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	0.003	0.003
217	I	C2534T	T2504A C2534T	- -	T2504A C2534T	T2504A -	T2504A C2534T	0.02	0.005
605-2	I	T2504A -	- -	- -	T2504A C2534T	T2504A C2534T	T2504A C2534T	0.02	0.009
A1702	II	G2576T -	G2576T -	G2576T -	C2534T G2576T	G2576T -	C2534T G2576T		
A2490	III	C2356T G2576T	T2334C G2576T	- -	C2356T G2576T	C2356T G2576T	C2356T G2576T		

Πίνακας 38. Χαρακτηριστικά των 8 LRSE στα οποία μελετήθηκε η κινητική της ανάπτυξης τους παρουσία και απουσία λινεζολίδης.

III. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η προσοχή που έχει εστιαστεί πρόσφατα 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 αντοχής που έχουν αποκτήσει, σημαίνει ό τι αυτοί οι μικροοργανισμοί, που συνήθως φαίνονται να έχουν χαμηλή παθογονικότητα, αποκτούν σταδιακά μία σημαντική δυνατότητα να γίνονται δευτερογενείς εισβολείς. Καθώς τα νοσοκομειακά στελέχη των εντεροκόκκων έχουν επιδείξει αντοχή σε σχεδόν όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες, θα αρχίσει να γίνεται ιδιαίτερος δύσκολο να αντιμετωπίζονται ικανοποιητικά και επιτυχώς οι εντεροκοκκικές λοιμώξεις.

Η μονάδα εντατικής θεραπείας βαρύνεται με μία υψηλή συχνότητα νοσοκομειακών λοιμώξεων που συχνά προκαλούνται από πολυανθεκτικά νοσοκομειακά παθογόνα. Απαιτούνται στρατηγικές που μπορούν να μειώσουν την εμφάνιση των νοσοκομειακών λοιμώξεων (Vincent JL, 2003, Hanberger H *et al*, 2001).

Οι κοαγκουλάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (CoNS) αναφέρονται ως ο τρίτος πιο κοινός αιτιολογικός παράγοντας νοσοκομειακών λοιμώξεων και το πιο κοινό αίτιο νοσοκομειακών βακτηριαιμιών (Pittet D *et al*, 1994, Spencer RC, 1996). 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 (Neely AN *et al*, 2000). 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 οξακιλλίνη 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 (Diekema DJ *et al*, 2001, Hanberger H *et al*, 2001, Vincent JL, 2000). Σε αυτό το πλαίσιο, η αντοχή αυτή θα οδηγήσει σε υψηλότερη κατανάλωση ουσιών όπως η βανκομυκίνη και η λινεζολίδη, που αυξάνουν την πίεση επιλογής στην μονάδα εντατικής θεραπείας, προωθώντας έτσι την ανάπτυξη της αντιβιοτικής αντοχής.

Οι οξαζολιδινόνες θεωρούνται ότι είναι η πρώτη πραγματικά νέα τάξη αντιβιοτικών φαρμάκων που παρουσιάστηκε τις τελευταίες 3 δεκαετίες. Η

λινεζολίδη εγκρίθηκε από τον FDA το 2000 για χρήση σε ενήλικες και για παιδιατρική χρήση το 2005 (Devasahayam G *et al*, 2010). Προγράμματα επιτήρησης της αντοχής στη λινεζολίδη έχουν αναφέρει ότι τα συνολικά ποσοστά αντοχής στη λινεζολίδη ανέρχονται στο 0.4% στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, ενώ τα ποσοστά ανέρχονται μόλις στο 0.1% μεταξύ των Gram-θετικών στελεχών σε νοσοκομεία εκτός του αμερικανικού εδάφους (Jones RN *et al*, 2009, Farrell DJ *et al*, 2009).

Η αντοχή στη λινεζολίδη 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 (Xiong L *et al*, 2000). Τα περισσότερα κλωνικά στελέχη που είναι ανθεκτικά στη λινεζολίδη φέρουν τη μετάλλαξη G2576T στην υπομονάδα V του 23S rRNA (Locke JB *et al*, 2009B). Άλλες μεταλλάξεις, όπως η T2500A, G2447T και T2504A έχουν επίσης αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Mendes RE *et al*, 2009). Επιπλέον, τροποποιήσεις σε συντηρημένες περιοχές των ριβοσωμικών πρωτεϊνών L3 και L4 έχουν συσχετιστεί με τα αυξημένα επίπεδα της MIC στη λινεζολίδη (Locke JB *et al*, 2009B, Wong A *et al*, 2010, Locke JB *et al*, 2009A). Το γονίδιο *cfr* αποτελεί έναν επιπλέον μηχανισμό που προσδίδει αντοχή στη λινεζολίδη σε στελέχη σταφυλοκόκκων, αν και αρχικά είχε συσχετιστεί μόνο με την αντοχή στη χλωραμφενικόλη (Schwarz S *et al*, 2000). 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, πλευρομυτολίνες και στρεπτογραμμίνη A) (Long KS *et al*, 2006). Αρχικά είχε εντοπιστεί ανάμεσα σε ζωικά δείγματα από την Ευρώπη (Schwarz S *et al*, 2000), όμως πρόσφατα το γονίδιο *cfr* έχει αναφερθεί ότι εντοπίστηκε και σε ανθρώπινα δείγματα *Staphylococcus spp* από τις ΗΠΑ, την Κολομβία και την Ισπανία (Mendes RE *et al*, 2008, Toh SM *et al*, 2007, Morales G *et al*, 2010).

LR εντεροκόκκοι ανιχνεύονται σπάνια σε μεγάλες διεθνείς συλλογές βακτηρίων (Ross JE *et al*, 2007, Sader HS *et al*, 2009, Bourdon N *et al*, 2011B). Μέρος της παρούσας μελέτης ήταν η περιγραφή της διασποράς μη κλωνικά σχετιζόμενων LR εντεροκοκκικών στελεχών σε ένα ελληνικό νοσοκομείο. Οι περισσότερες μελέτες που ανέφεραν διάδοση εντεροκόκκων LR εμπλέκουν περιορισμένους αριθμούς στελεχών που ήταν κλωνικά σχετιζόμενα, υποδηλώνοντας

την οριζόντια μετάδοση τους ανάμεσα σε ασθενείς (Dobbs TE *et al*, 2006, Gomez-Gil R *et al*, 2009), σε αντίθεση με τη μελέτη μας που ανίχνευσε πολλαπλούς κλώνους. Μία από αυτές τις αναφορές περιέγραψαν μία κλωνική επιδημία από LR *E. faecium* από ένα τριτοβάθμιο ιατρικό κέντρο στις ΗΠΑ που προσέβαλλε 40 νοσοκομειακούς ασθενείς. Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι μόνο το 15% των ασθενών είχαν λάβει λινεζολίδη πριν να αποδώσουν LR στελέχη (Dobbs TE *et al*, 2006). Επίσης μία κλωνική επιδημία συμπεριλάμβανε 12 γενετικά πανομοιότυπα στελέχη LR *E. faecalis* στην μονάδα εντατικής θεραπείας ενός τριτοβάθμιου νοσοκομείου στην Ισπανία (Gomez-Gil R *et al*, 2009). Στην Ελλάδα, όπου το ζήτημα της πολυαντοχής αυξάνεται (Miyakis S *et al*, 2011), η αντοχή στη λινεζολίδη παραμένει σπάνια και υπάρχει μόνο μία μελέτη που αναφέρει ενδονοσοκομειακή διασπορά από 5 αποικιστικά στελέχη LR εντεροκόκκων σε μία μόνο κλινική, 4 από τα οποία ήταν κλωνικά (Souli M *et al*, 2009).

Η παρούσα μελέτη αναφέρει 25 στελέχη LR εντεροκόκκων που απομονώθηκαν κυρίως από τη μονάδα εντατικής θεραπείας του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Τα LR αυτά στελέχη που ανήκουν σε πολλαπλούς κλώνους, υποδεικνύουν ότι η αντοχή στη λινεζολίδη εμφανίστηκε σε διάφορες ανεξάρτητες περιπτώσεις και η μετάδοση από ασθενή σε ασθενή δεν ήταν η κύρια οδός διασποράς.

Η πλειοψηφία των ασθενών είχαν πολλαπλούς παράγοντες κινδύνου για αποικισμό και/ή λοίμωξη με πολυανθεκτικά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων πολλαπλών υποκείμενων νόσων, παρουσία ενδοαγγειακών καθετήρων και πρότερη έκθεση σε αντιβιοτικά. Πολλοί από τους ασθενείς που δεν είχαν λάβει λινεζολίδη μπορεί να έχουν αποκτήσει το LR στέλεχος από έναν ασθενή που είχε λάβει θεραπεία με λινεζολίδη ή εναλλακτικά η μετάλλαξη να έχει συμβεί ανεξάρτητα. Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι η απομόνωση LR εντεροκόκκων από την μονάδα εντατικής θεραπείας οδήγησε σε ενίσχυση των μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων και την ορθολογικότερη χρήση της λινεζολίδης και μετά από την περίοδο μελέτης των δύο ετών η απομόνωση τέτοιων στελεχών έγινε πολύ σπάνια.

Η αντοχή στη λινεζολίδη επιλέγεται συνήθως *in vivo* λόγω μακρόχρονης θεραπείας με αντιβιοτικά ή ακατάλληλη δοσολογία λινεζολίδης (Livermore DM, 2003). Τα περισσότερα μεταλλαγμένα ανθεκτικά κλινικά στελέχη έχουν αναφερθεί ότι φέρουν τη μετάλλαξη G2576T στην περιοχή V του 23S rRNA (Prystowsky J *et al*, 2001, Seedat J *et al*, 2006, Marshall SH *et al*, 2002). Καθώς τα περισσότερα βακτήρια περιέχουν 4-6 αντίγραφα του γονιδίου που κωδικοποιεί για το 23S rRNA,

περισσότερα από ένα αντίγραφα πρέπει να είναι μεταλλαγμένα για να προσδίδουν αντοχή (Marshall SH *et al*, 2002) και αυτό πιθανώς να οδήγησε στη σπανιότητα εμφάνισης της αντοχής (Ross JE *et al*, 2007, Sader HS *et al*, 2009, Bourdon N *et al*, 2011B). Στη μελέτη μας, όλα τα στελέχη *E. faecium* έφεραν τη μετάλλαξη G2576T σε 2-4 αντίγραφα και τα στελέχη *E. faecalis* σε 2-3 αντίγραφα, ενώ δεν εντοπίστηκαν άλλες μεταλλάξεις παρά το γεγονός ότι αλληλουχήθηκε ολόκληρο το γονίδιο του 23S rRNA. Παρατηρείται, μετά από αλληλούχιση μέρους της περιοχής V του γονιδίου 23S rRNA κάθε αντιγράφου ξεχωριστά οριζόντια συσχέτιση του αριθμού των μεταλλαγμένων αντιγράφων με την αντίστοιχη MIC στη λινεζολίδη σε όλα τα στελέχη εντεροκόκκου. Η μετάλλαξη που εντοπίστηκε σε όλα αυτά τα στελέχη ήταν η G2576T. Συγκεκριμένα από τα 6 αντίγραφα των στελεχών *E. faecium* στα στελέχη με MIC 8 µg/ml παρατηρήθηκαν 2 αντίγραφα μεταλλαγμένα, στα στελέχη με MIC 12 µg/ml παρατηρήθηκαν 3 αντίγραφα μεταλλαγμένα ενώ στα στελέχη με MIC 16 µg/ml παρατηρήθηκαν 4 αντίγραφα μεταλλαγμένα. Αντίστοιχα στα στελέχη *E. faecalis* από τα 4 αντίγραφα του γονιδίου στα στελέχη με MIC 6 µg/ml και MIC 8 µg/ml παρατηρήθηκαν 2 αντίγραφα μεταλλαγμένα ενώ στα στελέχη με MIC 12 µg/ml και MIC 16 µg/ml παρατηρήθηκαν 3 αντίγραφα μεταλλαγμένα.

Η εμφάνιση της αντοχής στη λινεζολίδη ανάμεσα σε εντεροκοκκικά στελέχη, σαν αποτέλεσμα μετάδοσης από ασθενή σε ασθενή ή εκλεκτικής πίεσης εγείρει ανησυχία. Η παρακολούθηση ή ο περιορισμός της χρήσης της λινεζολίδη σύμφωνα με τις θεραπευτικές ενδείξεις μπορεί να μειώσει ή ακόμα και να αποτρέψει την εμφάνιση LR εντεροκόκκων. Επίσης παράγοντες επικινδυνότητας, όπως πρότερη αντιβιοτική θεραπεία ή υποκείμενες νόσοι, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν και να εκτελείται προσδιορισμός ευαισθησίας με δοκιμασίες ευαισθησίας σε κλινικά σημαντικά Gram-θετικά παθογόνα πριν από την έναρξη θεραπείας με λινεζολίδη σε περίπτωση αποτυχίας άλλης θεραπείας. Αυτά είναι πολύ σημαντικά, προκειμένου να μειωθεί η επιλογή και η μετέπειτα εξάπλωση των LR εντεροκόκκων. Μέρος των αποτελεσμάτων αυτών δημοσιεύτηκε στο έγκυρο διεθνές ιατρικό περιοδικό Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Impact factor 5.086 (Ntokou E *et al*, 2012).

Η αντοχή στη λινεζολίδη ανάμεσα σε στελέχη *S. epidermidis* είναι ακόμα περιορισμένη (Biedenbach DJ *et al*, 2010) αλλά αναφορές για επιδημίες από LR *S. epidermidis* έχουν αρχίσει να αυξάνονται (Seral C *et al*, 2011, Bonilla H *et al*, 2010, Mulanovich VE *et al*, 2010, Kelly S *et al*, 2008, Liakopoulos A *et al*, 2010). Στην παρούσα μελέτη, πέντε τύποι PFGE εντοπίστηκαν ανάμεσα στα στελέχη LRSE με τα

περισσότερα στελέχη να είναι κλωνικά συσχετιζόμενα, υποδεικνύοντας ότι η αντοχή στη λινεζολίδη πιθανότατα αναδύθηκε σε τουλάχιστον πέντε ξεχωριστά στελέχη *S. epidermidis*, δύο από τα οποία ακολούθως εξαπλώθηκαν ανάμεσα στους ασθενείς. Πρέπει να αναφερθεί ότι όλα τα στελέχη της μελέτης ανακτήθηκαν από βακτηριαίμιες, υποδεικνύοντας σχετικώς υψηλή μολυσματικότητα.

Η αντιβιοτική αντοχή που συσχετίζεται με εξαρτώμενη από ένα αντιβιοτικό ανάπτυξη είναι ένας σημαντικός φαινότυπος που έχει περιγραφεί προηγουμένως για τη στρεπτομυκίνη και τη βανκομυκίνη (Tambyah PA *et al*, 2004, Moubareck C *et al*, 2009, Honore N *et al*, 1995), αλλά όχι για τη λινεζολίδη. Στους σταφυλοκόκκους, η εξαρτώμενη στη βανκομυκίνη ανάπτυξη έχει αρχικά παρατηρηθεί στον *S. aureus* (Moubareck C *et al*, 2009). Κατά τη διάρκεια της έρευνας μας για το μηχανισμό αντοχής στη λινεζολίδη σε επιδημικά στελέχη, εξετάσαμε την ανάπτυξη τους εφαρμόζοντας ένα πρωτόκολλο παρόμοιο με αυτό του Moubareck *et al* (Moubareck C *et al*, 2009). Ενδιαφέρον είναι ότι κατά τη διάρκεια της μελέτης της ανάπτυξης των 8 LRSE, παρατηρήσαμε πιο αργή ανάπτυξη χωρίς τη λινεζολίδη από ότι στα στελέχη ελέγχου, πιθανώς λόγω των μεταλλάξεων που προσδίδουν αντοχή στη λινεζολίδη οι οποίες ασκούν ενεργειακό κόστος (fitness cost). Η λινεζολίδη στα 32 µg/ml και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις προκαλούσε θεαματική επιτάχυνση της ανάπτυξης σε 5 στελέχη LRSE με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη, καθιστώντας τα ικανά να μεγαλώσουν πολύ πιο γρήγορα από ότι όταν απουσίαζε η λινεζολίδη. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι η εξαρτώμενη στη λινεζολίδη ανάπτυξη είναι εμφανής ξεκινώντας από σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις λινεζολίδης ενάντια στις οποίες τα στελέχη LRSE μπορεί να εκτεθούν *in vivo* κατά τη διάρκεια θεραπείας με λινεζολίδη. Στην πραγματικότητα, οι περισσότεροι από τους 30 ασθενείς, συμπεριλαμβανομένων και των 5 που έφεραν τα λινεζολίδη-εξαρτώμενα στελέχη LRSE, έλαβαν παρατεταμένη θεραπεία λινεζολίδης πριν να αποδώσουν τα στελέχη αυτά. Η έκθεση αυτή μπορεί επίσης να προώθησε την μετάβαση από την αντοχή στην εξάρτηση, όπως είχε προταθεί στο παρελθόν για τους βανκομυκίνη-εξαρτώμενους εντεροκόκκους (Tambyah PA *et al*, 2004). Ως εκ τούτου, η υψηλή ενδονοσοκομειακή κατανάλωση λινεζολίδης μπορεί όχι μόνο να ευνοεί την επιλογή LRSE αλλά και την ανταγωνιστική επικράτησή τους. Αν η εξάρτηση στη λινεζολίδη αποδειχθεί κοινή ανάμεσα σε στελέχη LRSE με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη, μπορεί να προσφέρει μία εξήγηση για την αυξανόμενη κλινική εμφάνιση τους και την εμφάνιση, επίσης, LRSE επιδημιών (Seral C *et al*, 2011, Bonilla H *et al*, 2010,

Mulanovich VE *et al*, 2010, Kelly S *et al*, 2008, Liakopoulos A *et al*, 2010). Για την υποστήριξη αυτής της υπόθεσης, η ανάπτυξη παρουσία και απουσία λινεζολίδης πρέπει να ελεγχθεί σε μεγάλες συλλογές από LRSE στελέχη.

Ο υποκείμενος μηχανισμός με τον οποίο η σύνδεση της λινεζολίδης στις υπομονάδες του μεταλλαγμένου ριβοσώματος ενισχύει τη βακτηριακή ανάπτυξη μπορεί να είναι πολύπλοκη, λαμβάνοντας υπόψη ότι ο ακριβής μηχανισμός δράσης της παραμένει αβέβαιος ενδεχομένως εμπλέκοντας πολλαπλούς μη σχετιζόμενους τόπους (**Colca JR *et al*, 2003**). Έχουν γίνει μερικές υποθέσεις για το μηχανισμό εξάρτησης σε αντιβιοτικά που αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση, όπως η λινεζολίδη, για τη στρεπτομυκίνη στα *M. tuberculosis* και *Escherichia coli*, όπου η εξάρτηση είχε αποδοθεί σε μία επιπρόσθετη κυτοσίνη στο βρόγχο 530 του 16S rRNA (**Honore N *et al*, 1995**) και σε μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη S12, αντίστοιχα (**Van Acken U, 1975**). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι μεταλλάξεις του 23S rRNA πρέπει να συμβούν σε πολλαπλά αντίγραφα για να συνεισφέρουν στην παρατηρούμενη υψηλή αντοχή στη λινεζολίδη αλλά και πιθανόν στην εξάρτηση σε αυτή, όπως έχει προταθεί προηγουμένως για τους εντεροκόκκους (**Marshall SH *et al*, 2002**). Στην πραγματικότητα, τα 4 λινεζολίδη-εξαρτώμενα στελέχη είχαν μεταλλάξεις σε πέντε αντίγραφα του 23S rRNA και ένα στέλεχος είχε μεταλλάξεις σε 4 αντίγραφα. Αυτές οι μεταλλάξεις συμπεριελάμβαναν σε όλα τα 5 στελέχη τη μετάλλαξη T2504A σε συνδυασμό με την μετάλλαξη C2534T. Αντιθέτως, τα 3 μη εξαρτώμενα στη λινεζολίδη στελέχη έφεραν τη μετάλλαξη G2576T σε συνδυασμό με τη μετάλλαξη C2534T (2 στελέχη) ή τη μετάλλαξη C2356T και T2334C (ένα στέλεχος) και παρουσίαζαν σημαντικά χαμηλότερες MICs. Επίσης ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στις ριβοσωμικές πρωτεΐνες των λινεζολίδη-εξαρτώμενων στελεχών, οι οποίες όλες εδράζονταν στην πρωτεΐνη L3, που είναι σημαντική στη συναρμολόγηση των ριβοσωμάτων. Το σημαντικό αυτό στάδιο επιτυγχάνεται μέσω της πρόσδεσης των L3, L4 και L22 πρωτεϊνών στο πρόδρομο 23S rRNA. Ειδικά η L3 και L4 θεωρούνται απαραίτητες για το στάδιο αυτό, και συγκεκριμένα η L3 πυροδοτεί τη συνολική διαδικασία. Η σύζευξη της σύνθεσης rRNA από πρόδρομα RNA μόρια και συναρμολόγηση ριβοσωμάτων ονομάζεται «βαθμιαία συναρμολόγηση» και πιθανώς επηρεάζει τον *in vivo* συνολικό ρυθμό της πρωτεϊνικής σύνθεσης (**Nierhaus KH, 2004**). Η λινεζολίδη, όπως και ένας αριθμός άλλων 50S-ειδικών αναστολέων της μετάφρασης, αλληλεπιδρά με το 23S rRNA. Η αλληλεπίδραση αυτή εμφανίζεται στην ώριμη υπομονάδα αλλά πιθανά συμβαίνει και κατά τη διάρκεια της

συναρμολόγησης της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας, επιτρέποντας έτσι αλληλεπίδραση με πρόδρομες μορφές της υπομονάδας 50S, όπως έχει αποδειχθεί για την ερυθρομυκίνη (Wilson DN, 2009). Μπορούμε να υποθέσουμε ότι τα λινεζολίδη-εξαρτώμενα κύτταρα μπορεί να κατέχουν λινεζολίδη-εξαρτώμενα ριβοσωμικά πρόδρομα σωματίδια που παρουσιάζουν μία διαφορετική δομική διαμόρφωση συμβάλλοντας έτσι σε ένα ταχύτερο ρυθμό της συνολικής ανάκτησης της πρωτεϊνσύνθεσης. Αυτό το χαρακτηριστικό μπορεί να εξηγήσει την περίεργη, εξαρτώμενη στη λινεζολίδη ανάπτυξη, των απομονωμένων στελεχών. Απαιτείται περαιτέρω λειτουργικός χαρακτηρισμός των ριβοσωμάτων των λινεζολίδη-εξαρτώμενων στελεχών ώστε να διαφωτιστεί αυτός ο περίεργος τρόπος ανάπτυξης.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής συνιστούν μία ευρεία καταγραφή αντοχής στη λινεζολίδη στελεχών εντεροκόκκου και σταφυλοκόκκου προερχόμενα από δύο διαφορετικά ελληνικά νοσοκομεία. Η σποραδικότητα των στελεχών των εντεροκόκκων είναι ιδιαίτερος σημαντική λόγω του γεγονότος ότι η αντοχή στη λινεζολίδη ίσως δεν αποτελεί ένα τυχαίο και σπάνιο γεγονός που απλά φέρει τη δυνατότητα μεταφοράς από ασθενή σε ασθενή, αλλά η συχνότητα εμφάνισης νέων κλώνων έχει αυξηθεί. Καθίσταται, πλέον, αναγκαία η λήψη αυστηρών μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων και η συνεχής επιδημιολογική επαγρύπνηση για την αποφυγή της περαιτέρω διασποράς τέτοιων στελεχών, όπως φαίνεται ότι έγινε στο Νοσοκομείο μας, με την ιδιαίτερη μείωση νέων στελεχών LRE μετά το 2009.

Η κλωνική προέλευση των στελεχών σταφυλοκόκκων υποδεικνύει οριζόντια μετάδοση που εγείρει ερωτήματα ως προς την ικανοποιητική 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. Ακόμη, η μελέτη των μοριακών μηχανισμών που πιθανόν προσφέρουν επιπλέον αντοχή στη λινεζολίδη οφείλουν να διερευνηθούν περαιτέρω, όπως έδειξε η ανίχνευση σημαντικών μεταλλάξεων στην πρωτεΐνη L3.

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 λινεζολίδη 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.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. **Allaouchiche B, Meugnier H, Freney J et al.** Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in bronchoalveolar lavage fluid using a DNA probe (Accuprobe). Intensive Care Med 1996; 22: 683-687.
2. **Almeida RJ, Jorgensen JH.** Use of Mueller-Hinton agar to determine novobiocin susceptibility of coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 1982; 16: 1155-1156.
3. **Angeletti S, Lorino G, Gherardi G et al.** Routine molecular identification of enterococci by gene-specific PCR and 16S ribosomal DNA sequencing. J Clin Microbiol 2001; 39: 794-797.
4. **Archer GL, Climo MW.** Antimicrobial susceptibility of coagulase negative staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 2231-2237.
5. **Arias CA, Contreras GA, Murray BE.** Management of multidrug-resistant enterococcal infections. Clin Microbiol Infect 2010; 16: 555-562.
6. **Arias CA, Vallejo M, Reyes J et al.** Clinical and microbiological aspects of linezolid resistance mediated by the *cfr* gene encoding a 23S rRNA methyltransferase. J Clin Microbiol 2008; 46: 892-896.
7. **Ashtekar DR, Costa-Periera R, Shrinivasan T et al.** Oxazolidinones, a new class of synthetic antituberculous agent; in vitro and in vivo activities of DuP-721 against *Mycobacterium tuberculosis*. Diagn Microbiol Infect Dis 1991; 14: 465-471.
8. **Auckland C, Teare L, Cooke F et al.** Linezolid resistant enterococci: report of the first isolates in the United Kingdom. J Antimicrob Chemother 2002; 50: 743-746.
9. **Banerjee SN, Emori TG, Culver DH et al.** Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. Am J Med 1991; 91 (Suppl 3B): 86S-89S.
10. **Bannerman TL, Hancock GA, Tenover FC et al.** Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1995; 33: 551-555.
11. **Bannerman TL.** *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically, p. 384-404. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH et al (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th edition, 2003. ASM Press, Washington, D.C.

12. **Bashan A, Agmon I, Zarivach R *et al.*** Structural basis of the ribosomal machinery for peptide bond formation, translocation, and nascent chain progression. *Mol Cell* 2003; 11: 91-102.
13. **Bassetti M, Farrel PA, Callan DA *et al.*** Emergence of linezolid resistant *Enterococcus faecium* during treatment of enterococcal infections. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21: 593-594.
14. **Bearman GML, Wenzel RP.** Bacteraemias: a leading cause of death. *Arch Med Res* 2005; 36: 646-659.
15. **Becker K, Roth R, Peters G.** Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2548-2553.
16. **Beekmann SE, Diekema DJ, Doern GV.** Determining the clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26: 559-567.
17. **Bennet IL, Beeson PB.** Bacteremia: a consideration of some experimental and clinical aspects. *Medicine* 1954; 26: 241-262.
18. **Bernard Weisblum.** Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 577-585.
19. **Besier S, Ludwig A, Zander J *et al.*** Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: Gene dosage effect, stability, fitness costs, and cross-resistances. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1570-1572.
20. **Bialkowska-Hobrzanska H, Jaskot D, Hammerberg O.** Evaluation of restriction endonuclease fingerprinting of chromosomal DNA and plasmid profile analysis for characterization of multiresistant coagulase-negative staphylococci in bacteremic neonates. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 269-275.
21. **Biedenbach DJ, Farrell DJ, Mendes RE *et al.*** Stability of linezolid activity in an era of mobile oxazolidinone resistance determinants: results from the 2009 Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum proGram. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 68: 49-67.
22. **Blake JE, Metcalfe MA.** A shared noncapsular antigen is responsible for false-positive reactions by *Staphylococcus epidermidis* in commercial

- agglutination tests for *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2001; 39: 544-550.
23. **Bongiorno D, Campanile F, Mongelli G et al.** DNA methylase modifications and other linezolid resistance mutations in coagulase-negative staphylococci in Italy. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 2336-2340.
 24. **Bonilla H, Huband MD, Seidel J.** Multicity outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with clonal spread of a *cfr*-containing strain. Clin Infect Dis 2010; 51: 796-800.
 25. **Bourdon N, Fines-Guyon M, Thiolet JM et al.** Changing trends in vancomycin-resistant enterococci in French hospitals, 2001-08. J Antimicrob Chemother 2011B; 66: 713-721.
 26. **Bourdon N, Lemire A, Fines-Guyon M et al.** Comparison of four methods, including semi-automated rep-PCR, for the typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. J Microbiol Meth 2011A; 84: 74-80.
 27. **Bowersock TL, Salmon SA, Portis ES.** Minimum inhibitory concentrations of oxazolidinones for *Rhodococcus equi* strains isolated from humans and animals. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 1367-1369.
 28. **Boyce JM.** Epidemiology and prevention of nosocomial infections, p 309-329. In Crossley KB, Archer GL (ed.), *The staphylococci in human disease*, 1997. Churchill Livingstone, New York, N.Y.
 29. **Brown DFJ, Brown NM, Cookson BD et al.** National glycopeptide-resistant enterococcal bacteraemia surveillance Working Group report to the Department of Health – August 2004. J Hosp Infect 2006; 62 (Suppl 1): 1-27.
 30. **Brown-Elliott BA, Ward SC, Crist CJ et al.** In vitro activity of linezolid against multiple *Nocardia* species. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1295-1297.
 31. **Bukowski M, Wladyka B, Dubin G.** Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. Toxins 2010; 2: 1148-1165.
 32. **Buschelman BJ, Bale MJ, Jones RN.** Species identification and determination of high-level aminoglycoside resistance among enterococci. Comparison study of sterile body fluid isolates, 1985-1991. Diagn Microbiol Infect Dis 1993; 16: 119-122.
 33. **Calvo J, Hernandez JL, Farinas MC et al.** Osteomyelitis caused by *Staphylococcus schleiferi* and evidence of misidentification of this

- Staphylococcus* species by an automated bacterial identification system. J Clin Microbiol 2000: 38: 3887-3889.
34. **Carvahlo MGS, Vianni MCE, Elliot JA et al.** Molecular analysis of *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus gallinarum* isolated from water buffalos with subclinical mastitis. Adv Exp Med Biol 1997: 418: 401-404.
 35. **Cato EP, Stackebrandt E.** Taxonomy and phylogeny, p. 1-26. In Minton NP, Clarke DJ (ed.), *Clostridia*, 1989. Plenum Press, New York, N.Y.
 36. **Chaeib K, Abbassi MS, Touati A et al.** Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* isolated from biomaterials in a dialysis service. Annals Microbiol 2005: 55: 307-312.
 37. **Chiou CS, Wei LH, Yang LC.** Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2000: 38: 2186-2190.
 38. **Choi SM, Kim SH, Kim HJ et al.** Multiplex PCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus* species. J Korean Med Sci 2003: 18: 631-636.
 39. **Choi Y, Kotzin B, Herron L et al.** Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin “supernatogens” with human T cells. Proc Natl Acad Sci USA 1989: 86: 8941-8945.
 40. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first informational supplement. 2011: 30: 76-98.
 41. **Clink J, Pennington TH.** Staphylococcal whole-cell polypeptide analysis: evaluation as a taxonomic and typing tool. J Med Microbiol 1987: 23: 41-44.
 42. **Cohn F.** Untersuchungen über Bacterien. Beitr Biol Pflanz Bd 1 Heft 1872: 2: 127-224.
 43. **Colca JR, McDonald WG, Waldon DJ et al.** Cross-linking in the living cell locates the site of action of oxazolidinone antibiotics. J Biol Chem 2003: 278: 21972-21979.
 44. **Collins MD, Facklam RR, Farrow JAE et al.** *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudoaerium* sp. nov. FEMS Microbiol Lett 1989: 57: 283-288

45. **Collins MD, Farrow JAE, Jones D.** *Enterococcus mundtii* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1986: 36: 8-12.
46. **Collins MD, Jones D, Farrow JAE et al.** *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1984: 34: 220-223.
47. **Collins MD, Rodrigues UM, Pigott NE et al.** *Enterococcus dispar* sp. nov., a new *Enterococcus* species from human sources. Lett Appl Microbiol 1991: 12: 95-98.
48. **Cooper BS, Stone SP, Kibbler CC et al.** Isolation measures in the hospital management of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): systematic review of the Literature. BMJ 2004: 329: 533-541.
49. **Crossley KB, Archer GL** (ed.). *The Staphylococci in Human Disease*, 1997. Churchill Livingstone, Inc., New York, N.Y.
50. **D'Azevedo PA, Dias CAG, Goncalves ALS et al.** Evaluation of an automated system for the identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. Diagn Microbiol Infect Dis 2001: 42: 157-161.
51. **Davis GHG, Hoyling B.** Use of a rapid acetoin test in the identification of staphylococci and micrococci. Int J Syst Bacteriol 1973: 23: 281-282.
52. **De Fátima Silva Lopes M, Ribeiro T, Abrantes M et al.** Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. Int J Food Microbiol 2005: 103: 191-198.
53. **De Perio MA, Yarnold PR, Warren J et al.** Risk factors and outcomes associated with non-*Enterococcus faecalis*, non-*Enterococcus faecium* enterococcal bacteremia. Infect Control Hosp Epidemiol 2006: 7: 28-33.
54. **De Vaux A, Laguerre G, Divies C et al.** *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*). Int J Syst Bacteriol 1998: 48: 383-387.
55. **Descheemaeker P, Lammens C, Pot B et al.** Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA fragments for identification of enterococci important in human medicine. Int J Syst Bacteriol 1997: 48: 383-387.
56. **Devasahayam G, Scheld MW, Hoffman PS.** Newer Antibacterial Drugs for a New Century. Expert Opin Investig Drugs 2010: 19: 215-234.

57. **Devriese LA, Ceyssens K, Rodrigues UM et al.** *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. FEMS Microbiol Lett 1990: 71: 247-252.
58. **Devriese LA, Collins MD, Wirth R.** The genus *Enterococcus*, p. 1465-1481. In Balows A, Trüper HG, Dworkin M et al (ed.), *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, 2nd ed, 1992. Springer-Verlag, New York, N.Y.
59. **Devriese LA, Dutta GN, Farrow JAE et al.** *Streptococcus cecorum*, a new species isolated from chickens. Int J Syst Bacteriol 1983: 33: 772-776.
60. **Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, et al.** Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the sentry antimicrobial surveillance proGram, 1997-1999. Clin Infect Dis 2001: 32 (Suppl. 2): S114-132.
61. **Dobbs TE, Patel M, Waites KB et al.** Nosocomial spread of *Enterococcus faecium* resistant to vancomycin and linezolid in a tertiary care medical center. J Clin Microbiol 2006: 44: 3368-3370.
62. **Doern GV, Pfaller MA, Kugler K et al.** Prevalence of antimicrobial resistance among respiratory tract isolates of *Streptococcus pneumoniae* in North America: 1997 results from the SENTRY antimicrobial surveillance proGram. Clin Infect Dis 1998: 27: 764-768.
63. **Domig KJ, Mayer HK, Kneifel W.** Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. Int J Food Microbiol 2003: 88: 165-188.
64. **Donabedian S, Hershberger E, Thal LA et al.** PCR fragment length polymorphism analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol 2000: 38: 2885-2888.
65. **Downes FP, Ito K** (ed.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th ed, 2001. American Public Health Association, Washington, D.C.
66. **Eaton TJ, Gasson MJ.** Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Appl Environ Microbiol 2001: 67: 1628-1635.

67. **Eliopoulos GM.** Vancomycin-resistant enterococci. Mechanism and clinical relevance. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11: 851-865.
68. **Endtz HP, Van den Braak N, Van Belkum A et al.** Fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients and those living in the community in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3026-3031.
69. **Espersen F, Baek L, Kjaeldgaard P et al.** Detection of staphylococcal toxic syndrome toxin-1 by a latex agglutination kit. *Scand J Infect Dis* 1988; 20: 449-450.
70. **Evans JB, Bradford Jr WL, Niven CF.** Comments concerning the taxonomy of the genera *Micrococcus* and *Staphylococcus*. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon* 1955; 5: 61-66.
71. **Facklam RR, Carvahlo MDGS, Teixeira LM.** History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci p. 1-54. *In* Gilmore MS, Clewell DB, Courvalin P et al (ed.), *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*, 2002. ASM Press, Washington, D.C.
72. **Facklam RR, Collins MD.** Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 731-734.
73. **Faller A, Schleifer KH.** Modified oxidase and Benzidine tests for separation of staphylococci from micrococci. *J Clin Microbiol* 1981; 13: 1031-1035.
74. **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.
75. **Farrow JAE, Collins MD.** *Enterococcus hirae*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens. *Int J Syst Bacteriol* 1985; 35: 73-75.
76. **Felmingham D, Wilson APR, Quintana AI et al.** *Enterococcus* species in urinary tract infection. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 295-301.
77. **Foulquie-Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E et al.** The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 2006; 106: 1-24.
78. **Fournier JM, Bouvet A, Mathieu D et al.** New latex reagent using monoclonal antibodies to capsular polysaccharide for reliable identification of

- both oxacillin-susceptible and oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1993; 31: 1342-1344.
79. **Fournier JM.** Capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*, p. 533-45 In Wardström T, Eliason I, Holder I, Ljungh A (ed.), *Pathogenesis of wound and biomaterial-associated infections*, 1990. Springer-Verlag, London, UK.
 80. **Franceschi F, Duffy EM.** Structure based drug design meets the ribosome. Biochem Pharmacol 2006; 71: 1016-1025.
 81. **Franceschi F, Kanyo Z, Sherer EC et al.** Macrolide resistance from the ribosome perspective. Curr Drug Targets Infect Disord 2004; 4: 177-191.
 82. **Franz CMAP, Holzapfel WH, Stiles ME.** Enterococci at the crossroads of food safety? Int J Food Microbiol 1999; 47: 1-24.
 83. **Frenay HME, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Molkenboer MJCH et al.** Long-term carriage and transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after discharge from hospital. J Hosp Infect 1992; 22: 207-15.
 84. **Garcia-Garrote F, Cercenado E, Bouza E.** Evaluation of a new system, VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. J Clin Microbiol 2000; 38: 2108-2111.
 85. **Gardin F, Martuscelli M, Caruso MC et al.** Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. Int J Food Microbiol 2001; 64: 105-117.
 86. **George CG, Kloos WE.** Comparison of the *Smai*-digested chromosomes of *Staphylococcus epidermidis* and the closely related species *Staphylococcus capitis* and *Staphylococcus caprae*. Int J Syst Bacteriol 1994; 44: 404-409.
 87. **Gerber SI, Jones RC, Scott MV et al.** Management of Outbreaks of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* infection in the neonatal intensive care unit: a consensus statement. Infect Control Hosp Epidemiol 2006; 27: 139-145.
 88. **Gilmore M (ed.).** *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*, 2002. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 89. **Giraffa G.** Enterococci from foods. FEMS Microbiol Rev 2002; 26: 163-171.

90. **Goldstein J, Schulman R, Kelly E et al.** Effect of different media on determination of novobiocin resistance for differentiation of coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 1983; 18: 592-595.
91. **Gomez-Gil R, Romero-Gomez MP, Garcia-Arias A et al.** Nosocomial outbreak of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* infection in a tertiary care hospital. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 65: 175-9.
92. **Gonzales RD, Schreckenberger PC, Graham MB et al.** Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. Lancet 2001; 357: 1179.
93. **González-Zorn B, Courvalin P.** VanA-mediated high level glycopeptide resistance in MRSA. Lancet Infect Dis. 2003;3:67-8.
94. **Gordillo ME, Singh KV, Murray BE.** Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*. J Clin Microbiol 1993; 31: 1570-1574.
95. **Gordon S, Swenson JS, Hill BC et al.** Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. J Clin Microbiol 1992; 30: 2373-2378.
96. **Green M, Barbadora K, Donabedian S et al.** Comparison of field inversion gel electrophoresis with contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis as a typing method for *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol 1995; 33: 1554-1557.
97. **Hadorn K, Lenz W, Kayser FH et al.** Use of a ribosomal RNA gene probe for epidemiological study of methicillin and ciprofloxacin resistance *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990; 9: 649-653.
98. **Halcomb EJ, Fernandez R, Griffiths R et al.** The infection control management of MRSA in acute care. Int J Evid Based Healthc 2008; 6: 440-467.
99. **Hamilton-Miller JMT, Shah S.** Identification of clinically isolated vancomycin-resistant enterococci: comparison of API and BBL Crystal systems. J Med Microbiol 1999; 48: 695-696.
100. **Hanberger H, Diekema D, Fluit A et al.** Surveillance of antibiotic resistance in European ICUs. J Hosp Infect 2001; 48: 161-176.

101. **Hancock LE, Gilmore MS. Pathogenicity of enterococci**, p. 251-258. In Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ *et al* (ed.), *Gram-Positive Pathogens*, 2000. ASM Press, Washington, D.C.
102. **Hart D.** Operation room infections. *Arch Surg* 1937; 34: 874-96.
103. **Health Protection Agency.** Bacteraemia, 2007. Available from www.hpa.org.uk
104. **Health Protection Agency.** *Enterococcus* spp. and Glycopeptide-Resistant Enterococci (GRE), 2005. Available from www.hpa.org.uk.
105. **Hebert GA, Crowder CG, Hancock GA et al.** Characteristics of coagulase-negative staphylococci that help differentiate these species and other members of the family *Micrococcus*. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1939-1949.
106. **Hebert GA.** Hemolysins and other characteristics that help differentiate and biotype *Staphylococcus lugdunensis* and *Staphylococcus schleiferi*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2452-2431.
107. **Heilman C, Peters G.** Biology and pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis*, p 442-449. In Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, *et al*, (ed.), *Gram-positive pathogens*, 2000. ASM, Washington, D.C.
108. **Hill RL, Kearns AM, Nash J et al.** Linezolid-resistant ST36 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with prolonged linezolid treatment in two paediatric cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 442-445.
109. **Hollis RJ, Barr JL, Doebbeling BN et al.** Familial carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and subsequent infection in a premature neonate. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 328-332.
110. **Honore N, Marchal G, Cole ST.** Novel mutation in 16S rRNA associated with streptomycin dependence in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 769-770.
111. **Howe RA, Wooton M, Noel AR et al.** Activity of AZD2563, a novel oxazolidinone, against *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to vancomycin or linezolid. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3651-3652.
112. **Hsueh PR, Teng LJ, Chen YC et al.** Recurrent bacteremic peritonitis caused by *Enterococcus cecorum* in patients with liver cirrhosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2450-2452.

113. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
114. **Hunt CP.** The emergence of enterococci as a cause of nosocomial infection. *Br J Biomed Sci* 1998; 55: 149-156.
115. **Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS.** Multiple-resistant enterococci: the nature of the problems and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 239-249.
116. **Isaacs D, on behalf of the Australasian Study Group for Neonatal Infections.** A ten year, multicenter study of coagulase negative staphylococcal infections in Australasian neonatal units. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003; 88: F89–F93.
117. **Isenberg HD.** Tests to detect high-level aminoglycoside resistance in enterococci, p 5.4.1-5.4.8. *In* Isenberg HD (ed.), *Clinical Microbiology Procedure Handbook*, vol. 1, 1992. American Society of Microbiology, Washington, D.C.
118. **Ivanov IT, Boytcheva S, Mihailova G.** 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* 1999; 24: 217-227.
119. **Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS.** Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 462-478.
120. **John JF, Grieshop TJ, Atkins LM et al.** Widespread colonization of personnel at a veterans affairs medical center by methicillin-resistant, coagulase-negative *staphylococcus*. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 380-388.
121. **Johnson AP, Tysall L, Stockdale MV et al.** Emerging linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from two Austrian patients in the same intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 751-754.
122. **Johnson WM, Tayler SD.** PCR detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus aureus*, p. 294-299. *In* Persing DH, Smith TF, Tenover FC et al (ed.), *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*, 1993. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
123. **Jones RN, Della-Latta P, Lee LV et al.** Linezolid-resistant *Enterococcus faecium* isolated from a patient without prior exposure to an oxazolidinone:

- report from the SENTRY antimicrobial surveillance proGram. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 42: 137-139.
124. **Jones RN, Fritsche TR, Sader HS *et al.*** LEADER surveillance proGram results for 2006: an activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from the United States (50 medical centers). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007A: 59: 309-317.
 125. **Jones RN, Fritsche TR, Sader HS *et al.*** Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum ProGram Results for 2006: An activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from 16 countries. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007B: 59: 199-209.
 126. **Jones RN, Johnson DM, Erwin ME.** In vitro antimicrobial activities and spectra of U-100592 and U-100766, two novel fluorinated oxazolidinones. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 720-726.
 127. **Jones RN, Ross JE, Bell JM *et al.*** Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum proGram: linezolid surveillance proGram results for 2008. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009: 65: 404-413.
 128. **Jones RN, Sader HS, Erwin ME.** Emerging multiply resistant enterococci among clinical isolates. I. Prevalence data from 97 medical center surveillance study in the United States. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995; 21: 85-93.
 129. **Kacmaz B, Aksoy A.** Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25: 535-538.
 130. **Karakawa WW.** The role of capsular antigens in *Staphylococcus aureus* immunity. *Zentralbl Bakteriol* 1992; 277: 415-418.
 131. **Kauffman CA, Bradley SF.** Epidemiology of community acquired infection, p. 287-308. In Crossley KB, Archer GL (ed.), *The staphylococci in human disease*, 1997. Churchill Livingstone, New York, N.Y.
 132. **Kawalec M, Gniadkowski M, Hryniewicz W.** Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a hospital in Gdansk, Poland, due to horizontal transfer of different Tn1546-like transposon variants and clonal spread of several strains. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3317-3322.
 133. **Kehrenberg C, Schwarz S, Jacobsen L *et al.*** A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance. Methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Mol Microbiol* 2005; 57: 1064-1073.

134. **Kehrenberg C, Schwarz S.** Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cfr* among chloramphenicol-resistant staphylococcus isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1156-1163.
135. **Kelly S, Collins J, Maguire M.** An outbreak of colonization with linezolid resistant *Staphylococcus epidermidis* in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2008; 63: 901-907.
136. **Kilpper R, Buhl U, Schleifer KH.** Nucleic acid homology studies between *Peptococcus saccharolyticus* and various anaerobic and facultative anaerobic Gram-positive cocci. *FEMS Microbiol Lett* 1980; 8: 205-210.
137. **Klein G, Pack A, Bonaparte C et al.** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 1998; 41: 103-125.
138. **Klein G.** Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int J Food Microbiol* 2003; 88: 123-131.
139. **Kloos WE, Ballard DN, George CG et al.** Delimiting the genus *Staphylococcus* through description of *Macrococcus caseolyticus* gen. nov., comb. Nov., *Macrococcus bovis* sp. nov., and *Macrococcus carouselicus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1998; 48: 859-877.
140. **Kloos WE, Bannerman TL.** *Staphylococcus* and *Micrococcus*, p. 282-298. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA et al (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed, 1995. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
141. **Kloos WE, Bannerman TL.** Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 117-140.
142. **Kloos WE, Orban BS, Walker DD.** Plasmid composition of *Staphylococcus* species. *Can J Microbiol* 1981; 27: 271-278.
143. **Kloos WE, Schleifer KH, Götz F.** The genus *Staphylococcus*, p. 1369-1420. In Balows A, Trüper HG, Dworkin M et al (ed.), *The Prokaryotes*, 2nd ed, 1991. Springer-Verlag, New York, N.Y.
144. **Kloos WE, Schleifer KH.** Simplified scheme for routine identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* 1975; 1: 82-88.
145. **Kloos WE.** Systematics and the natural history of staphylococci. 1. *J Appl Bacteriol Symp Suppl* 1990; 69: 25S-37S.

146. **Kloos WE.** Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans, p. 113-137, *In* Crossley B, Archer GL (ed.), *The staphylococci in human disease*, 1997. Churchill Livingstone, New York, N.Y.
147. **Kloss P, Xiong L, Shinabarger DL et al.** Resistance mutations in 23S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *J Mol Biol* 1999; 294: 93-101.
148. **Kluytmans J, Van Belkum A, Verbrugh H.** Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 505-520.
149. **Kluytmans JA, Mouton JW, Ijzerman EP et al.** Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as a major risk factor wound infections after cardiac surgery. *J Infect Dis* 1995; 171: 216-219.
150. **Kotilainen P, Huovinen P, Eerola E.** Application of gas-liquid chromatographic analysis of cellular fatty acids for species identification and typing of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 315-322.
151. **Kuhn I, Burman LG, Haeggman S et al.** Biochemical fingerprinting compared with ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis of DNA for epidemiological typing of enterococci. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2812-2817.
152. **Kuhn I, Iversen A, Burman LG et al.** Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment - a European study. *Int J Food Microbiol* 2003; 88: 133-145.
153. **Kwok AYC, Su SC, Reynolds RP et al.** Species identification and phylogenetic relationships based on partial *hsp60* gene sequences within the genus *Staphylococcus*. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49: 1181-1192.
154. **Lachica RVF, Hoeprich PD, Genigeorgis C.** Metachromatic agar-diffusion microslide technique for detecting staphylococcal nuclease in foods. *Appl Microbiol* 1972; 23: 168-169.
155. **Lachica RVF, Jang SS, Hoeprich PD.** Thermonuclease seroinhibition test for distinguishing *Staphylococcus aureus* and other coagulase-positive staphylococci. *J Clin Microbiol* 1979; 9: 141-143.
156. **Lacoux PA, Zordens JZ, Fentin CM et al.** Characterization of enterococcal isolates by restriction enzyme analysis of genomic DNA. *Epidemiol Infect* 1992; 109: 69-80.

157. **Leach KL, Swaney SM, Colca JR *et al.*** The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria. *Mol Cell* 2007; 26: 393-402.
158. **Lee WG, Jernigan JA, Rasheed JK *et al.*** Possible horizontal transfer of the *vanB2* gene among genetically diverse strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a Korean hospital. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1165-1168.
159. **Liakopoulos A, Neocleous C, Klapsa D *et al.*** A T2504A mutation in the 23S rRNA gene responsible for high-level resistance to linezolid of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemoth* 2009; 64: 206-211.
160. **Liakopoulos A, Spiliopoulou I, Damani A *et al.*** Dissemination of two international linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones in Greek hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1070-1071.
161. **Lin AH, Murray RW, Vidmar TJ *et al.*** The oxazolidinone eperezolid binds to the 50S ribosomal subunit and competes with binding of chloramphenicol and lincomycin. *Antimicrob. Agents Chemother* 1997; 41: 2127-2131.
162. **Lincopan N, de Almeida LM, Elmor de Araujo MR *et al.*** Linezolid resistance in *Staphylococcus epidermidis* associated with a G2603T mutation in the 23S rRNA gene. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34: 281-282.
163. **Livermore DM, Mushtaq S, Warner M *et al.*** Activity of oxazolidinone TR-700 against linezolid-susceptible and -resistant staphylococci and enterococci. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 713-715.
164. **Livermore DM, Mushtaq S, Warner M.** Susceptibility testing with linezolid by different methods, in relation to published general breakpoints. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 452-454.
165. **Livermore DM, Warner M, Mushtaq S *et al.*** *In vitro* activity of the oxazolidinone RWJ-416457 against linezolid-resistant and -susceptible staphylococci and enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1112-1114.
166. **Livermore DM.** Antibiotic resistance in staphylococci. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16 (suppl 1): S3-S10.
167. **Livermore DM.** Bacterial Resistance: Origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis* 2003; 36 (Suppl 1): 11-23.

168. **Livornese Jr LL, Dias S, Samel C *et al.*** Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. *Ann Intern Med* 1992; 117: 112-116.
169. **Locke JB, Hilgers M, Shaw KJ.** Mutations in ribosomal protein L3 are associated with oxazolidinone resistance in staphylococci of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2009A: 53: 5275-5278.
170. **Locke JB, Hilgers M, Shaw KJ.** Novel ribosomal mutations in *Staphylococcus aureus* strains identified through selection with the oxazolidinones linezolid and torezolid (TR-700). *Antimicrob Agents Chemother* 2009B: 53: 5265-5274.
171. **Loeb M, Salama S, Armstrong-Evans M *et al.*** A case-control study to detect modifiable risk factors for colonization with vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; 20: 760-763.
172. **Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C *et al.*** The *cfr* rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptoGramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2006: 50: 2500-2505.
173. **Long KS, Vester B.** Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrob Agents Chemother* 2012: 56: 603-612.
174. **Looney WJ.** Small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Br J Biomed Sci* 2000: 57: 317-322.
175. **Ludwig W, Schleifer KH, Fox GE *et al.*** A phylogenetic analysis of staphylococci, *Peptococcus saccharolyticus* and *Micrococcus mucilaginosus*. *J Gen Microbiol* 1981: 125: 357-366.
176. **Luginbuhl LM, Rotbart HA, Facklam RR *et al.*** Neonatal enterococcal sepsis: case-control study and description of an outbreak. *Pediatr Infect Dis J* 1987; 6: 1022-1030.
177. **Maniatis AN, Petinaki E, Pournaras S.** Molecular epidemiology and resistance mechanisms of enterococci to oxazolidinones and streptoGramins, p. 117-156. *In* Nobumichi K (ed.), *Drug Resistance of Enterococci: Epidemiology and Molecular Mechanisms*, 2006. Research Singpost, Kerala, India.

178. **Marshall SA, Wilke WW, Pfaller MA et al.** *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular *mecA* characterisation of oxacillin resistance in the SCOPE proGramme. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 30: 205-214.
179. **Marshall SH, Donskey CJ, Hutton-Thomas R et al.** Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3334-3336.
180. **Martín B, Corominas L, Garriga M et al.** Identification and tracing of *Enterococcus* spp. by RAPD-PCR in traditional fermented sausages and meat environment. *J Appl Microbiol* 2009; 106: 66-77.
181. **Martinez S, Lopez M, Bernardo A.** Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells. *Lett Appl Microbiol* 2003; 37: 475-481.
182. **Martinez-Murcia AJ, Collins MD.** *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol Lett* 1991; 80: 69-74.
183. **Matassova NB, Rodnina MV, Endermann R et al.** Ribosomal RNA is the target for oxazolidinones, a novel class of translational inhibitors. *RNA* 1999; 5: 939-946.
184. **Mayhall CG.** Hospital epidemiology and infection control (3rd ed.), p 495-510, 2004. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
185. **Mazzariol A, Lo Cascio G, Kocsis E et al.** Outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in an Italian intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 523-527.
186. **Megran DW.** Enterococcal endocarditis. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 63-71.
187. **Mehrotra M, Wang G, Johnson WM.** Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1032-1035.
188. **Meka VG, Pillai SK, Sakoulas G et al.** Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. *J Infect Dis* 2004; 190: 311-317.

189. **Mendes RE, Deshpande LM, Castanheira M *et al.*** First report of *cfr*-mediated resistance to linezolid in human staphylococci clinical isolates recovered in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2244-2246.
190. **Mendes RE, Deshpande LM, Farrell DJ *et al.*** Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 2329-2335.
191. **Mendes RE, Jones RN, Deshpande LM *et al.*** Daptomycin activity tested against linezolid-nonsusceptible Gram-positive clinical isolates. *Microb Drug Resist* 2009; 15: 245-249.
192. **Mendoza M, Meugnier H, Bes M *et al.*** Identification of *Staphylococcus* species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. *Int J Syst Bacteriol* 1998; 48: 1049-1055.
193. **Mercier RC, Penzak SR, Rybak MJ.** In vitro activities of an investigational quinolone, glycylcycline, glycopeptide, streptoGramin, and oxazolidinone tested alone and in combinations against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2573-2575.
194. **Merquior VLC, Peralta JM, Facklam RR *et al.*** Analysis of electrophoretic whole-cell protein profiles as a toll for characterization of *Enterococcus* species. *Curr Microbiol* 1994; 28: 149-153.
195. **Mevissen-Verhage EAE, Marcelis JH, Harmsen-van Amerongen WCM *et al.*** Iron affects the intestinal flora. I. Development of the neonatal gut flora during the first week of life. *Eur J Clin Microbiol* 1997; 4: 14-18.
196. **Miall LS, McGinley NT, Brownlee KG *et al.*** Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 2001; 84: 160-162.
197. **Miwa K, Fukuyama M, Sakai R *et al.*** Sensitive enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of bacterial superantigens and antibodies against them in human plasma. *Microbiol Immunol* 2000; 44: 519-523.
198. **Miyakis S, Pefanis A, Tsakris A.** The challenges of antimicrobial drug resistance in Greece. *Clin Infect Dis* 2011; 53: 177-84.
199. **Moeller V.** Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1955; 36: 158-172.

200. **Moellering Jr RC.** A novel antimicrobial agent joins the battle against resistant bacteria. *Ann Intern Med* 1999; 130: 155-157.
201. **Moellering Jr RC.** Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 1173-1178.
202. **Moellering Jr RC.** Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1196-1199.
203. **Morales G, Picazo JJ, Baos E et al.** Resistance to linezolid is mediated by the *cfr* gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 821-825.
204. **Morisson D, Woodford N, Barrett SP et al.** DNA banding pattern polymorphism in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and criteria defining strains. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1084-1091.
205. **Moubareck C, Meziane-Cherif D, Courvalin P et al.** VanA-type *Staphylococcus aureus* strain VRSA-7 is partially dependent on vancomycin for growth. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3657-3663.
206. **Mulanovich VE, Huband MD, McCurdy SP.** Emergence of linezolid-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* in a cancer center linked to increased linezolid utilization. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 2001-2004.
207. **Mundy LM, Sahm DF, Gilmore MS.** Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 513-522.
208. **Murray BE, Singh KV, Heath JD et al.** Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. *J Clin Microbiol* 1990A; 28: 2059-2063.
209. **Murray BE.** The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev* 1990B; 3: 46-65.
210. **Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH et al (ed.).** *Manual of Clinical Microbiology*, Vol 1, 8th ed, p 304-404, 2003. Am Soc Clin Microbiol, Washington, D.C.
211. **Musser JM, Schlievert PM, Chow AW et al.** A single clone of *Staphylococcus aureus* causes majority of cases of toxic shock syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 225-229.
212. **Mutnick AH, Biedenbach DJ, Jones RN.** 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* 2003; 46: 63-68.
213. **Nakajo K, Iwami Y, Komori R et al.** The resistance to acidic and alkaline environments of endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. *Int Congr Ser* 2005; 1284: 191-192.
 214. **Nallapareddy SR, Duh RW, Singh KV et al.** Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: pilot study using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 868-876.
 215. **National Nosocomial Infections Surveillance.** System report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. A report from the NNIS System. *Am J Infect Control* 2004; 32: 470-485.
 216. **Neely AN, Maley MP.** Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastic. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 724-726.
 217. **Negishi H, Matsuda T, Okuyama K et al.** *Staphylococcus aureus* causing chorioamnionitis and fetal death with intact membranes at term. A case report. *J Reprod Med* 1998; 43: 397-400.
 218. **Nierhaus KH**, chapter 3. In Nierhaus KH, Wilson DN (ed.), *Protein synthesis and ribosome structure*, 2004. Wiley-VCH & Co, Weinheim, Germany.
 219. **North SE, Ellington MJ, Johnson AP et al**, p. 102. Novel pyrosequencing assays to detect T2500A and other mutations conferring linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*. In ProGram and Abstracts of the 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC, USA, 16-19 December 2005. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 220. **Noskin GA, Siddiqui F, Stosor V et al.** In vitro activities of linezolid against important Gram-positive bacterial pathogens including vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2059-2062.
 221. **Ntokou E**, Stathopoulos C, Kristo I, Dimitroulia E, Labrou M, Vasdeki A, Makris D, Zakynthinos E, Tsakris A, Pournaras S. Intensive care unit dissemination of multiple clones of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 1819-1823.
 222. **Ogston A.** Report upon microorganisms in surgical diseases. *Br Med J* 1881; 1: 369-375.

223. **Oliveira DC, Crisostomo I, Santos-Sanches I et al.** Comparison of DNA sequencing of the protein A gene polymorphic region with other molecular typing techniques for typing epidemiologically diverse collections of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2001; 39: 574-580.
224. **Olmos A, Camarena JJ, Nogueira JM et al.** Application of an optimized and highly discriminatory method based on arbitrarily primed PCR for epidemiologic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial infections. J Clin Microbiol 1998; 36: 1128-1134.
225. **Panlilio AL, Culver DH, Gaynes RP et al.** Methicillin-resistant *S. aureus* in US hospitals, 1975-1991. Infect Control Hosp Epidemiol 1992; 13: 582-586.
226. **Parsonnet J, Gillis ZA.** Production of tumor necrosis factor by human monocytes in response to toxic shock syndrome toxin-1. J Infect Dis 1988; 158: 1026-1033.
227. **Parsonnet J, Hickman RK, Eardley DD et al.** Induction of human interleukin-1 by toxic shock syndrome-1. J Infect Dis 1985; 151: 514-522.
228. **Patel R, Piper KE, Rouse MS et al.** Determination of 16S rRNA sequences of enterococci and application to species identification of nonmotile *Enterococcus gallinarum* isolates. J. Clin Microbiol 1998; 36: 3399-3407.
229. **Patel R, Piper KE, Rouse MS et al.** Frequency of isolation of *Staphylococcus lugdunensis* among staphylococcal isolates causing endocarditis: a 20-Year experience. J Clin Microbiol 2000; 38: 4262-4263.
230. **Pegues DA, Pegues CF, Hibberd BL et al.** Emergence and dissemination of a high vancomycin-resistant *vanA* strains of *Enterococcus faecium* at a large teaching hospital. J Clin Microbiol 1997; 35: 703-707.
231. **Perlada DE, Smulian GA, Cushion MT.** Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of enterococci in Cincinnati, Ohio: a prospective citywide survey. J Clin Microbiol 1997; 35: 2342-2347.
232. **Peters J, Kondo KL, Lee RK et al.** In vitro activity of oxazolidinones against *Mycobacterium avium* complex. J Antimicrob Chemother 1995; 35: 675-679.
233. **Peters J, Mac K, Wichmann-Schauer H et al.** Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. Int J Food Microbiol 2003; 88: 311-314.

234. **Pfaller MA, Herwaldt LA.** Laboratory, clinical and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev 1988; 1: 281-299.
235. **Pfaller MA, Jones RN, Doern GV *et al.*** Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance proGram (United States and Canada, 1997). Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 1762-1770.
236. **Piette A, Verschraegen G.** Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. Vet Microbiol 2009; 134: 45-54.
237. **Pillai SK, Sakoulas G, Wennersten C *et al.*** Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: characterization and stability of resistant phenotype. J Infect Dis 2002; 186: 1603-1607.
238. **Pittet D, Tarara D, Wenzel RP.** Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. JAMA 1994; 271: 1598-1601.
239. **Plessis P, Lamy T, Donnio PY *et al.*** Epidemiologic analysis of glycopeptide-resistant *Enterococcus* strains in neutropenic patients receiving prolonged vancomycin administration. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995; 14: 959-963.
240. **Poh CH, Oh HML, Tan AL.** Epidemiology and clinical outcome of enterococcal bacteraemia in an acute care hospital. J Infect 2006; 52: 383-386.
241. **Pratti A, Karanika M, Maniatis AN *et al.*** Activity of linezolid against Gram-positive cocci: a multicentre study in Greek hospitals. Int J Antimicrob Agents 2007; 29:604-605.
242. **Prevost G, Jaulhac B, Piemont Y.** DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol 1992; 30: 967-973.
243. **Proctor RA, Peters G.** Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications. Clin Infect Dis 1998; 27: 419-423.
244. **Proctor RA, Van Langevelde P, Kristjansson M *et al.*** Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 1995; 20: 95-102.

245. **Protonotariou E, Dimitroulia E, Pournaras S et al.** Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Greece between 2002 and 2007. J Hosp Infect 2010; 75: 225-227.
246. **Prystowsky J, Siddiqui F, Chosay J et al.** Resistance to linezolid: characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant enterococci. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2154-2156.
247. **Qin Y, Polacek N, Vesper O et al.** The oxazolidinone class of drugs find their orientation on the ribosome. Cell 2006; 127: 721-733.
248. **Quednau M, Ahrne S, Molin G.** Genomic relationships between *Enterococcus faecium* strains from different source and with different antibiotic resistance profiles evaluated by restriction endonuclease analysis of total chromosomal DNA using *EcoRI* and *PvuII*. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 177-180.
249. **Rahim S, Pillai SK, Gold HS et al.** Linezolid-resistant, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection in patients without prior exposure to linezolid. Clin Infect Dis 2003; 36: 146-148.
250. **Ratjen F, Comes G, Paul K et al.** Effect of continuous antistaphylococcal therapy on the rate of *P. aeruginosa* acquisition in patients with cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 2001; 31: 13-16.
251. **Roberts MC.** Update on macrolide-lincosamide-streptoGramin, ketolide and oxazolidinone resistance genes. FEMS Microbiol Lett 2008; 282: 147-159.
252. **Rodrigues U, Collins MD.** Phylogenetic analysis of *Streptococcus saccharolyticus* based on 16S rRNA sequencing. FEMS Microbiol Lett 1990; 71: 231-234.
253. **Rosenbach FJ.** In Mikroorganismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen, 1884. Wiesbaden, JF Bergmanns Verlang.
254. **Ross JE, Fritsche TR, Sader HS et al.** Oxazolidinone susceptibility patterns for 2005: International Report from the Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum Study. Int J Antimicrob Agents 2007; 29: 295-301.
255. **Rupp ME, Archer GL.** Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. Clin Infect Dis 1994; 19: 231-245.
256. **Rybak MJ, Hershberger E, Moldovan T et al.** In vitro activities of daptomycin, vancomycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin against

- staphylococci and enterococci, including vancomycin intermediate and resistant strains. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 1062-1066.
257. **Sader HS, Moet GJ, Jones RN.** Antimicrobial resistance among Gram-positive bacteria isolated in Latin American hospitals. J Chemother 2009; 21: 611-620.
 258. **Saeedi B, Hällgren A, Jonasson J et al.** Modified pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of enterococci. APMIS 2002; 110: 869-874.
 259. **Sander P, Belova L, Kidan YG et al.** Ribosomal and non-ribosomal resistance to oxazolidinones: species-specific idiosyncrasy of ribosomal alterations. Mol Microbiol 2002; 46: 1295-1304.
 260. **Savor C, Pfaller MA, Kruszynski JA et al.** Comparison of genomic methods for differentiating strains of *Enterococcus faecium*: assessment using clinical epidemiological data. J Clin Microbiol 1998; 36: 3327-3331.
 261. **Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP.** Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. Am J Med 1991; 91: 79S-82S.
 262. **Schleifer KH, Kilpper-Balz R.** Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int J Syst Bacteriol 1984; 34: 31-34.
 263. **Schleifer KH.** Gram-positive cocci, p. 999-1002. In Holt JG, Sneath PHA, Mair NS, Sharpe MS (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, 1986A. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
 264. **Schleifer KH.** Taxonomy of coagulase-negative staphylococci, p. 11-26. In Mardh PA, Schleifer KH (ed.), *Coagulase-Negative Staphylococci*, 1986B. Almquist & Wiksell International, Stockholm, Sweden.
 265. **Schlievert PM, Shands KM, Dan BB et al.** Identification and characterization of an exotoxin from *Staphylococcus aureus* associated with toxic shock syndrome. J Infect Dis 1981; 143: 509-516.
 266. **Schwalbe RS, Stapleton JT, Gilligan PH.** Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. N Engl J Med 1987; 316: 927-931.

267. **Schwarz S, Werckenthin C, Kehrenberg C.** Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 2530-2533.
268. **Seedat J, Zick G, Klare I et al.** Rapid emergence of resistance to linezolid during linezolid therapy of an *Enterococcus faecium* infection. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 4217-4219.
269. **Seifert H, Kaltheuner M, Perdreau-Remington F.** *Micrococcus luteus* endocarditis: case report and review of literature. Zentbl Bakteriol 1995; 282: 431-435.
270. **Sekiguchi J, Fujino T, Saruta K et al.** Prevalence of erythromycin-, tetracycline- and aminoglycoside- resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals in Tokyo and Kumamoto. Jpn J Infect Dis 2004; 57: 74-77.
271. **Seral C, Saenz Y, Algarate S.** Nosocomial outbreak of 256 methicillin and linezolid resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with catheter-related infections in intensive care units. Int J Med Microbiol 2011; 301: 354-358.
272. **Shanks OC, Santo Domingo JW, Graham JE.** Use of competitive DNA hybridization to identify differences in the genomes of bacteria. J Microbiol Methods 2006; 66: 321-330.
273. **Sherer CR, Sprague BM, Campos JM et al.** Characterizing vancomycin-resistant Enterococci in Neonatal Intensive Care. Emerg Infect Dis 2005; 11: 1470-1472.
274. **Shubhra S, Gopa B, Agarwal SK et al.** Simple method for speciation of clinically significant coagulase-negative staphylococci and its antibiotic sensitivity/resistant pat-tern in NICU of tertiary care centre. Biomedical Res 2008; 19: 97-101.
275. **Silvestri LG, Hill LR.** Agreement between deoxyribonucleic acid base composition and taxonomic classification of Gram-positive cocci. J Bacteriol 1965; 90: 136-140.
276. **Slee AM, Wuonola MA, McRipley RJ.** Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: in vitro and in vivo activities of DuP 105 and DuP 721. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31: 1791-1797.

277. **Slifkin M, Merkow LP, Kreuzberger SA et al.** Characterization of CO₂ dependent microcolony variants of *Staphylococcus aureus*. Am J Clin Pathol 1971; 56: 584-592.
278. **Souli M, Sakka V, Galani I et al.** Colonisation with vancomycin- and linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in a university hospital: molecular epidemiology and risk factor analysis. Int J Antimicrob Agents 2009; 33: 137-142.
279. **Souvenir D, Anderson JDE, Palpant S et al.** Blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: antisepsis, pseudobacteremia, and therapy of patients. J Clin Microbiol 1998; 36: 1923-1926.
280. **Spencer RC.** Predominant pathogens found in the European prevalence of infection in intensive care study. Eur J Clin Infect Dis 1996; 15: 281-285.
281. **Spiliopoulou I, Damani A, Chini V et al.** Linezolid-resistant enterococci in Greece: epidemiological characteristics. Chemother 2011; 57: 181-185.
282. **Spink WW, Ferris V.** Quantitative action of penicillin inhibitor from penicillin-resistant strains of staphylococci. Science 1945; 102: 221-223.
283. **Stackebrandt E, Woese CR.** A phylogenetic dissection of the family *Micrococcaceae*. Curr Microbiol 1979; 2: 317-322.
284. **Stefania S, Bongiorno D, Mongelli G et al.** Linezolid resistance in Staphylococci. Pharmaceut 2010; 3: 1988-2006.
285. **Stern CS, Carvahlo MGS, Teixeira LM.** Characterization of enterococci isolated from human and nonhuman sources in Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis 1994; 20: 61-67.
286. **Stiles ME, Holzapfel WH.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int J Food Microbiol 1997; 36: 1-29.
287. **Strausbaugh LJ, Gilmore MS.** Enterococcal infections, p. 280-301. In Stevens DL, Kaplan EL (ed.) *Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis*, 2000. Oxford University Press, Inc., New York, N.Y.
288. **Sundqvist G, Figdor D, Persson S et al.** Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1998; 85: 86-93.
289. **Suppola JP, Kohlo E, Salmelinna S et al.** *vanA* and *vanB* incorporate into an endemic ampicillin-resistant vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium*

- strain: effect on interpretation of clonality. J Clin Microbiol 1999; 37: 3934-3939.
290. **Svec P, Devriese LA, Sedlacek I et al.** *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51: 1567-1574.
 291. **Swaney SM, Shinabarger DL, Schaadt RD et al.** Oxazolidinone resistance associated with a mutation in the peptidyl transferase region of 23S rRNA. In ProGram and Abstracts of the 38th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, CA USA, 24-27 September 1998. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 292. **Swoboda S, Fritz S, Martignoni ME et al.** Varying linezolid susceptibility of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates during therapy: a case report. J Antimicrob Chemother 2005; 56: 787-789.
 293. **Tambyah PA, Marx JA, Maki DG.** Nosocomial infection with vancomycin-dependent enterococci. Emerg Infect Dis 2004; 10: 1277-1281.
 294. **Teixeira LM, Carvahlo MDGS, Espinola MMB et al.** *Enterococcus porcinus* sp. nov. and *Enterococcus ratti* sp. nov. associated with enteric disorders in animals. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51: 1737-1743.
 295. **Teixeira LM, Carvahlo MGS, Merquior VL et al.** Recent approaches on the taxonomy of the enterococci and some related microorganisms. Adv Exp Med Biol 1997; 418: 397-400.
 296. **Teixeira LM, Facklam RR, Steigerwalt AG et al.** Correlation between phenotypic characteristics and DNA relatedness with *Enterococcus faecium* strains. J Clin Microbiol 1995; 33: 1520-1523.
 297. **Teixeira LM, Facklam RR.** Enterococcus, p. 422- 433. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH et al (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed, 2003. ASM Press, Washington, D.C.
 298. **Tenover FC, Arbeit RD, Roering RV et al.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33: 2233-2239.
 299. **Thomas SR, Gyi KM, Gaya H et al.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact at a national cystic fibrosis center. J Hosp Infect 1998; 40: 203-209.

300. **Thomson-Carter FM, Carter PE, Pennington TH.** Differentiation of staphylococcal species and strains by ribosomal RNA gene restriction patterns. J Gen Microbiol 1989; 135: 2093-2097.
301. **Tierno Jr PM, Hanna BA.** Ecology of toxic shock syndrome: amplification of toxic shock syndrome toxin 1 by materials of medical interest. Rev Infect Dis 1989; 11 (Suppl. 1): S182-S186.
302. **Toh SM, Xiong L, Arias CA et al.** Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. Mol Microbiol 2007; 64: 1506-1514.
303. **Tomayko JF, Murray BE.** Analysis of *Enterococcus faecalis* isolates from intercontinental sources by multilocus enzyme electrophoresis and pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 1995; 33: 2903-2907.
304. **Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G et al.** Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. Lancet 2001; 358: 207-208.
305. **Turabelidze D, Kotetishvili M, Kreger A et al.** Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-Resistant Enterococci. J Clin Microbiol 2000; 38: 4242-4245.
306. **Tyrell GJ, Turnbull L, Teixeira LM et al.** *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *Enterococcus pallens* sp. nov. isolated from human clinical specimens. J Clin Microbiol 2002; 40: 1140-1145.
307. **Urwin R, Maiden MC.** Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiol 2003; 11: 479-487.
308. **Van Acken U.** Proteinchemical studies on ribosomal proteins S4 and S12 from ram (ribosomal ambiguity) mutants of *Escherichia coli*. Mol Gen Genet 1975; 140: 61-68.
309. **Van den Berghe E, De Winter T, De Vuyst L.** Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterized by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. Int J Food Microbiol 2006; 107: 159-170.
310. **Van Griethuysen A, Bes M, Etienne J et al.** International multicenter evaluation of latex agglutination tests for identification of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2001; 39: 86-89.

311. **Vancanneyt M, Snauwaert C, Cleenwerck I et al.** *Enterococcus vilorum* sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhea in piglets. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51: 393-400.
312. **Vardakas KZ, Kioumis I, Falagas ME.** Association of pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of linezolid with infection outcome. Curr Drug Metab 2009; 10: 2-12.
313. **Villard L, Kodjo A, Borges E et al.** Ribotyping and rapid identification of *Staphylococcus xylosus* by 16-23S spacer amplification. FEMS Microbiol Lett 2000; 185: 83-87.
314. **Vincent JL.** Microbial resistance: lessons from the EPIC study. Intensive Care Med 2000; 26: S3-S8.
315. **Vincent JL.** Nosocomial infections in adult intensive-care units. Lancet 2003; 361: 2068-2077.
316. **Von Eiff C, Proctor RA, Peters G.** Coagulase-negative staphylococci. Pathogens have major role in nosocomial infections. Postgraduate Med 2001; 110: 63-4, 69-70, 73-6.
317. **Von Eiff C, Proctor RA, Peters G.** Small colony variants of *staphylococci*: link to persistent infections. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2000; 113: 321-325.
318. **Wallace RJ Jr, Brown-Elliott BA, Ward SC et al.** Activities of linezolid against rapidly growing mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 764-767.
319. **Webster JA, Bannerman TL, Hubner R et al.** Identification of the *Staphylococcus sciuri* species group with *EcoRI* fragments containing rRNA sequences and description of *Staphylococcus vitulus* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1994; 44: 454-460.
320. **Welch DF.** Applications of cellular fatty acid analysis. Clin Microbiol Rev 1991; 4: 422-438.
321. **Wieneke AA.** The detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production by strains of *Staphylococcus aureus*. Int J Food Microbiol 1988; 7: 25-30.
322. **Wieser M, Hans-Jurgen B.** Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. Int J Syst Evol Microbiol 2000; 50: 1087-1093.

323. **Wilke WW, Marshall SA, Coffman SL et al.** Vancomycin-resistant *Enterococcus raffinosus*: molecular epidemiology, species identification error, and frequency of occurrence in national resistance surveillance proGram. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997; 28: 43-49.
324. **Wilkinson BJ.** Biology, p. 1-38. *In* Crossley KB, Archer GL (ed.), *The staphylococci in human disease*, 1997. Churchill Livingstone, New York, N.Y.
325. **Willems RJL, Top J, Van den Braak N et al.** Host specificity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Infect Dis* 2000; 182: 816-823.
326. **Willey BM, McGree AJ, Ostrowski MA et al.** The use of molecular typing techniques in the epidemiologic investigation of resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1994; 15: 548-556.
327. **Williams AM, Farrow JAE, Collins MD.** Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Streptococcus cecorum*. *Lett Appl Microbiol* 1989; 8: 185-189.
328. **Wilson DN, Nierhaus KH.** The oxazolidinone class of drugs find their orientation on the ribosome. *Mol Cell* 2007; 26: 460-462.
329. **Wilson DN,** p. 449-527. *In* Nierhaus KH, Wilson DN, (ed.), *Protein Synthesis and Ribosome Structure*, 2004. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
330. **Wilson DN.** The A-Z of bacterial translation inhibitors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2009; 44: 393-433.
331. **Wong A, Reddy SP, Smyth DS et al.** Polyphyletic emergence of linezolid-resistant staphylococci in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 742-748.
332. **Woodford N, Morrison D, Johnson AP et al.** Application of DNA probes for rRNA and *vanA* genes to investigation of a nosocomial cluster of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 653-658.
333. **Wu M, Aralor P, Nash K et al.** Linezolid, a new oxazolidinone, has activity in vitro and in macrophage culture system against *Mycobacterium avium* complex (MAC), abstr E-143. *In* 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998. Washington, D.C.
334. **Wu Z, Wright GD, Walsh CT.** Overexpression, purification, and characterization of VanX, a D-D-dipeptidase which is essential for

- vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147. *Biochem* 1995: 34: 2455-2463.
335. **Xiong L, Kloss P, Douthwaite S et al.** 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* 2000; 182: 5325-5331.
 336. **Yadegar A, Sattari M, Mozafari NA et al.** Prevalence of the genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes and methicillin resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *Microb Drug Resist* 2009; 15: 109-113.
 337. **York MK, Gibbs L, Chehab F et al.** Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 249-253.
 338. **Yugueros J, Temprano A, Berzal B et al.** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene as a useful taxonomic tool for *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4351-4355.
 339. **Zapum A, Contreras-Martel C, Vernet T.** Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32: 361-385.
 340. **Zervos MJ, Dembinski S, Mikesell T et al.** High-level resistance to gentamicin in *Streptococcus faecalis*: risk factors and evidence for exogenous acquisition of infection. *J Infect Dis* 1986; 153: 1075-1083.
 341. **Zimmerman RJ, Kloos WE.** Comparative zone electrophoresis of esterases of *Staphylococcus* species isolated from mammalian skin. *Can J Microbiol* 1976; 22: 771-779.
 342. **Zurenko GE, Todd WM, Hafkin BA.** Development of linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in two compassionate use proGram patients treated with linezolid, Abstract 848, p. 118. In 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), San Francisco, CA, 26-29 September 1999. ASM Press, Washington, D.C.
 343. **Zurenko GE, Yagi BH, Schaadt RD.** In vitro activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 839-845.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ

J Antimicrob Chemother 2012; **67**: 1819–1823
doi:10.1093/jac/dks146 Advance Access publication 24 April 2012

Journal of
Antimicrobial
Chemotherapy

Intensive care unit dissemination of multiple clones of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*

Eleni Ntoku¹, Constantinos Stathopoulos², Ioulia Kristo¹, Evangelia Dimitroulia³, Maria Labrou¹, Afroditi Vasdeki¹, Demosthenes Makris⁴, Epameinondas Zakynthinos⁴, Athanassios Tsakris³ and Spyros Pournaras^{1*}

¹Department of Microbiology, Medical School, University of Thessaly, Larissa, Greece; ²Department of Biochemistry, Medical School, University of Patras, Patras, Greece; ³Department of Microbiology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece; ⁴Critical Care Department, Medical School, University Hospital of Thessaly, Larissa, Greece

*Corresponding author. Tel: +30-2413-502929; Fax: +30-2413-501570; E-mail: pournaras@med.uth.gr

Received 12 January 2012; returned 8 February 2012; revised 24 March 2012; accepted 26 March 2012

Objectives: Outbreaks caused by linezolid-resistant (LR) enterococci remain rare. We report the epidemiological and molecular characteristics of the multidonal dissemination of LR enterococci in the intensive care unit (ICU) of a Greek hospital.

Methods: All LR enterococcal isolates recovered from patients hospitalized in the ICU of the University Hospital of Larissa, Greece, between January 2007 and October 2008 were included. Isolates were tested by PFGE and PCR followed by sequence analysis of the entire 23S rRNA gene. Patient records were retrieved to access patterns of acquisition and outcome.

Results: Sixteen separate patients were infected and/or colonized by 22 LR enterococcal isolates (17 *Enterococcus faecium* and 5 *Enterococcus faecalis*). Linezolid MICs varied from 8 to 16 mg/L; 12 isolates showed cross-resistance to vancomycin. Genotyping revealed as many as seven and three PFGE types among *E. faecium* and *E. faecalis* isolates, respectively, indicating multidonal spread of LR enterococci. Nine patients had received linezolid prior to the recovery of LR enterococci, while the remaining seven patients were not exposed to the drug. All isolates carried the mutation G2576T; the mutated position was heterogeneous in 12 isolates and homogeneous in 10.

Conclusions: The multidonal composition of LR enterococci indicates that linezolid resistance possibly occurred on several independent occasions. Its acquisition was often not related to linezolid administration; patients might have acquired their LR isolate from another patient that had received linezolid or, alternatively, resistance may have arisen by mutation that occurred independently.

Keywords: 23S rRNA mutations, heterogeneous mutations, linezolid exposure, enterococci, PFGE

Introduction

Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* (VRE) commonly necessitate the use of linezolid for their treatment.¹ Although initial studies suggested that resistance to linezolid would be slow to develop,² linezolid-resistant (LR) enterococci emerged soon after its clinical introduction.^{3,4} The linezolid resistance mechanism among clinical enterococci has up to now been mainly attributed to the G2576T mutation in the 23S rRNA gene.^{5,6}

Despite the widespread hospital use of linezolid, LR enterococcal isolates still seem to be very rare, remaining essentially undetectable in large-scale epidemiological surveys,⁶ including in large VRE collections from Europe.⁷ Similarly, linezolid resistance

remains rare among *E. faecalis* and *E. faecium* clinical isolates in Greek hospitals.⁸ In the literature, the emergence of LR enterococci has been mostly documented from individual cases or small series.^{3,4,9} Only a few studies have reported outbreaks of clinical infections due to LR enterococci and these either described clonal spread of the isolates^{10,11} or did not analyse their clonal relationship.¹²

In our hospital, an LR *E. faecium* clinical isolate was first recovered from blood cultures of a patient hospitalized in the intensive care unit (ICU) during 2004.¹³ Preliminary susceptibility data in our hospital indicate that LR enterococci have been increasingly isolated in our ICU since late 2006, when we started monitoring linezolid resistance. We report herein the multidonal spread of LR *E. faecium* and *E. faecalis* in our ICU during 2007–08.

© The Author 2012. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

1819

Materials and methods

Hospital setting and bacterial collection

The study included LR *E. faecalis* and *E. faecium* isolates (linezolid MICs ≥ 8 mg/L)¹⁴ recovered from clinical infection samples of patients hospitalized from January 2007 to October 2008 in the ICU of the University Hospital of Larissa, Greece, which has 600 beds and an ICU with a 12 bed general ward and an 8 bed cardiothoracic surgical ward. LR enterococci were also recovered from rectal samples collected during the routine surveillance of ICU patients for VRE. The isolates were stored at -80°C before testing.

Phenotypic testing

Identification of isolates to the species level was confirmed using conventional biochemical tests¹⁴ and API 20 Strep (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Susceptibility testing was performed by disc diffusion,¹⁴ and MICs of linezolid, teicoplanin, quinupristin/dalfopristin and vancomycin by Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden). Linezolid MICs were additionally determined by agar dilution,¹⁵ with 2 mg/L increments for concentrations 2–32 mg/L and using a final inoculum of 10^6 cfu/spot. *E. faecalis* ATCC 29212 was used as the control in phenotypic assays.

PCR assays and DNA sequencing

Mutations conferring linezolid resistance were sought by PCR, using four overlapping primers designed for this study to amplify the entire 23S rRNA gene: (I) 1-Fw, 5'-TAAGGGCGACGGTGGATG-3' and 1-Rev, 5'-GGGTAGATCAGTGGTTCCGG-3' (nt position 12–731); (II) 2-Fw, 5'-GTGCTTTTGTAAGTGAACCG-3' and 2-Rev, 5'-ATTCCTTAGCCTACTGCTC-3' (597–1488); (III) 3-Fw, 5'-AGAATCTGTCCACGATG-3' and 3-Rev, 5'-CGGCTCCTACCTACTG-3' (1319–2143); and (IV) 4-Fw, 5'-GTAACGATTTGGGCACTGTC-3' and 4-Rev, 5'-CGATTAGTATGCTCGCTC-3' (1988–2896). The primers were designed using Oligo Explorer 1.2 (Gene Link, Houthorne, NY, USA) and had 100% identity with the 23S rDNA of *E. faecalis* V583 and *E. faecium* LMG 11423 (accession numbers NC_004668 and AJ295305, respectively). Both strands of the amplicons were sequenced.

Macrorestriction analysis

PFGE of the LR *E. faecium* and *E. faecalis* isolates was performed with CHEF-DR III (Bio-Rad, Hemet, Hampstead, UK), with a running time of 18 h and pulse times of 5–35 s. PFGE patterns were compared visually and by using Fingerprinting II Software version 3.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA).

Review of patients' data

Medical records of patients that harboured LR enterococci were examined to ascertain factors that may have influenced resistance development and the spread of isolates. The hospital location of patients, anonymized demographic data, clinical characteristics and prior exposure to linezolid for ≥ 3 days were abstracted.

Results

LR enterococcal isolates and patients' characteristics

During the study period, 17 LR *E. faecium* and 5 LR *E. faecalis* isolates were recovered from 16 separate patients hospitalized in the ICU wards. The characteristics of the patients and their isolates are presented in Table 1. Isolates were recovered from clinical infection samples of nine patients and rectal samples of

seven patients, while two patients (Patients 9 and 11; Table 1) yielded LR *E. faecium* isolates from both clinical and rectal samples. Clinical specimens included blood (seven isolates), pus (three isolates), and one isolate each from vascular catheter and trauma. A single LR isolate was recovered from 11 patients, two LR isolates from 4 patients and three LR isolates from 1 patient. One patient yielded LR *E. faecium* from a rectal sample and soon thereafter LR *E. faecalis* from blood cultures (Patient 6; Table 1).

Nine of the 16 study patients (56.3%) had evidence of clinical infection due to LR enterococci. The crude mortality rate was 18.8%. The patients had acquired the LR enterococci during hospitalization, since all were hospitalized for ≥ 10 days prior to the recovery of the organism; most of them had significant comorbidities (Table 1). One patient, who yielded the LR isolate belonging to PFGE type VI, was hospitalized in a neighbouring hospital before being transferred to our ICU, 12 days prior to the LR isolation. Most patients received multiple antimicrobials prior to the recovery of LR isolates. Only nine patients had received linezolid for ≥ 3 days prior to the isolation of an LR enterococcal isolate.

Antimicrobial susceptibility profiles

Agar dilution MICs of linezolid were 8–16 mg/L. The MICs of vancomycin are shown in Table 1. The 22 LR isolates exhibited cross-resistance to drugs from several other antimicrobial classes, including β -lactams, fluoroquinolones, carbapenems and aminoglycosides.

PFGE typing

PFGE analysis of the 17 *E. faecium* isolates showed seven unrelated genotypes (types I–VII), while three unrelated genotypes (types VIII–X) were identified among the 5 *E. faecalis* isolates (Table 1 and Figure 1). PFGE types I and VIII contained two subtypes each. PFGE type I was the most common, being detected in seven *E. faecium* from four separate patients (Table 1). LR *E. faecium* isolates of PFGE subtype Ia were recovered from two patients: with prolonged linezolid administration prior to the LR isolation and from one patient not exposed to linezolid, while subtype Ib was recovered from a patient not given linezolid. *E. faecalis* of subtype VIIIa was recovered from a patient that had received linezolid for 15 days, in contrast to subtype VIIIb, which was recovered from two patients not exposed to linezolid. The LR *E. faecium* isolates that were isolated from both clinical and surveillance samples from the same patient were indistinguishable.

Sequence analysis

Sequencing of the overlapping PCR products showed G2576T as the sole mutation across the entire 23S rRNA gene in all isolates. A careful examination of the sequencing traces revealed both mutated and non-mutated 23S rRNA gene copies in 12 isolates, with the mutated T being the predominant base called by the sequencer (Figure S1, available as Supplementary data at JAC Online). In 10 isolates the mutated trace was homogeneous.

Table 1. Characteristics of the LR enterococcal isolates

Patient	Isolate	Month/year of isolation	Comorbidities	Sample	VAN MIC (mg/L)	LZD MIC (mg/L)	LZD exposure (days)	PFGE type
<i>E. faecium</i>								
1	1	01/07	renal failure	blood	>256	16	yes (25)	Ia
2	2A	01/07	septic shock	blood	>256	12	yes (16)	Ia
	2B	02/07		pus	>256	8		Ia
3	3	02/07	COPD/respiratory infection	rectal	>256	12	no	Ia
4	4A	02/07		blood	1.5	12	no	Ib
	4B	03/07		blood	1	12		Ib
	4C	03/07		pus	1	8		Ib
5	5	05/07	hepatitis B/pyelonephritis	blood	>256	16	no	II
6	6A	12/07	cerebral surgery	rectal	>256	16	yes (15)	III
7	7	01/08	trauma	vascular catheter	1	16	no	IV
8	8	02/08		rectal	8	8	yes (22)	V
9	9A	05/08	trauma	rectal	>256	8	yes (3)	II
	9B	06/08		trauma	>256	8		II
10	10	05/08	brain tumour	rectal	1.5	8	yes (4)	II
11	11A	08/08	trauma	blood	1	8	no	VI
	11B	09/08		rectal	1	8		VI
12	12	09/08	trauma	rectal	>256	8	yes (7)	VII
<i>E. faecalis</i>								
6	6B	12/07	cerebral aneurysm	blood	1	12	yes (15)	VIIIa
13	13	04/07	subarachnoid haemorrhage	pus	>256	8	yes (13)	IX
14	14	05/08	cardiac failure	rectal	>256	12	no	VIIIb
15	15	06/08		rectal	1.5	8	no	VIIIb
16	16	10/08	trauma	rectal	>256	12	yes (4)	X

VAN, vancomycin; LZD, linezolid; COPD, chronic obstructive pulmonary disease.

Multiclonal dissemination of linezolid-resistant enterococci

JAC

Ntoku et al.

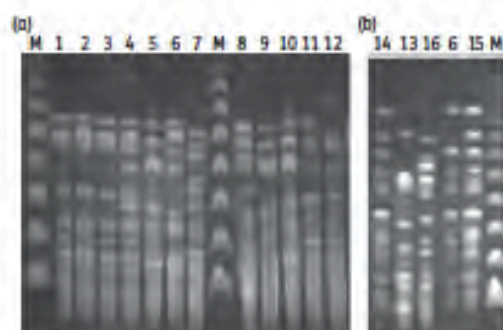


Figure 1. (a) PFGE patterns of *E. faecium* study isolates. (b) PFGE patterns of *E. faecalis* study isolates. Lanes 1–16 correspond to each of the 16 study patients shown in Table 1; lanes M, 48.5 kb molecular mass markers.

Discussion

LR enterococci remain uncommon.^{4,7} The present study describes the spread of several clones of LR *E. faecalis* and LR *E. faecium* during a 2 year period in our ICU. In the literature, studies reporting the dissemination of LR enterococci are limited and document clonally related isolates,^{10,11} in contrast with our study which detected multiple clones. In particular, one report described a clonal outbreak of LR *E. faecium* in a US medical centre that affected 40 hospitalized patients; it is of note that only 15% of the patients received linezolid before yielding LR isolates.¹⁰ Also, a clonal outbreak involved 12 indistinguishable LR *E. faecalis* isolates in the ICU and reanimation unit of a Spanish hospital.¹¹ In Greece, where multidrug resistance is increasing,¹⁶ linezolid resistance remains rare and there is only one study reporting five LR enterococci colonizing patients in a single ward, with four of the isolates being clonally related.¹⁷ The present survey reports 22 LR enterococci that disseminated in the ICU of our hospital. The multidonal composition of the LR isolates indicates that linezolid resistance emerged on several independent occasions and patient-to-patient transmission was not the main route of dissemination.

The majority of our patients had multiple risk factors for colonization and/or infection with multidrug-resistant bacteria, and prior exposure to antibiotics. Several of them had not received linezolid; they possibly acquired the LR isolate from another patient or, alternatively, the mutation may have occurred independently. It should be noted that the increased isolation of LR enterococci in the ICU led to the reinforcement of infection control measures and more rational use of linezolid, after which the recovery of such isolates became very uncommon.

Linezolid resistance is usually selected *in vivo* by prolonged drug treatment or inappropriate linezolid dosage.¹⁸ Most of the reported clinical resistant mutants carry the G2576T mutation.^{2,5} As most bacteria contain four to six 23S rRNA gene copies, multiple copies must be mutated to confer resistance,⁸ which possibly accounts for the rarity of resistance.^{4,7} In our study, all isolates bore only the G2576T mutation, despite having sequenced the entire 23S rRNA gene. In 10 isolates the mutated sequencing trace at nt position 2576 was

homogeneous, indicating that all 23S rRNA gene copies were mutated, while in the remaining 12 heterogeneous isolates, the trace corresponding to the mutated T was predominant relative to the non-mutated trace.

The emergence of linezolid resistance amongst enterococci, be it as a result of patient-to-patient transmission or selective pressure, is of concern. Tracking or restricting linezolid use according to therapeutic indications might reduce the emergence of LR enterococci. Also, risk factors, such as prior antibiotic administration or underlying diseases, should be taken into consideration and susceptibility testing of clinically significant Gram-positive pathogens should be performed before commencing treatment with linezolid, to help prevent treatment failure.

Funding

This work was supported by a European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) research grant (S. P.).

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

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

References

- Warner G, Coque TM, Hammerum AM et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill* 2008; 13: pii=19046.
- Prystowsky J, Siddiqui F, Chosay J et al. Resistance to linezolid: characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2154–6.
- Gerasides RD, Schwablenberger PC, Graham MB et al. Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet* 2001; 357: 1179.
- Haimero TA, Issa NC, Patel R. Nosocomial spread of linezolid-resistant vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *N Eng J Med* 2002; 346: 867–9.
- Saadat J, Zick G, Kiere I et al. Rapid emergence of resistance to linezolid during linezolid therapy of an *Enterococcus faecium* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 4217–9.
- Biedendieck DJ, Rorall DJ, Mendes RE et al. Stability of linezolid activity in an era of mobile oxazolidinone resistance determinants: results from the 2009 Zyvox Annual Approval of Potency and Spectrum program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 68: 499–57.
- Baurdon N, Fines-Guyon M, Thidiat JM et al. Changing trends in vancomycin-resistant enterococci in French hospitals, 2001–08. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 713–21.
- Pratibonikou E, Dimitroulia E, Pournaras S et al. Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Greece between 2002 and 2007. *J Hosp Infect* 2010; 75: 225–7.
- Johnson AP, Tysell L, Shackdale MV et al. Emerging linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from two

Multiclonal dissemination of linezolid-resistant enterococci

JAC

- Australian patients in the same intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; **21**: 751–4.
- 10 Dobbs TE, Patel M, Walters KB et al. Nosocomial spread of *Enterococcus faecium* resistant to vancomycin and linezolid in a tertiary care medical center. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 3368–70.
- 11 Gómez-Gil R, Romero-Gómez MP, García-Artes A et al. Nosocomial outbreak of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* infection in a tertiary care hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; **65**: 175–9.
- 12 Kainer MA, Devosio RA, Jones TF et al. Response to emerging infection leading to outbreak of linezolid-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis* 2007; **13**: 1024–30.
- 13 Basos Z, Maniati M, Kontos F et al. First report of a linezolid-resistant vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain in Greece. *J Antimicrob Chemother* 2006; **53**: 685–6.
- 14 Racklem RR, Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infection by a conventional test scheme. *J Clin Microbiol* 1989; **27**: 731–4.
- 15 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twentieth Informational Supplement M100-S20. CLSI, Wayne, PA, USA, 2010.
- 16 Mykdis S, Pefanis A, Tsakris A. The challenges of antimicrobial drug resistance in Greece. *Clin Infect Dis* 2011; **53**: 177–84.
- 17 Souli M, Sakka V, Galani I et al. Colonisation with vancomycin- and linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in a university hospital: molecular epidemiology and risk factor analysis. *Int J Antimicrob Agents* 2009; **33**: 137–42.
- 18 Livornaru DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis* 2003; **36** Suppl 1: 11–23.