



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ
ΤΩΝ *S.AUREUS* & *ENTEROCOCCUS* SPP
ΜΕ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ
ΚΑΙ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Γ. ΠΑΠΑΜΙΧΑΗΛ
Ιατρός Βιοπαθολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ
ΤΩΝ *S.AUREUS* & *ENTEROCOCCUS* SPP
ΜΕ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ
ΚΑΙ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Γ. ΠΑΠΑΜΙΧΑΗΛ
Ιατρός Βιοπαθολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000321904

ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ



ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ



**«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα»
N.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού τμήματος)**



Ημερομηνία αίτησης του κ. Παπαμιχαήλ Δημητρίου: 3-2-1993

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 254^ο/5-4-1994

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Αντωνιάδης Γρηγόριος Καθηγητής Μικροβιολογίας

Μέλη

Στεφάνου Δημήτριος Επίκουρος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας

Λεβειδιώτου Σταματίνα Λέκτορας Μικροβιολογίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 11-5-2000

«Διερεύνηση της ανθεκτικότητας του Staphylococcus aureus και Enterococcus spp. στα αντιβιοτικά με προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (M.I.C.) και με μοριακές τεχνικές»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 655^ο/10-3-2009

1. Ανδρονίκου Στυλιανή Καθηγήτρια Νεογνολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Μαυρίδης Ανέστης Καθηγητής Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Νάκος Γεώργιος Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Στεφάνου Δημήτριος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Λεβειδιώτου - Στεφάνου Σταματίνα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Παπαδοπούλου Χρυσάνθη Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Βρυώνη Γεωργία Λέκτορας Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 7-7-2009

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Γουδέβενος Ιωάννης

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας



ΗΡΩΣ

Στους Δασκάλους μου

Λένω Γκεσούλη

Τιτίνα Λεβειδιώτου

Παναγιώτη Ρεπούση



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στο κατώφλι του 21^{ου} αιώνα βρισκόμαστε αντιμέτωποι με μια ραγδαία αύξηση των πολυανθεκτικών βακτηρίων.

Λίγες μόνο δεκαετίες μετά την εμφάνιση της πενικιλίνης, οι υψηλές προσδοκίες μας από αυτά τα «θαυματουργά φάρμακα» (wonder drugs) φαίνεται πως δεν εκπληρώνονται, καθώς η αντοχή απεδείχθη ένα εξαιρετικά αποτελεσματικό κομμάτι της στρατηγικής επιβίωσης των βακτηρίων.

Ποιό είναι το status quo της αντοχής σήμερα; «τα λοιμώδη νοσήματα είναι σήμερα οι μεγαλύτεροι φονείς παιδιών και νεαρών ενηλίκων στον κόσμο» (Report on Infectious Diseases: removing obstacles to healthy development, WHO 1999). Η αναφορά αυτή της WHO είναι η τραγική διάψευση μιας δήλωσης που έγινε 20 χρόνια νωρίτερα από τον εκπρόσωπο του Γραφείου του Surgeon General: «ήρθε η ώρα να κλείσουμε το βιβλίο των λοιμωδών νοσημάτων» (Lohner K. & Staudegger E., 2001).

Γιατί οδηγηθήκαμε σ' αυτήν την διάψευση;

Γράφει ο N. Wade στους New York Times: « Η pax antibiotica ήταν βραχύβια.

Η κυριαρχία των αντιβιοτικών, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περιορισμούς και χωρίς προνοητικότητα, διήρκεσε μια στιγμή του εξελικτικού χρόνου, τίποτα άλλο από 50 χρόνια δικά μας...».

Και συνεχίζει : «γιατί έδωσε τόσο γρήγορα η χρυσή εποχή των αντιβιοτικών; Μία λανθασμένη εκτίμησή μας ήταν να υποθέσουμε ότι θα υπήρχε πάντα διαθέσιμη μια σταθερή ροή νέων φαρμάκων. Μία άλλη ήταν να υποθέσουμε ότι η αντοχή θα εξελισσόταν το ίδιο αργά όπως και οι άλλες εξελικτικές αλλαγές...» (Nicholas Wade: 'Method and madness; pax antibiotica', 15 Οκτωβρίου 1995).

Η βακτηριακή αντοχή δεν είναι ένα καινούργιο πρόβλημα. Παρατηρήθηκε σχεδόν ταυτόχρονα με την εμπορική διάθεση των πρώτων αντιβιοτικών, απλώς κατέστη οξύτερο τις τελευταίες δεκαετίες.

Όλα τα βακτήρια διαθέτουν την «εγγενή» ικανότητα να αναπτύσσουν, αργά ή γρήγορα, γονίδια τα οποία τα καθιστούν ανθεκτικά σε όλα τα αντιμικροβιακά φάρμακα.

Για την έξαρση της βακτηριακής αντοχής ευθύνονται πολλοί παράγοντες. Συνοπτικά αναφέρουμε τους ακόλουθους :

α. Κοινωνικοί

Ο παράγων με την κύρια συμβολή προς την κατεύθυνση αυτή είναι η αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών όχι μόνο στους ανθρώπους αλλά και στην ζωϊκή και φυτική παραγωγή. Εκτιμάται από το CDC ότι το 50% περίπου των συνταγογραφούμενων αντιβιοτικών δεν είναι απαραίτητα. Η συνταγογράφηση των αντιβιοτικών είναι συνήθως εμπειρική, χωρίς την χρονοβόρα εργαστηριακή επιβεβαίωση της λοίμωξης. Άλλοι παράγοντες αυτής της κατηγορίας είναι η εύκολη πρόσβαση σε χαμηλής ποιότητας αντιβιοτικά και η ασταθής τροφοδοσία που παρατηρείται σε πολλές χώρες, συχνά σε συνδυασμό με την πτωχή συμμόρφωση των ασθενών, καθώς οι τελευταίοι δεν ολοκληρώνουν την θεραπεία τους.

β. Δημογραφικοί

Εδώ διακρίνουμε παράγοντες όπως η αύξηση του πληθυσμού του πλανήτη, η γήρανση του πληθυσμού στις ανεπτυγμένες χώρες, η αστικοποίηση, οι μαζικές μετακινήσεις πληθυσμού και οι μεταφορές ζώων και ζωϊκών προϊόντων.

γ. Περιβαλλοντικοί

Παράγοντες όπως η αποψίλωση των δασών αλλά και οι κλιματικές αλλαγές γενικά, έφεραν τον άνθρωπο σε στενότερη επαφή με νέα οικοσυστήματα στα οποία περιλαμβάνονται ζώα και έντομα-φορείς αγνώστων εν πολλοίς μολυσματικών παραγόντων.

Οι εκρηκτικές διαστάσεις του προβλήματος της βακτηριακής αντοχής απεικονίζονται σε πλείστες αναφορές σύμφωνα με τις οποίες τα πολυανθεκτικά βακτήρια ευθύνονται για το 70% των νοσοκομειακών λοιμώξεων στις ΗΠΑ.

Από το 1995 τα πολυανθεκτικά στελέχη *Enterococcus* spp έχουν εισβάλει σε όλα τα νοσοκομεία της Νέας Υόρκης. Η μεγαλύτερη ανησυχία μας προέρχεται από το γεγονός ότι τα στελέχη αυτά είναι ανθεκτικά στην βανκομυκίνη, φάρμακο τελευταίας εφεδρείας, και ότι το υπεύθυνο γονίδιο αντοχής θα περάσει σε ακόμα πιο επικίνδυνα παθογόνα όπως ο *S.pneumoniae*, το κύριο βακτηριακό αίτιο θανάτου στις ΗΠΑ, και ο *S.aureus*, το συνηθέστερο αίτιο χειρουργικών λοιμώξεων.



Η αντοχή του *Staphylococcus aureus* και του γένους *Enterococcus* spp θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως η «επιτομή» της αντοχής των Gram θετικών βακτηρίων.

Η μελέτη των αντοχών αυτών αποτελεί το θέμα της παρούσης διατριβής.

Η διατριβή αυτή δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς την πολύτιμη καθοδήγηση της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κας Σταματίνας Λεβειδιάτου. Για την ανάθεση και επίβλεψη αυτής της εργασίας, αλλά και για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράστασή της όλα αυτά τα χρόνια, της είμαι ευγνώμων.

Επιθυμώ να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στα μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής, στον αείμνηστο ομότιμο Καθηγητή Μικροβιολογίας Γ. Αντωνιάδη και στον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομίας κ. Δημήτριο Στεφάνου για το ενδιαφέρον τους και τις χρήσιμες υποδείξεις τους.

Εκφράζω επίσης τις ευχαριστίες μου στα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής, Καθηγητή κ. Ανέστη Μαυρίδη, Καθηγήτρια κ. Στυλιανή Ανδρονίκου, Καθηγητή κ. Γεώργιο Νάκο, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Χρυσάνθη Παπαδοπούλου και Επίκουρο Καθηγητή κ. Γεωργία Βρυώνη.

Θέλω να εκφράσω ξεχωριστά τις θερμές μου ευχαριστίες προς την Λέκτορα κ. Κωνσταντίνα Γκαρτζονίκα για την επιστημονική υποστήριξη και την συνεισφορά της σε θέματα τεχνογνωσίας.

Ευχαριστώ τις εκλεκτές συναδέλφους Αναπληρώτριες Διευθύντριες κ. Ελένη Γκεσούλη και κ. Χριστιάνα Παππά καθώς και την κ. Ευαγγελία Παπαπέτρου και τον κ. Νικόλαο Ζώτο για την βοήθειά τους στην συλλογή, αποθήκευση και επεξεργασία των δειγμάτων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. *Staphylococcus aureus*

A.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

A.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

A.3. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

A.3.1. Μορφολογία

A.3.1.1. Κυτταρικό τοίχωμα

A.3.2. Φυσιολογία-Μεταβολισμός

A.3.3. Οικολογία

A.3.4. Λοιμογόννοι παράγοντες

A.4. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

A.4.1. Εντοπισμένες λοιμώξεις δέρματος και εξαρτημάτων του

A.4.2. Εντοπισμένες λοιμώξεις με διάχυτο εξάνθημα

A.4.2.1. Τοξική επιδερμική νεκρόλυση

A.4.2.2. Σύνδρομο τοξικού shock

A.4.3. Μικροβαιμία και Ενδοκαρδίτις

A.4.4. Πνευμονία

A.4.5. Λοιμώξεις οστών και αρθρώσεων

A.4.6. Τροφική δηλητηρίαση

A.5. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

A.6. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

A.6.1. Μηχανισμοί ανταλλαγής γενετικού υλικού

A.6.2. Αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά

A.6.2.1. Αντοχή μεσολαβούμενη από β-λακταμάσες

A.6.2.1.1. Γενετική της σύνθεσης β-λακταμάσης

A.6.2.1.2. Μοντέλο για την επαγωγή

A.6.2.2. Αντοχή μη μεσολαβούμενη από β-λακταμάσες

A.6.3. Αντοχή στις κινολόνες

A.6.4. Αντοχή στις μακρολίδες, λινκοσαμίδες και στρεπτογραμίνες



- A.6.5. Αντοχή στα γλυκοπεπτίδια**
- A.6.6. Αντοχή στις αμινογλυκοσίδες**
- A.7. ΜΟΡΙΑΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ MRSA**
- A.8. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ MRSA**
- A.9 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ *S.aureus***

B. *Enterococcus spp*

- B.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ**
- B.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ**
- B.3. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ**
 - B.3.1. Μορφολογία**
 - B.3.2. Φυσιολογία-Μεταβολισμός**
 - B.3.3. Οικολογία**
 - B.3.4. Λοιμογόνοι παράγοντες**
- B.4. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ**
- B.5. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ**
- B.6. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ**
 - B.6.1. Μηχανισμοί ανταλλαγής γενετικού υλικού**
 - B.6.2. Εγγενής αντοχή**
 - B.6.3. Επίκτητη αντοχή**
 - B.6.4. Αντοχή στις κινολόνες**
 - B.6.5. Αντοχή στα γλυκοπεπτίδια**
- B.7. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ GRE**
- B.8. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ *Enterococcus spp***



II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ

2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικό

2.2. Μέθοδοι

A. *S.AUREUS*

2.2.A.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ MIC

2.2.A.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ

2.2.A.3. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

α. Multiplex PCR

β. Genotype MRSA Kit

2.2.A.4. Στατιστική Ανάλυση

B. *ENTEROCOCCUS SPP*

2.2.B.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ MIC

2.2.B.2. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

α. Multiplex PCR

β. Genotype ENTEROCOCCUS Kit

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. *S.AUREUS*

3.A.1. Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας στην μεθικιλίνη

3.A.2. Αποτελέσματα μοριακών μεθόδων

3.A.3. Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας σε άλλα αντιβιοτικά

B. *ENTEROCOCCUS SPP*

3.B.1. Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

3.B.2. Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας στα γλυκοπεπτίδια

3.B.3. Αποτελέσματα μοριακών μεθόδων

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

SUMMARY

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



A. *Staphylococcus aureus*

A.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Ο Cohn περιέγραψε 4 φυλές (tribes) βακτηρίων και τοποθέτησε τα σφαιρικά εξ αυτών-συμπεριλαμβανομένων αυτών που σήμερα αναγνωρίζονται ως σταφυλόκοκκοι, στρεπτόκοκκοι και μικρόκοκκοι-στο γένος *Micrococcus* της φυλής *Sphaerobacteriae* (Kugelbakterien) (Schleifer K.H., 1986).

Ο Koch σημείωσε την παρουσία μικρών σφαιρικών βακτηρίων στο πύον, στα αποστήματα και στο αίμα ασθενών με πνιμία και χαρακτήρισε τα βακτήρια αυτά ως «μικροκόκκους».

Ο Ogston (1880) εισήγαγε το όνομα *Staphylococcus* για τους μικροκόκκους εκείνους που προκαλούν φλεγμονή και διαπύηση (Peacock S.J., 2005).

Ο Pasteur παρατήρησε την παρουσία μικρών σφαιρικών βακτηρίων στο πύον δοθιήνων και εστιών οστεομυελίτιδος και θεώρησε ότι τα βακτήρια αυτά ίσως ήταν παθογόνα. Βασιζόμενοι στις περιγραφές των μικροοργανισμών αυτών μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο Pasteur περιέγραφε τους σταφυλοκόκκους του Ogston (Schleifer K.H., 1986).

Ο Rosenbach (1884) έκανε την πρώτη επίσημη ταξινομητική περιγραφή του γένους *Staphylococcus* και χώρισε το γένος σε 2 είδη: *S.aureus* και *S.albus* (Moreillon P. et al., 2005).

Ο Passet (1885) προσέθεσε ένα τρίτο είδος, τον *S.citreus*. Η μορφολογία των κυττάρων και ο τρόπος της συσσώρευσής τους απετέλεσαν τα κριτήρια για την ταξινόμησή τους στο γένος, ενώ το χρώμα των αποικιών ήταν το κριτήριο για την ταξινόμησή τους σε είδος.

Ο Zopf (1885) τοποθέτησε εκ νέου τους σταφυλοκόκκους, καθώς και ένα group σαπροφυτικών τετραδικών μικροκόκκων στο γένος *Micrococcus*, ενώ, το επόμενο έτος, ο Flüge διαχώρισε τα γένη *Staphylococcus* και *Micrococcus*. Ο διαχωρισμός των 2 γενών έγινε με βάση τη δράση τους στη ζελατίνη και την συμβιωτική σχέση με τους ξενιστές τους (Peacock S.J., 2005). Οι σταφυλόκοκκοι ρευστοποιούσαν την ζελατίνη και εθεωρούντο παρασιτικοί ή παθογόνοι, ενώ οι μικρόκοκκοι είχαν μεταβλητή δράση επί της ζελατίνης και εθεωρούντο σαπροφυτικοί.

Οι Evans, Bradford και Niven (1955) πρότειναν τον διαχωρισμό των σταφυλοκόκκων από τους μικροκόκκους με βάση τη σχέση τους με το οξυγόνο. Χρησιμοποίησαν μια δοκιμασία οξείδωσης (O) – ζύμωσης (F)(OF-test) για την ζύμωση της γλυκόζης και με βάση αυτήν την δοκιμασία οι μεν προαιρετικώς αναερόβιοι κόκκοι τοποθετήθηκαν στο γένος *Staphylococcus*, οι δε υποχρεωτικώς αερόβιοι στο γένος *Micrococcus*. Ο διαχωρισμός στα 2 αυτά γένη μόνο με βάση το OF-test συνεχίστηκε μέχρις ότου έγινε αντιληπτό, ότι μερικοί σταφυλόκοκκοι παράγουν πολύ μικρές ποσότητες οξέος από γλυκόζη ενώ αντίθετα κάποιοι μικρόκοκκοι παράγαν ικανές ποσότητες οξέος υπό αναερόβιες συνθήκες.

Ένας σαφής διαχωρισμός των σταφυλοκόκκων από τους μικροκόκκους μπόρεσε να γίνει με βάση την σύνθεση του DNA σε αζωτούχες βάσεις (Silvestri & Hill, 1965).

Έτσι εκτεταμένες μελέτες έδειξαν ότι οι σταφυλόκοκκοι έχουν G + C περιεκτικότητα (content) DNA 30-39 mol% (T_m , Bd) ενώ οι μικρόκοκκοι έχουν G + C περιεκτικότητα DNA 60-73 mol%. Παρά το γεγονός ότι αμφότερα τα γένη τοποθετήθηκαν εν τέλει στην οικογένεια Micrococcaceae (Prenoi, 1961), η πολύ ευρεία απόκλιση μεταξύ τους σε σύνθεση αζωτούχων βάσεων καταδεικνύει ότι δεν είναι «συγγενικά» γένη σε σημαντικό βαθμό. Σχετικά πρόσφατες συστηματικές μελέτες διέκριναν τους σταφυλοκόκκους από τους μικροκόκκους με βάση την σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (Schleifer & Kandler, 1972), τα κυτοχρώματα (Faller, Götz & Schleifer, 1980), τις μενακινόνες (Collins & Jones, 1981), τα λιπαρά οξέα του βακτηρίου, τα πολικά λιπίδια (Nahaie et al., 1984), τον DNA / rRNA υβριδισμό (Kilpper, 1980; Buhl & Schleifer, 1980; Schleifer, 1986) και την συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών της υπομονάδας 16 S του r-RNA (Ludwig et al., 1981).

Οι πρώτοι βακτηριολόγοι έδωσαν μεγάλη έμφαση στην διάκριση του παθογόνου είδους *S.aureus* από τους θεωρούμενους ως «σαπροφυτικούς» σταφυλοκόκκους που χαρακτηρίστηκαν ως *S.albus*, *S.epidermidis albus* (Welch, 1891) και *S.epidermidis* (Evans, 1916). Η διάκριση αυτή ήταν σημαντική, διότι ο *S.aureus* αποτελούσε σημαντικό αίτιο νοσηρότητας και θνητότητας.

Ο von Daranyi (1925) ήταν ο πρώτος που έδωσε την πρέπουσα σημασία στην πρακτική αξία της δοκιμασίας κοαγκουλάσης για την ταυτοποίηση του *S.aureus*. Η δοκιμασία αυτή παραμένει ακόμα και σήμερα μια από τις σημαντικότερες για την ταυτοποίηση του είδους στο Κλινικό Εργαστήριο.



Ο Baird-Parker (1963,1965) αποπειράθηκε να κάνει την πρώτη υποδιαίρεση των γενών *Staphylococcus* και *Micrococcus*, με την χρήση πολλών κλασσικών μορφολογικών, φυσιολογικών και βιοχημικών δοκιμασιών. Αρχικά χώρισε τους σταφυλοκόκκους σε 6 υποομάδες (I-VI) και τους μικροκόκκους σε 8 υποομάδες (1-8). Σε μεταγενέστερα ταξινομητικά σχήματα (1965, 1974) αναγνώρισε τα είδη *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.saprophyticus* και χώρισε τα 2 τελευταία σε αρκετούς βιότυπους. Τα σχήματά του χρησιμοποιήθηκαν ευρέως για πάνω από μια δεκαετία, ειδικά από Ιατρικά εργαστήρια και εργαστήρια μικροβιολογίας τροφίμων.

Τέλος, οι Meyer (1967), Hájek και Maršálek (1971) χώρισαν το είδος *S.aureus* σε αρκετούς βιότυπους με βάση φυσιολογικές και βιοχημικές ιδιότητες καθώς και με φαγοτυπία (Peacock S.J., 2005).

A.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Γένος : *Staphylococcus* (Rosenbach 1884)

Οικογένεια : Micrococcaceae (Prevot 1961)

Τριάντα δύο (32) είδη αναγνωρίζονται σήμερα εντός του γένους, ενώ κάποια άλλα είναι υπό διερεύνηση. Τα μέλη του γένους ταξινομούνται πρωτίστως με βάση τον DNA /DNA υβριδισμό, που μπορεί να πραγματοποιηθεί σε συνθήκες περιορισμού (restrictive), σε συνθήκες μη περιορισμού(optimal) ή και με τις 2 μεθόδους (Schleifer K.H., 1986). Τα μέλη του ιδίου είδους επιδεικνύουν ποσοστά σύνδεσης (DNA binding values) > 70% όταν οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε συνθήκες μη περιορισμού, ενώ τα βακτήρια που αντιπροσωπεύουν διαφορετικά είδη επιδεικνύουν ποσοστά σύνδεσης < 70% σε άριστες συνθήκες και ακόμα χαμηλότερα σε συνθήκες περιορισμού.

Σήμερα γνωρίζουμε ότι το γένος *Staphylococcus* ανήκει στην ομάδα *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*, μια ευρεία ομάδα (cluster) Gram θετικών βακτηρίων με χαμηλή περιεκτικότητα σε G + C. Οι πλησιέστεροι συγγενείς των σταφυλοκόκκων είναι οι μακρόκοκκοι/ Macrococci (Kloos et al., 1997) ενώ, με βάση πάντοτε το sequencing



της υπομονάδας 16 S του r-RNA, συγγενεύουν και με τους *Salinicocci*, *Enterococci*, *Planococci*, *Bacilli* και *Listeriae* (Ludwig et al., 1985; Stackebrandt et al., 1987).

Το γένος *Staphylococcus* μπορεί να υποδιαιρεθεί σε τουλάχιστον 4 ομάδες ειδών με βάση τον DNA /DNA υβριδισμό και τους φαινοτυπικούς χαρακτήρες (Peacock S.J., 2005).

Το group του *S.epidermidis* περιλαμβάνει τα είδη *S.epidermidis*, *S.capitis*, *S.warneri*, *S.haemolyticus*, *S.hominis* και *S.saccharolyticus*.

Το group του *S.saprophyticus* περιλαμβάνει τα είδη *S.saprophyticus*, *S.cohnii* και *S.xylosus*.

Το group του *S.simulans* περιλαμβάνει τα είδη *S.simulans* και *S.carnosus*.

Το group του *S.sciuri* περιλαμβάνει τα είδη *S.sciuri* και *S.lentus*.

Τα είδη *S.aureus*, *S.auricularis*, *S.intermedius*, *S.hyicus* και *S.caseolyticus* δεν μπορούν εύκολα να ενταχθούν σε κάποιο από τα παραπάνω groups ενώ είναι και ελάχιστα συγγενικά μεταξύ τους προκειμένου να σχηματίσουν ένα ξεχωριστό group.

Πρόσφατες έρευνες πάνω στην κυτταρική δομή, στην σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και στην G + C περιεκτικότητα του DNA, μελέτες με DNA-DNA υβριδισμό, συγκριτικές μελέτες των αλληλουχιών των υπομονάδων 16S του rRNA και των μεγεθών των γονιδιωμάτων των προσφάτως εισηγμένων ειδών *S.caseolyticus*, *S.bovicus*, *S.carouselicus* και *S.equipercicus* (Ballard et al., 1995) κατέδειξαν ότι αυτή η ομάδα των 4 ειδών θα έπρεπε να τοποθετηθεί σε ένα ξεχωριστό γένος στο οποίο δόθηκε το όνομα *Macrococcus* (Kloos et al., 1997). Η G + C περιεκτικότητα του DNA κυμαίνεται από 38-45 mol % ενώ το εκτιμώμενο μέγεθος του γονιδιώματος των μελών του γένους *Macrococcus* είναι 1500-1820 kbp, σημαντικά μικρότερο από αυτό των μελών του γένους *Staphylococcus spp* (2000-3000 kbp).

Σύμφωνα με το Bergey's Manual τα είδη του γένους και οι ερευνητές που τα περιέγραψαν για πρώτη φορά είναι :

- *S.epidermidis* (Winslow & Winslow, 1908; Evans, 1916; Schleifer & Kloos, 1975)
- *S.capitis* (Schleifer & Kloos, 1975)
- *S.caprae* (Devriese et al., 1983)
- *S.saccharolyticus* (Foubert & Douglas, 1948 ; Kilpper-Bälz & Schleifer, 1981)
- *S.hominis* (Schleifer & Kloos, 1975)
- *S.haemolyticus* (Schleifer & Kloos, 1975)



- *S.warneri* (Schleifer & Kloos, 1975)
- *S.pasteuri* (Chesnau et al., 1993)
- *S.lugdunensis* (Freney et al., 1988)
- *S.auricularis* (Schleifer & Kloos, 1983)
- *S.aureus* (Rosenbach, 1884)
- *S.saprophyticus* (Shaw; Stitt & Cowan, 1951; Schleifer & Kloos, 1975)
- *S.cohnii* (Schleifer & Kloos, 1975)
- *S.xylosus* (Schleifer & Kloos, 1975)
- *S.kloosii* (Schleifer; Kilpper-Bälz & Devriese, 1984)
- *S.equorum* (Schleifer; Kilpper-Bälz & Devriese, 1984)
- *S.arlettae* (Schleifer; Kilpper-Bälz & Devriese, 1984)
- *S.gallinarum* (Devriese et al., 1983)
- *S.simulans* (Schleifer & Kloos, 1975)
- *S.carnosus* (Schleifer & Fischer, 1982)
- *S.piscifermentans* (Tanasupawat et al., 1992)
- *S.felis* (Igimi et al., 1989)
- *S.intermedius* (Hájek, 1976)
- *S.schleiferi* (Freney et al., 1988)
- *S.delphini* (Varaldo et al., 1988)
- *S.hyicus* (Devriese et al., 1978)
- *S.chromogenes* (Devriese et al., 1978 ; Hájek et al., 1986)
- *S.muscae* (Hájek et al., 1992)
- *S.sciuri* (Schleifer; Kloos & Smith, 1976)
- *S.lentus* (Schleifer; Kloos & Smith, 1976; Schleifer et al., 1983)
- *S.vitulus* (Webster et al., 1994)
- *S.caseolyticus* (Schleifer et al., 1982)

A.3. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

A.3.1. Μορφολογία

Κύτταρα σφαιρικά, διαμέτρου 0.5-1.5 μ, διατασσόμενα κατά μόνους, σε ζεύγη ή τετράδες και χαρακτηριστικά διαιρούμενα σε περισσότερα του ενός επίπεδα σχηματίζοντας έτσι ακανόνιστα συσσωρεύματα

Gram θετικά. Ακίνητα. Μη σπορογόνα.

A.3.1.1. Κυτταρικό τοίχωμα

Ο πολυσακχαριδικός σκελετός της πεπτιδογλυκάνης είναι ένα γραμμικό πολυμερές εναλασσόμενων μορίων N-ακετυλογλυκοζαμίνης και N-ακετυλομουραμικού οξέος, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με β-1-4 δεσμούς.

Οι σταφυλόκοκκοι αποτελούν ένα από τα λίγα γένη βακτηρίων στα οποία τα μόρια του N-ακετυλομουραμικού οξέος (περίπου το 60% αυτών) είναι O-ακετυλιωμένα. Πιστεύεται ότι με την O-ακετυλίωση παρατείνεται η παραμονή της πεπτιδογλυκάνης εντός των ιστών (Projan S.J. & Novick R.P., 1997). Μερικές από τις C-6 υδροξυλομάδες του N-ακετυλομουραμικού οξέος είναι φωσφορυλιωμένες και αποτελούν σημεία σύνδεσης μεταξύ πεπτιδογλυκάνης και τειχοϊκού οξέος (Peacock S.J., 2005).

Μέσω των καρβοξυλομάδων των μορίων N-ακετυλομουραμικού οξέος προσκολλώνται στον πολυσακχαριδικό σκελετό πλευρικές ολιγοπεπτιδικές αλυσίδες. Τα ολιγοπεπτίδια αυτά είναι συνήθως τετραπεπτίδια και σπανίως πενταπεπτίδια.

Τα τετραπεπτίδια αποτελούνται από L-Ala, D-Glu, L-Lys και D-Ala.

Στα πενταπεπτίδια υπάρχει μια επιπλέον D-Ala.

Τα γραμμικά πολυμερή της πεπτιδογλυκάνης «χιάζονται» με γέφυρες πενταγλυκίνης μεταξύ της ε-αμινομάδας της L-λυσίνης και της D-αλανίνης στη θέση 4' μιας γειτονικής πεπτιδικής αλυσίδας. Ενίοτε αντί γλυκίνης ανευρίσκονται L-σερίνη ή L-αλανίνη. Ο βαθμός του χιασμού (cross linking) στους σταφυλοκόκκους είναι πολύ υψηλός και προσεγγίζει το 90%.



Όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια, ο σχηματισμός ενός πεπτιδικού δεσμού ανάμεσα στην γλυκίνη και στην D-αλανίνη είναι η τελευταία αντίδραση στην βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης και η τρανσπεπτιδάση που καταλύει την αντίδραση αυτή, αποτελεί κύριο στόχο των β-λακταμικών αντιβιοτικών.

A.3.2. Φυσιολογία-Μεταβολισμός

Είναι προαιρετικώς αναερόβια. Με εξαίρεση το αναερόβιο είδος *S.saccharolyticus* και το υποείδος *S.aureus* subsp *anaerobius* η ανάπτυξή τους είναι ταχύτερη και αφθονότερη κάτω από αερόβιες συνθήκες. Συνήθως είναι καταλάση θετικά. Τα περισσότερα στελέχη αναπτύσσονται παρουσία NaCl 10 % και μεταξύ 18 και 40^o C. Λύονται με λυσοσταφίνη ενώ είναι σχετικά ανθεκτικά στη λύση με λυσοζύμη.

Η γλυκόζη, παρά το γεγονός ότι αποτελεί τον αφθονότερο υδατάνθρακα που παρέχεται με την διατροφή και τον περισσότερο χρησιμοποιούμενο από τους ιστούς του ξενιστή, δεν είναι η κύρια εξωγενής πηγή άνθρακα για τους σταφυλοκόκκους που αναπτύσσονται στο πρωτογενές τους habitat. Στον ιδρώτα καθώς και στην ανθρώπινη επιδερμίδα η γλυκόζη ανευρίσκεται σε πολύ μικρές ποσότητες. Κάπως υψηλότερες στάθμες γλυκόζης ανευρίσκονται σε ορισμένους ιστούς (αίμα, ήπαρ, νεφρούς, μυς) και ίσως στους ιστούς αυτούς η γλυκόζη να είναι διαθέσιμη στους εισβάλλοντες σταφυλοκόκκους. Γενικά όμως η κυριότερη πηγή άνθρακα για τους σταφυλοκόκκους είναι το γαλακτικό οξύ και τα προϊόντα του. Οι ενώσεις αυτές προέρχονται κυρίως από την γλυκόλυση στους ιστούς του ξενιστή και από την διάσπαση του γλυκογόνου στους ιδρωτοποιούς αδένες. Η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στον ιδρώτα μπορεί να κυμαίνεται από 45 έως 350 mg/100ml. Οι σταφυλόκοκκοι μπορούν εύκολα να μετατρέψουν αυτά τα τελικά προϊόντα σε πυρουβικό οξύ, επιτρέποντάς τους έτσι να εισέλθουν στον κύκλο του Krebs (Peacock S.J., 2005).

Οι σταφυλόκοκκοι είναι σε θέση να χρησιμοποιούν μια ποικιλία υδατανθράκων ως πηγών άνθρακα και ενέργειας. Η πρόσληψη υδατανθράκων μπορεί να λάβει χώραν με δύο τρόπους :

α) ο υδατάνθρακας προσλαμβάνεται και συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου χωρίς να υποστεί κάποια τροποποίηση της δομής του.



β) ο υδατάνθρακας τροποποιείται ομοιοπολικά κατά την διάρκεια της πρόσληψης.

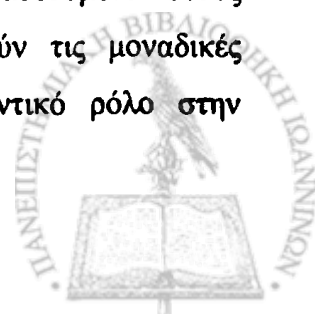
Η τροποποίηση του υδατάνθρακα συνίσταται στην φωσφορυλίωσή του στη διάρκεια της μεταφοράς. Η φωσφορυλίωση αυτή μεσολαβείται από την φωσφοτρανσφεράση του φωσφοενολοπυρουβικού (πολυενζυμικό σύστημα PTS / phosphoenolpyruvate – carbohydrate phosphotransferase). Η PTS του *S.aureus* αποτελείται από 4 ένζυμα, τα EI, Hpr, EII και EIII, τα οποία σχηματίζουν ένα συνδεδεμένο με την μεμβράνη πολυενζυμικό σύστημα. Η PTS προσλαμβάνει μεταξύ άλλων γλυκόζη, μαννόζη, φρουκτόζη, λακτόζη, γαλακτόζη, γλυκοζαμίνη, N-ακετυλογλυκοζαμίνη και μαννιτόλη. Αντιθέτως, κάποιες πεντόζες όπως η ριβόζη, η ξυλόζη και η αραβινόζη δεν προσλαμβάνονται μέσω του PTS. Η οδός Embden-Meyerhof-Parnas και η οδός των μονοφωσφορικών εξοζών είναι οι δύο κύριες οδοί που χρησιμοποιούν οι σταφυλόκοκκοι για τον μεταβολισμό της γλυκόζης.

Οι *S.aureus* και *S.epidermidis* μεταβολίζουν την γλυκόζη κυρίως μέσω γλυκόλυσης. Το κύριο τελικό προϊόν του αναερόβιου μεταβολισμού της γλυκόζης στον *S.aureus* και στον *S.epidermidis* είναι το γαλακτικό οξύ (73-94%) ενώ παράγονται και μικρές ποσότητες οξεικού (4-7%) καθώς και ίχνη πυρουβικού. Κάτω από αερόβιες συνθήκες μόνο το 5-10 % του άνθρακα της γλυκόζης σχηματίζει γαλακτικό οξύ. Αντίθετα, το μεγαλύτερο μέρος του εμφανίζεται ως οξεικό οξύ και ως CO₂.

Στα είδη *S.intermedius*, *S.capitis*, *S.haemolyticus* και *S.warneri*, καθώς επίσης και σε ορισμένα μέλη του *S.saprophyticus* group, η λακτόζη και η γαλακτόζη μεταβολίζονται μέσω της οδού Leloir, όπου η 1-φωσφορική γαλακτόζη επιμερίζεται σε 1-φωσφορική γλυκόζη.

Τα είδη *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.hominis*, *S.sciuri* *S.chromogenes* και *S.lentus* μεταβολίζουν την λακτόζη και την γαλακτόζη μέσω της οδού της 6-φωσφορικής ταγατόζης, όπου η 6-φωσφορική γαλακτόζη ισομερειώνεται σε 6-φωσφορική ταγατόζη, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε 1,6 διφωσφορική ταγατόζη.

Τα κυτοχρώματα και οι ακόρεστες μενακινόνες σχηματίζουν το σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων της μεμβράνης. Τα κυριότερα κυτοχρώματα των αναπνευστικών αλυσίδων των σταφυλοκόκκων είναι τα a602, b557 και o555 (b555). Τα ελάσσονα κυτοχρώματα b552, b560 και b566 είναι ευρέως διαδεδομένα στους σταφυλοκόκκους. Οι μενακινόνες (MK-6 έως MK-9), αποτελούν τις μοναδικές ισοπρενοειδείς κινόνες των σταφυλοκόκκων και παίζουν σημαντικό ρόλο στην



μεταφορά ηλεκτρονίων και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (Peacock S.J., 2005).

Ιδιαίτερης μνείας χρήζουν οι αναπνευστικώς ελαττωματικοί (respiratory deficient) σταφυλόκοκκοι, περισσότερο γνωστοί ως παραλλαγές μικρών αποικιών (small colony variants, SCVs). Τα στελέχη αυτά βρέθηκε ότι εμφανίζουν διαταραχές στην βιοσύνθεση της αιμίνης και της μενακινόνης. Οι διαταραχές αυτές οδηγούν σε ελαττωματική μεταφορά ηλεκτρονίων και επομένως ελαττωμένη παραγωγή ATP. Επειδή το μεγαλύτερο ποσοστό του παραγομένου ATP χρησιμοποιείται για την βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, η διακοπή της μεταφοράς ηλεκτρονίων οδηγεί σε βραδεία ανάπτυξη και μικρό μέγεθος αποικιών.

Οι μεταλλάκτες αυτοί παράγουν ελαττωμένες ποσότητες λυτικών τοξινών όπως πχ η α-τοξίνη, γεγονός που τους προσδίδει την ικανότητα να επιβιώνουν εντός των κυττάρων του ξενιστή (Foster T.J., 2002; Vincent A. et al., 2006).

Οι SCVs έχουν συνδεθεί με ασυνήθεις, εμμένουσες, υποτροπιάζουσες και ανθεκτικές στα αντιβιοτικά λοιμώξεις. Τα ελεύθερα νόσου διαστήματα μπορούν να είναι ιδιαίτερα μεγάλα (έχουν περιγραφεί και διαστήματα διάρκειας 53 ετών) ενώ στις υποτροπές οι SCVs επιδεικνύουν μια μη αναμενόμενη, με βάση το αντιβιογράμμα, αντοχή (Vincent et al., 2006).

Η αντοχή στις αμινογλυκοσίδες είναι άλλο ένα επακόλουθο της διαταραχής της μεταφοράς ηλεκτρονίων : η ηλεκτροχημική βαθμίδωση μεταξύ των 2 επιφανειών της μεμβράνης (αρνητικό δυναμικό στο εσωτερικό) δημιουργείται καθώς τα ηλεκτρόνια ρέουν μέσω της F_0F_1 ATPάσης της μεμβράνης και ευνοεί την είσοδο των θετικά φορτισμένων μορίων αμινογλυκοσίδης. Όταν διαταραχθεί αυτή η βαθμίδωση διακόπτεται η είσοδος αμινογλυκοσίδης. Χάρη στην ιδιότητά τους αυτή οι SCVs μπορούν εύκολα να επιλεγούν όταν οι *S.aureus* εκτεθούν σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις γενταμυκίνης (4-8 X MIC) (Vincent et al., 2006).

Η προσθήκη μεναδιόνης ή αιμίνης αναστρέφει πλήρως τον SCV φαινότυπο. Επομένως, χρειάζεται μεγάλη προσοχή στην επιλογή των θρεπτικών υλικών, καθώς μερικά περιέχουν μεγάλες ποσότητες μεναδιόνης και/ή αιμίνης (brain heart infusion, Schaedler's broth). Άλλοι ζωμοί αντίθετα (tryptic soy broth, Mueller Hinton broth), περιέχουν μικρές ποσότητες μεναδιόνης και αιμίνης, επιτρέποντας έτσι την έκφραση του SCV φαινότυπου (Vincent et al., 2006).

Η μη αναγνώριση ενός υποπληθυσμού SCV μπορεί να έχει ολέθρια αποτελέσματα, καθώς οδηγεί τον κλινικό να πιστέψει ότι έχει να κάνει με μια νέα λοίμωξη και όχι με υποτροπή μιας παλαιάς.

A.4. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ

Οι σταφυλόκοκκοι αντιπροσωπεύουν ένα από τα σημαντικότερα γένη βακτηρίων που αποικίζουν τα ανώτερα θηλαστικά. Μπορούν να είναι :

- παροδικοί αποικιστές οι οποίοι δεν πολλαπλασιάζονται πάνω στον ξενιστή (transients)
- παροδικοί αποικιστές οι οποίοι πολλαπλασιάζονται και παραμένουν για βραχείες χρονικές περιόδους πάνω στον ξενιστή (temporary residents)
- μόνιμοι αποικιστές (residents) (πολλαπλασιάζονται και παραμένουν για μεγάλες χρονικές περιόδους)

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των περισσότερων γενών και υπογενών που αποικίζουν έναν ξενιστή, είναι ότι καθένα από αυτά αντιπροσωπεύεται από αρκετά διαφορετικά στελέχη. Μάλιστα, ανάλογα με το είδος, πολλά από τα στελέχη αυτά μπορούν να παραμείνουν για μια περίοδο αρκετών εβδομάδων έως αρκετών ετών. Εξαιρέσεις αποτελούν τα είδη *S.aureus*, *S.lugdunensis*, *S.saprophyticus* και *S.cohnii* τα οποία αντιπροσωπεύονται από ένα ή το πολύ δύο ανιχνεύσιμα στελέχη για κάθε ξενιστή.

Το εύρος ξενισμού των σταφυλοκόκκων ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με το είδος ή το υποείδος. Γενικά, οι σταφυλόκοκκοι που αποικίζουν συγγενικά είδη ξενιστών συγγενεύουν περισσότερο μεταξύ τους από ό,τι οι αποικιστές λιγότερο συγγενικών ξενιστών. Υπάρχει μια στενή «ευθυγράμμιση» ανάμεσα στα φυλογενετικά δένδρα των σταφυλοκόκκων και των τάξεων (orders) θηλαστικών που αποτελούν ξενιστές για τα εν λόγω γένη και υπογένη σταφυλοκόκκων. Τα ανωτέρω προκύπτουν από μελέτες DNA-DNA υβριδισμού καθώς και sequencing νουκλεοτιδίων και αμινοξέων.

Είναι δύσκολο να δεχθεί κανείς ότι η συμφωνία αυτή των φυλογενετικών δένδρων είναι τυχαία. Αντίθετα, οι περισσότεροι ερευνητές υποστηρίζουν ότι έχουμε να κάνουμε με μία παράλληλη κλαδογένεση ή συνεξέλιξη των σταφυλοκόκκων και των



ξενιστών τους.

Στον άνθρωπο, τα είδη *S.epidermidis*, *S.warneri* και *S.hominis* έχουν, σε μεγάλο βαθμό, εκτοπίσει τα είδη *S.pasteuri* και *S.haemolyticus*, τα δύο κύρια είδη στα πιθηκοειδή. Επιπλέον, τα ειδικά για τον άνθρωπο υποείδη *S.capitis*, *S.auricularis* και *S.cohnii* έχουν σε μεγάλο βαθμό εκτοπίσει τα υποείδη εκείνα που επιδεικνύουν ένα περισσότερο εκτεταμένο εύρος ξενισμού.

Σταφυλόκοκκοι έχουν επίσης απομονωθεί στον αέρα, στη σκόνη, στο έδαφος και στο νερό, στον ρουχισμό αλλά και σε έντομα, μαλάκια και φυτά, ειδικά σε περιοχές με πανίδα. Τέλος, ανευρίσκονται πολύ συχνά σε ζωϊκά προϊόντα, ειδικά αυτά που προέρχονται από φυσικούς ξενιστές.

Η παρουσία εντεροτοξινογόνων στελεχών *S.aureus* (και λιγότερο συχνά *S.intermedius*) στα τρόφιμα, θεωρείται ως ένας κίνδυνος για την δημόσια υγεία. Αντιθέτως, τα είδη *S.carnosus* και *S.piscifermentans* χρησιμοποιούνται στην ωρίμανση (ζύμωση) προϊόντων κρέατος και ψαριού αντίστοιχα και χαρακτηρίζονται ως ωφέλιμοι μικροοργανισμοί.

Οι σταφυλόκοκκοι αποτελούν ένα από τα κύρια γένη που αποικίζουν το δέρμα, τους αδένες του δέρματος και τους βλεννογόνους των θηλαστικών. Οι μεγαλύτεροι πληθυσμοί σταφυλοκόκκων (10^4 - 10^6 cfu's/cm) ανευρίσκονται σε περιοχές του δέρματος πλούσιες σε σμηγματογόνους και ιδρωτοποιούς αδένες, καθώς επίσης σε περιοχές δέρματος και βλεννογόνων που περιβάλλουν φυσικές οπές του σώματος. Το ανθρώπινο δέρμα παρέχει ένα μεγάλο αριθμό habitats και φωλεών (niches). Τα πλέον μελετημένα habitats είναι το τριχωτό της κεφαλής, το μέτωπο, το πρόσωπο, οι ρώθωνες, ο έξω ακουστικός πόρος, οι μασχάλες, η βουβωνική χώρα, το περίνεο, οι παλάμες και οι μεσοδακτύλιες πτυχές των ποδιών.

Σταφυλόκοκκοι έχουν ανευρεθεί και σε άλλες περιοχές όπως φάρυγγα, επιπεφυκότες, στόμα, μαζικούς αδένες, εντερικό σωλήνα, ουρογεννητικό και αναπνευστικό σύστημα. Όμως γενικά πιστεύεται ότι οι περιοχές αυτές αποτελούν δευτερεύοντα habitats που υποστηρίζουν μια κατάσταση παροδικού αποικισμού. Αρκετά είδη και υποείδη σταφυλοκόκκων έχουν έναν σαφή τροπισμό (προτιμούν κάποιο συγκεκριμένο habitat), ενώ κάποια άλλα έχουν χαμηλού βαθμού ή δεν έχουν καθόλου τροπισμό. Το είδος που κυριαρχεί στον άνθρωπο είναι ο *S.epidermidis* και ακολουθεί, με μικρή διαφορά, ο *S.hominis*.

Μελέτες που έγιναν σε μεγάλα δείγματα πληθυσμού έδειξαν ότι η πλειονότητα των ατόμων έφεραν ταυτόχρονα έναν συνδυασμό 10-24 διαφορετικών στελεχών *S.epidermidis*. Τα στελέχη αυτά αποτελούν παροδικούς και μόνιμους αποικιστές. Αυτός ο σχετικά υψηλός αριθμός στελεχών αποδίδεται εν μέρει στο μεγάλο εύρος ξενισμού του είδους αυτού.

A.5. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Το είδος *S.aureus* εμφανίζει σημαντικά υψηλότερη παθογένεια (pathogenicity) σε σχέση με τους κοαγκουλάση-αρνητικούς σταφυλοκόκκους (CoNS). Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι παράγει έναν μεγάλο αριθμό εξωκυττάρων λοιμογόνων παραγόντων (virulence factors), ενώ αντίθετα οι CoNS παράγουν ελάχιστους (Peacock S.J., 2005). Οι CoNS βασίζονται πολύ περισσότερο στην ικανότητά τους να αποικίζουν ξένα σώματα όπως καθετήρες, από τα οποία μπορούν εν συνεχεία να εισέλθουν στην συστηματική κυκλοφορία. Ο *S.aureus* είναι βασικά ένα εξωκυττάριο παθογόνο. Η κρατούσα άποψη σήμερα είναι ότι η παθογένεια ενός στελέχους αποτελεί συνάρτηση του αριθμού των εξωκυττάρων ουσιών που παράγει το εν λόγω στέλεχος. Η άποψη αυτή είναι απολύτως συμβατή με την προσφάτως εισαχθείσα έννοια της «λοιμογόνου απάντησης» (virulence response), ενός χρονικά «ενορχηστρωμένου» προγράμματος έκφρασης των εξωκυττάρων αυτών παραγόντων το οποίο βαίνει παράλληλα με την εξέλιξη της λοίμωξης (Projan S.J. & Novick R.P., 1997).

Κεντρικό ρόλο στο μοντέλο αυτό παίζει το σύστημα agr (accessory gene regulator). Πρόκειται για ένα σύστημα ελέγχου το οποίο, ανάλογα με την βακτηριακή πυκνότητα, επιτρέπει την επιλεκτική έκφραση κάποιων συγκεκριμένων γονιδίων.

Στην διάρκεια της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης (exponential phase), όταν η βακτηριακή πυκνότητα είναι χαμηλή, το σύστημα επιτρέπει την έκφραση των προσκολλητινών (adhesins) επιφανείας. Αντίθετα, στην διάρκεια της λεγόμενης φάσης αρχόμενης επιβράδυνσης (postexponential growth), όπου έχουμε υψηλή πυκνότητα βακτηρίων, προάγεται η σύνθεση τοξινών και εξωενζύμων, γεγονός που επιτρέπει στους μικροοργανισμούς να διαφύγουν από την πρωτοπαθή εστία της λοίμωξης και να διασπαρούν σε νέες εστίες, όπου ο κύκλος μπορεί να επαναληφθεί.



Η εν λόγω διασπορά λαμβάνει χώραν κατά την διάρκεια της φάσης στασιμότητας (stationary phase) (Projan S.J. & Novick R.P., 1997).

Η επιλεκτική έκφραση των γονιδίων του *agr* locus πραγματοποιείται χάρη στην ύπαρξη 2 οπερονίων τα οποία μεταγράφονται προς αντίθετες κατευθύνσεις (Moreillon P. et al., 2005). Το μεταγράφημα του ενός οπερονίου ονομάζεται RNAII και ελέγχεται από τον προαγωγέα P2, ενώ το δεύτερο ονομάζεται RNAIII και ελέγχεται από τον προαγωγέα P3. Το RNAII μεταγράφημα κωδικοποιεί 4 πρωτεΐνες, τις AgrB, AgrD, AgrC και AgrA, ενώ το RNAIII μεταγράφημα κωδικοποιεί την δ-αιμολυσίνη (Projan S.J. & Novick R.P., 1997). Όταν η βακτηριακή πυκνότητα είναι χαμηλή, ο P2 είναι ανενεργός και το επίπεδο μεταγραφής του οπερονίου είναι χαμηλό. Καθώς όμως η βακτηριακή πυκνότητα αυξάνει, ενεργοποιείται τόσο ο P2 όσο και ο P3, με αποτέλεσμα την προαγωγή της μεταγραφής των RNAII και RNAIII. Το RNAIII δρά ως ρυθμιστικό μόριο με διττή δράση: ενεργοποιεί την έκφραση των περισσότερων εκκρινόμενων πρωτεϊνών ενώ αντίθετα, καταστέλλει την έκφραση των παραγόντων επιφανείας (Moreillon P. et al., 2005).

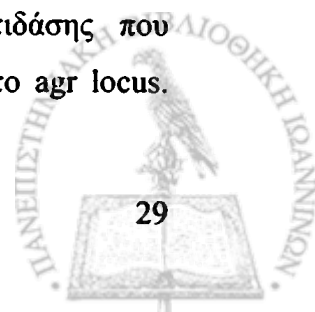
Άλλα συστήματα που ρυθμίζουν την έκφραση των παραγόντων λοιμογονικότητας είναι τα *sar*, *saeRS*, *ArlR* και *ArlS*, *Rot* και *mgt* (Gordon R. & Lowly F.D., 2008).

Σύμφωνα με τον πλέον αυστηρό ορισμό, ως λοιμογόνος παράγων ορίζεται κάθε ουσία η οποία, όταν ληφθεί σε κεκαθαυμένη μορφή και ενεθεί σε κάποιο πειραματόζωο, ασκεί κάποια παθογόνο δράση. Όμως, επειδή η δράση πολλών ουσιών είναι ακόμα άγνωστη, στην παρούσα εργασία θα χαρακτηρίσουμε ως λοιμογόνους παράγοντες όλους εκείνους τους παράγοντες που εμπλέκονται, έστω και θεωρητικά, στην πρόκληση νόσου.

Διακρίνουμε :

- Προσκολλητίνες επιφανείας (MSCRAMMs / microbial surface components reacting with adherence matrix molecules).

Πρόκειται για παράγοντες που εμπλέκονται στην προσκόλληση των βακτηρίων επί κυττάρων ή επί εξωκυττάρων θεμέλιων ουσιών (matrices). Ανευρίσκονται σε όλα τα στελέχη *S.aureus*. Οι περισσότεροι εξ αυτών είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένοι με την πεπτιδογλυκάνη του τοιχώματος μέσω του μορίου μιας τρυσπεπτιδάσης που ονομάζεται σορτάση (sortase). Η ρύθμισή τους είναι ανεξάρτητη από το *agr* locus.



Είναι χρωμοσωμικά κωδικοποιούμενοι και δεν ανήκουν σε κάποια γονιδιακή νησίδα (genomic/pathogenicity island), γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανώς εμφανίστηκαν και σταθεροποιήθηκαν στο γονιδίωμα του *S.aureus* νωρίτερα σε σχέση με τα κινητά μεταθετά στοιχεία (mobile elements) (Moreillon P. et al., 2005).

- Παράγοντες που διαταράσσουν την άμυνα του ξενιστή.

Πρόκειται για ουσίες που αναστέλλουν ή περιορίζουν την φαγοκυττάρωση, ή που παρεμποδίζουν την δράση των ειδικών αντισταφυλοκοκκικών αντισωμάτων ή άλλων ειδικών μηχανισμών άμυνας του ξενιστή.

- Παράγοντες που συμμετέχουν στην διείσδυση εντός ιστών και στην αποδόμηση συστατικών εξωκυττάρων θεμέλιων ουσιών.

Στους πίνακες 1, 2 και 3 ταξινομούνται οι λοιμογόνοι παράγοντες του *S.aureus* με βάση τον πιθανολογούμενο ρόλο τους στην εξέλιξη της λοίμωξης (Projan S.J. & Novick R.P., 1997).



Πίνακας 1. Προσκολλητίνες επιφανείας & υπεύθυνα γονίδια

Προσκολλητίνες επιφανείας MSCRAMMs	Γονίδιο
πρωτεΐνη A	spa
παράγων συσσωρεύσεως (clumping factor) A	clfA
παράγων συσσωρεύσεως B	clfB
πρωτεΐνη συνδέουσα το κολλαγόνο (collagen binding protein)	cna
πρωτεΐνη A συνδέουσα την φιβρονεκτίνη (fibronectin binding protein A)	fna
πρωτεΐνη B συνδέουσα την φιβρονεκτίνη (fibronectin binding protein B)	fnb
Serine-aspartate repeat containing protein C	sdrC
Serine-aspartate repeat containing protein D	sdrD
Serine-aspartate repeat containing protein E	sdrE
Πρωτεΐνη ευαίσθητη στην πλασμίνη (Plasmin sensitive protein)	pls
Παράγων που επηρεάζει την αντοχή στην μεθικιλίνη παρουσία Triton X100	fmtB
Πρωτεΐνη επιφανείας A του <i>S.aureus</i> (<i>S.aureus</i> surface protein A)	sasA
<i>S.aureus</i> surface protein B	sasB
<i>S.aureus</i> surface protein C	sasC
<i>S.aureus</i> surface protein E	sasE
<i>S.aureus</i> surface protein F	sasF
<i>S.aureus</i> surface protein G	sasG
<i>S.aureus</i> surface protein H	sasH
<i>S.aureus</i> surface protein I	sasI
<i>S.aureus</i> surface protein J	sasJ
<i>S.aureus</i> surface protein K	sasK

**Πίνακας 2. παράγοντες που διαταράσσουν την άμυνα του ξενιστή
& υπεύθυνα γονίδια**

παράγοντες που διαταράσσουν την άμυνα του ξενιστή	γονίδιο
εντεροτοξίνες A, B, C1-3, D, E, H	entA-H
Τοξίνη του TSS (TSSToxin-I)	Tst
επιδερμολυτικές τοξίνες A, B	eta, etb
πρωτεΐνη A	Spa
Λιπάση	Geh
V8 πρωτεάση	SasP
ένζυμο τροποποιητικό των λιπαρών οξέων (FAME)	Fme
Λευκοκτονίνη Panton-Valentine (PVL)	lukF-PV, lukS-PV
Λευκοκτονίνη R (leukocidin R)	lukF-R, lukS-R
πολυσακχαρίτης ελύτρου τύπου 1	cap1 locus
πολυσακχαρίτης ελύτρου τύπου 5	cap5 locus
πολυσακχαρίτης ελύτρου τύπου 8	cap8 locus
σταφυλοκινάση /staphylokinase	Sak

**Πίνακας 3. παράγοντες που συμμετέχουν στην διείσδυση εντός ιστών
& υπεύθυνα γονίδια**

παράγοντες που συμμετέχουν στην διείσδυση εντός ιστών	γονίδιο
α-αιμολυσίνη (τοξίνη)	Hla
β-αιμολυσίνη (σφιγγομυελινάση C)	Hlb
γ-αιμολυσίνη	hlgA, hlgB, hlgC
δ-αιμολυσίνη	Hld
φωσφολιπάση C	Plc
Μεταλλοπρωτεάση (ελαστάση)	SepA
Υαλουρονιδάση	HysA
Νουκλεάση	Nuc



Ακολουθεί μια σύντομη περιγραφή των σημαντικότερων λοιμογόνων παραγόντων.

Καταλάση

Όλα τα στελέχη σταφυλοκόκκων παράγουν καταλάση.

Η καταλάση εξουδετερώνει το H_2O_2 που παράγεται εντός των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων, διασπώντας το σε H_2O και O_2 .

Κοαγκουλάση

Πρωτεΐνη η οποία αντιδρά ειδικά με την προθρομβίνη και την ενεργοποιεί, πυροδοτώντας έτσι τον καταρράκτη της πήξης. Προκαλεί πήξη του πλάσματος χωρίς την παρουσία ασβεστίου (Foster T.J., 2002). Πρακτικώς παράγεται αποκλειστικά από το είδος *S.aureus*. Τα είδη *S.intermedius*, *S.delphini*, *S.huicus* και *S.schleiferi ssp coagulans* παράγουν επίσης κοαγκουλάση, όμως το γεγονός αυτό αποτελεί ένα έλασσον πρόβλημα καθ'ότι τα είδη αυτά δεν είναι παθογόνα (Projan S.J. & Novick R.P., 1997; Winn W.C. et al., 2006). Στην αποκλειστική αυτή ιδιότητα του *S.aureus* στηρίζεται η δοκιμασία κοαγκουλάσης σωληναρίου (tube coagulase test).

Παράγων αδράς συσσωρεύσεως A (ClfA /clumping factor)

Στην παραγωγή του παράγοντα αυτού από το είδος *S.aureus* βασίζεται η δοκιμασία συγκόλλησης σε slide, η πλέον διαδεδομένη δοκιμασία ταυτοποίησης του *S.aureus*.

Μέχρι πρόσφατα πιστεύαμε ότι πρόκειται για την «συνδεδεμένη» μορφή κοαγκουλάσης (bound coagulase). Σήμερα γνωρίζουμε πλέον ότι δεν πρόκειται για κοαγκουλάση αλλά για μια πρωτεΐνη επιφανείας η οποία συνδέεται με το ινωδογόνο και το ινώδες (fibrinogen receptor) (Projan S.J. & Novick R.P., 1997). Η ClfA εμφανίζει σημαντικές ομοιότητες με τις πρωτεΐνες που συνδέουν τις φμπρονεκτίνες.

Παράγων αδράς συσσωρεύσεως B (ClfB)

Είναι μια προσκολλητίνη επιφανείας η οποία συνδέεται με το ινωδογόνο.

Συνδέεται επίσης με την τύπου I κυτοκερατίνη K10 (cytokeratin) στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων του ρινικού βλεννογόνου.

Πρωτεΐνη συνδέουσα το ινωδογόνο (FbrA)

Πρόσφατα περιεγράφη μια δεύτερη μορφή πρωτεΐνης συνδέουσας το ινωδογόνο.

Το γονίδιο που την κωδικοποιεί (fbr), εμφανίζει σημαντικού βαθμού ομοιότητα με το γονίδιο της κοαγκουλάσης. Όμως, σε αντίθεση με την κοαγκουλάση, η Fbr είναι προσκολλημένη στο βακτήριο. Πολλοί ερευνητές πιστεύουν ότι η Fbr είναι η «λοιμογόνος» μορφή της κοαγκουλάσης που προάγει την προσκόλληση και τον σχηματισμό εκβλαστήσεων, ενώ αντίθετα, η ελεύθερη μορφή αντιπροσωπεύει ένα εξελικτικό σφάλμα (Projan S.J. & Novick R.P., 1997).

Πολυσακχαρίτες του ελύτρου

Συνεισφέρουν στην διεισδυτικότητα των βακτηρίων καθώς αναστέλλουν την οψωνινοποίησή τους προκειμένου να φαγοκυτταρωθούν από τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα. Από τους 12 γνωστούς τύπους πολυσακχαριτών του *S.aureus* Οι τύποι 5 και 8 αντιπροσωπεύουν το 85% όλων των στελεχών.

Πρωτεΐνη A

Η βασική ιδιότητα της πρωτεΐνης A είναι η ικανότητά της να συνδέεται με το Fc τμήμα των IgG ανοσοσφαιρινών. Με τον τρόπο αυτό καταργείται η οψωνινοποίηση των βακτηρίων από τις ανοσοσφαιρίνες, εξ' αιτίας αυτού του «λανθασμένου» προσανατολισμού των τελευταίων. Έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη A παράγεται μόνο στη διάρκεια της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης (exponential growth). Αυτό σημαίνει ότι τα βακτήρια παράγουν αυτήν την πρωτεΐνη επιφανείας μόνο όταν είναι πιθανό να συναντήσουν IgG ανοσοσφαιρίνες. Για παράδειγμα, μόνο τα βακτήρια τα ευρισκόμενα στις παρυφές ενός αποστήματος είναι πιθανό να βρίσκονται σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης, ενώ τα κεντρικώς κείμενα βρίσκονται κατά κανόνα στην αρχή της φάσης στασιμότητας (postexponential growth).

Υπεραντιγόνα (superantigens / SAgS)

Πολλές από τις εξωκυττάρια πρωτεΐνες των σταφυλοκόκκων έχουν ιδιότητες υπεραντιγόνου. Εδώ περιλαμβάνονται οι εντεροτοξίνες A έως E, η TSST-1 και οι επιδερμολυτικές τοξίνες A και B. Κοινή ιδιότητα όλων αυτών των υπεραντιγόνων είναι να προκαλούν σύνδρομο τοξικού shock (TSS).



Όπως υποδηλώνει και η ονομασία τους, αποτελούν ισχυρότατα μιτογόνα των Τ-λεμφοκυττάρων.

Ο μηχανισμός της διέγερσης των Τ-λεμφοκυττάρων από τα Sags διαφέρει από την τυπική αντιγονική διέγερση: τα Sags, σε αντίθεση με τον κλασικό μηχανισμό ενεργοποίησης των Τ-λεμφοκυττάρων, δεν απαιτούν πρωτεολυτική επεξεργασία από μέρους των αντιγονοπαρουσιαστικών (APC) κυττάρων. Τα Sags συνδέονται απ' ευθείας με αμετάβλητες περιοχές του συμπλέγματος MHC τάξεως II που βρίσκονται πάνω στην επιφάνεια των APCs. Οι τοξίνες αυτές μπορούν να συνδεθούν με μια μεγάλη ποικιλία τέτοιων περιοχών, με αποτέλεσμα να καταστρατηγείται η αντιγονική ειδικότητα. Έτσι, ενώ ένα τυπικό αντιγονικό πεπτίδιο ενεργοποιεί περίπου 1 στα 10000 Τ-λεμφοκύτταρα, ένα Sag, όπως η TSST-1, μπορεί να ενεργοποιήσει το 10-50% όλων των Τ-λεμφοκυττάρων. Αυτή η μαζική ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων έχει σαν αποτέλεσμα την υπέρμετρη παραγωγή κυτοκινών όπως IL-1 TNF-α από τα μακροφάγα και TNF-β, IL-2 και IFN-γ από τα Τ-λεμφοκύτταρα. Όλες αυτές οι κυτοκίνες διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση TSS. Άλλες ιδιότητες των Sags με πιθανή συμβολή στην πρόκληση TSS είναι η απ'ευθείας δράση τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και ότι σε πειραματόζωα ενισχύουν σημαντικά την δράση των ενδοτοξινών (σημαντική μείωση της LD50) (Projan S.J. & Novick R.P., 1997).

Λευκοκτονίνη Panton-Valentine (PVL)

Περιεγράφη για πρώτη φορά το 1894 από τον Van de Velde, ο οποίος παρατήρησε πρώτος την ικανότητα της κυτταροτοξίνης αυτής να λύει τα λευκοκύτταρα.

Οι Panton και Valentine (1932) συνέδεσαν την παραγωγή της με λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων.

Αποτελείται από 2 υπομονάδες (F και S) και κωδικοποιείται από 2 παρακείμενα γονίδια. Τα γονίδια αυτά φέρονται επί ενός βακτηριοφάγου (phiSLT) ο οποίος ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα του *S.aureus*, προσδίδοντας στο στέλεχος υψηλή λοιμογονικότητα (Boyle-Vavra S. & Daum R.S., 2007).

Ανάλογα με τον συνδυασμό πρωτεϊνών F και S, η σχηματιζόμενη τοξίνη έχει διαφορετικές λευκοκυτταρολυτικές, ερυθροκυτταρολυτικές και δερμονεκρωτικές ιδιότητες (Gordon R. & Lowy F.D., 2008).

Ανήκει στην οικογένεια των τοξινών που σχηματίζουν πόρους.

Έχει αποδειχθεί ότι προάγει *in vitro* τον κυτταρικό θάνατο των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων (PMNs), είτε με απόπτωση είτε με νέκρωση, ανάλογα με την συγκέντρωσή της. Έτσι, χαμηλές συγκεντρώσεις PVL πυροδοτούν αποπτωτικές βλάβες των PMNs, ενώ οι υψηλές πυροδοτούν νεκρωτικές. Πιστεύεται ότι η PVL στρέφεται απ'ευθείας έναντι της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων όπου σχηματίζει πόρους. Ο σχηματισμός πόρων επιφέρει μια ταχεία διαταραχή της ομοιόστασης των μιτοχονδρίων και ενεργοποίηση των κασπασών 9 και 3 (Genestier A-L et al., 2005).

Ανευρίσκεται σχεδόν πάντοτε σε στελέχη που απομονώνονται από λοιμώξεις της κοινότητας και συνδέεται με την παρουσία των νησίδων SCCmec IV κατά κύριο λόγο, αλλά και V, σπανιότερα (Boyle-Vavra S. & Daum R.S., 2007).

Πρόσφατα αναγνωρίστηκαν 3 νέα σύνδρομα συνδεδεμένα με την παραγωγή της PVL (Morgan M., 2005):

- Κεραυνοβόλος πορφύρα (purpura fulminans)
- Σήψη του δέρματος (skin sepsis)
- Νεκρωτική πνευμονία

Σε μια μελέτη 172 στελεχών *S.aureus* βρέθηκε ότι η PVL παράγεται από το 85% των στελεχών που συνδέονταν με νεκρωτική πνευμονία της κοινότητας, από το 55% των στελεχών που συνδέονταν με κυτταρίτιδα, από το 50% των στελεχών που προκαλούσαν δερματικά αποστήματα και από το 23% των στελεχών που προκαλούσαν οστεομυελίτιδα. Αντίθετα, δεν ανιχνεύτηκε σε στελέχη υπεύθυνα για άλλες λοιμώξεις όπως λοιμώδη ενδοκαρδίτιδα, μεσοθωρακίτιδα, ενδονοσοκομειακή πνευμονία και εντεροκολίτιδα. Τέλος δεν ανιχνεύτηκε σε στελέχη που συνδέονταν με TSS (Lina G. et al., 1999).

Τοξίνη του συνδρόμου τοξικού shock (TSST-1)

Η TSST-1 ήταν η πρώτη τοξίνη της οποίας απεδείχθη η συμμετοχή στο TSS.

Σήμερα είναι αποδεκτό ότι η TSST-1 αποτελεί το αίτιο TSS στο 75% όλων των περιπτώσεων. Παράγεται από όλα σχεδόν τα στελέχη *S.aureus* που απομονώνονται από καλλιέργειες κολλικού ή τραχηλικού επιχρίσματος επί περιπτώσεων TSS σχετιζόμενου με έμμηνο ρύση (menstruation associated).



Αντίθετα, παράγεται από το 50% των στελεχών που απομονώνονται από άλλες εστίες σε περιπτώσεις TSS μή σχετιζόμενου με έμμηνο ρύση (Projan S.J. & Novick R.P., 1997).

Οι CoNS δεν παράγουν TSST-1.

Επιδερμολυτικές τοξίνες ETA και ETB

Προκαλούν την τοξική επιδερμική νεκρόλυση (Staphylococcal scalded skin syndrome), σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από αποχωρισμό των κυττάρων της κοκκιώδους στοιβάδας του δέρματος λόγω ρήξης των δεσμοσωματίων.

Τα υπεύθυνα γονίδια για τις 2 τοξίνες έχουν ταυτοποιηθεί πλήρως.

Η ETA κωδικοποιείται από ένα χρωμοσωμικό γονίδιο ενώ η ETB κωδικοποιείται από πλασμιδιακό.

A.6. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Η βασική ανατομική βλάβη που προκαλεί ο *S.aureus* είναι ένα πυογόνο εξίδρωμα ή ένα απόστημα (Moreillon P. et al., 2005).

Ενίοτε, η παραγωγή εξωτοξίνης κυριαρχεί στην κλινική εικόνα (τροφική δηλητηρίαση ή σύνδρομο τοξικού shock).

Κάθε εντοπισμένη λοίμωξη, ακόμα και η πλέον «καλοήθης», μπορεί να γίνει το σημείο διασποράς μίας δυνητικά θανατηφόρου βακτηριαιμίας. Επομένως, οι κλινικές περιγραφές που θα ακολουθήσουν δεν πρέπει να θεωρηθούν ως αυστηρά καθορισμένες οντότητες διότι συχνά διαπλέκονται από την στιγμή που έχει επέλθει αιματογενής διασπορά. Στην συνέχεια περιγράφονται συνοπτικά οι κύριες κλινικές εκδηλώσεις που προκαλούνται από τον *S.aureus*.

Α.6.1. Εντοπισμένες λοιμώξεις δέρματος και εξαρτημάτων του

Θυλακίτις, δοθιήν, ψευδάνθραξ

Η θυλακίτις είναι η πλέον ήπια λοίμωξη και ορίζεται ως πυόδερμα που εμπλέκει τον θύλακο της τριχός και τον άμεσα γειτνιάζοντα ιστό. Επί επεκτάσεως της φλεγμονώδους εξεργασίας γίνεται λόγος για δοθιήνα, ενώ αν επεκταθεί μέχρι τον υποδόριο ιστό χαρακτηρίζεται ως ψευδάνθραξ.

Μολυσματικό κηρίο

Κηλιδώδες εξάνθημα το οποίο εν συνεχεία καθίσταται φυσαλλιδώδες. Οι φυσαλλίδες ρήγνυνται ταχέως και εφελκιδοποιούνται. Προσβάλλει κυρίως παιδιά και εμφανίζεται συνήθως στα εκτεθειμένα μέρη του σώματος Ένα 10% των λοιμώξεων αυτών οφείλεται στον *S. pyogenes* ενώ σε ένα άλλο 10% απομονώνονται αμφοτέροι οι μικροοργανισμοί.

Πυώδης ιδρωταδενίτις

Υποτροπιάζουσα λοίμωξη των αποκρινών ιδρωτοποιών αδένων συχνά οφειλόμενη στον *S. aureus*.

Μαστίτις

Αφορά το 1-3% των λεχωϊδων και συνήθως εμφανίζεται την 2^η ή την 3^η εβδομάδα μετά τον τοκετό. Μπορεί να εκδηλώνεται ως ένα απλό επώδυνο ερυθρηματώδες οζίδιο ή ως ένα πολύχωρο απόστημα.

Επιμολύνσεις χειρουργικών τραυμάτων

Ο *S. aureus* είναι ένα πολύ συνηθισμένο αίτιο επιμολύνσεων των χειρουργικών τραυμάτων.



A.6.2. Εντοπισμένες λοιμώξεις με διάχυτο εξάνθημα

A.6.2.1. Τοξική επιδερμική νεκρόλυση (scalded skin syndrome /SSSS)

Το 1878 ο Ritter von Rittershain περιέγραψε μια αποφολιδωτική δερματίτιδα σε βρέφη ενός βρεφοκομείου στην Πράγα. Επακολούθως, η νόσος απεδείχθη πως είναι σταφυλοκοκκικής αιτιολογίας και ότι στην συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων αφορά παιδιά. Η νόσος ονομάστηκε νόσος του Ritter καθώς επίσης και staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS).

Κάποια σύγχυση επικράτησε το 1956 όταν 2 ανεξάρτητες ομάδες ερευνητών (Lyell και Lang / Walker) περιέγραψαν περιστατικά σε ενήλικες τα οποία μιμούνταν το SSSS. Η κλινική αυτή οντότητα ονομάστηκε τοξική επιδερμική νεκρόλυση (νόσος του Lyell) και γρήγορα διαφοροποιήθηκε σε 2 τύπους, έναν τύπο που εμφανιζόταν δευτερογενώς ως αντίδραση υπερευαισθησίας σε φάρμακα (βαρβιτουρικά, προϊόντα πυραζολόνης, σουλφοναμίδες) και έναν δεύτερο ο οποίος αφορούσε μόνο βρέφη με λοίμωξη από *S.aureus* και ο οποίος γνωρίζουμε πλέον ότι ταυτίζεται με την οντότητα που ήταν γνωστή ως νόσος του Ritter.

Το 1970 οι Melish & Glasgow μπόρεσαν, με την χρήση ενός πειραματικού ζωϊκού μοντέλου, να εκπληρώσουν τα κριτήρια του Koch για τον ρόλο τόσο του *S.aureus* όσο και της «αποφολιδωτικής» τοξίνης του. Σήμερα γνωρίζουμε ότι η νόσος οφείλεται σε 2 τοξίνες, την ETA και την ETB.

Η βασική παθολογοανατομική βλάβη συνίσταται στην αποκόλληση στοιβάδων της επιδερμίδας σε επίπεδο δεσμοσωματίων. Στον γενικό όρο SSSS περιλαμβάνονται :

- Η τοξική επιδερμική νεκρόλυση ή γενικευμένο SSSS

Πρόκειται για την πλέον σοβαρή εκδήλωση των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων που παράγουν αποφολιδωτικές τοξίνες. Η νόσος αρχίζει αιφνίδια με ένα ερύθημα που συχνά είναι περιτοματικό αρχικά και εντός ολίγων ημερών εξαπλώνεται σε ολόκληρο το σώμα. Συχνά παρατηρούνται πυρετός, ευερεθιστότητα και οστρακιοειδές εξάνθημα το οποίο μπορεί να είναι περισσότερο εκσεσημασμένο περιτοματικά και στις καμπτικές επιφάνειες των άκρων.

Το σημείο Nikolsky είναι θετικό.

Αργότερα (24-48 h μετά την εγκατάσταση της νόσου), εμφανίζονται μεγάλες φυσαλλίδες οι οποίες οδηγούν σε αποκόλληση στρωμάτων της κοκκιώδους στιβάδας ή της επιδερμίδας από το δέρμα. Οι φυσαλλίδες αυτές είναι πλαδαρές και στείρες βακτηρίων. Κατά κανόνα η ανάληψη είναι πλήρης, εντός 10 ημερών περίπου.

- *Φυσαλλιδώδες κηρίο (bullous impetigo)*

Αποτελεί την πιο συνηθισμένη μορφή της νόσου.

Εδώ παρατηρείται μόνο τοπική αποφολίδωση του δέρματος.

Στις φυσαλλίδες αυτές ανευρίσκονται άφθονα βακτήρια.

- *Οστρακιοειδής παραλλαγή της νόσου*

Στην παραλλαγή αυτή δεν έχουμε σχηματισμό φυσαλλίδων.

A.6.2.2. Σύνδρομο τοξικού shock (TSS)

Περιεγραφή για πρώτη φορά το 1978 (Todd et al., 1978) σε 7 παιδιά ηλικίας 8-17 ετών που εμφάνιζαν υψηλό πυρετό, υπόταση, διάρροια, διάχυτο ερύθημα, διανοητική σύγχυση και νεφρική ανεπάρκεια. Η νοσολογική αυτή οντότητα ονομάστηκε σύνδρομο τοξικού shock (TSS) και αργότερα χαρακτηρίστηκε ως συνώνυμη της «σταφυλοκοκκικής οστρακιάς», μιας σποραδικής οντότητας γνωστής από το 1927 (Moreillon P. et al., 2005).

Εμμηνορρυσιακό Σύνδρομο τοξικού shock (menstrual TSS)

Μόλις το 1980 έγινε αντιληπτό ότι αυτή η πολυσυστηματική νόσος παρατηρείτο συχνά σε γυναίκες και εγκαθίστατο συνήθως στη διάρκεια της έμμηνης ρύσης.

Το 1980 και το 1981 έλαβε επιδημικές διαστάσεις, γεγονός που σχετίστηκε με την εισαγωγή στην αγορά tampons υψηλής απορροφητικότητας. Ύστερα από την απομάκρυνση των tampons αυτών από την αγορά των ΗΠΑ, η επίπτωση της νόσου σε γυναίκες ηλικίας 19-44 ετών ελαττώθηκε σημαντικά : από 6/100000 το 1980 σε 1/100000 από το 1986 και μετά. Μια μεγάλη αναδρομική μελέτη έδειξε ότι από το 1970 ως το 1982 περίπου 1700 περιστατικά κατεγράφησαν στο Centers for Disease Control and Prevention. Εξ αυτών το 96% αφορούσε γυναίκες και το 92% εγκαθίστατο στην διάρκεια της έμμηνης ρύσης. Μια δεύτερη μελέτη έδειξε ότι το 98% των περιστατικών συνδεόταν με την χρήση tampons.



Μη εμμηνορρυσιακό Σύνδρομο τοξικού shock

Με την ελάττωση της επίπτωσης του εμμηνορρυσιακού TSS κατέστη εμφανές ότι το μη εμμηνορρυσιακό TSS είχε σημαντική επιδημιολογική σημασία. Κάποια περιστατικά του μη εμμηνορρυσιακού TSS συνδέονται ακόμα με τον αποικισμό του κόλπου ή του τραχήλου από τοξινογόνα στελέχη *S.aureus* και παρατηρούνται σε καταστάσεις όπως φλεγμονή του κόλπου, χρήση IUD, τοκετό, έκτρωση και λοχεία όπου μπορεί να εμφανιστεί 12 ώρες έως 8 εβδομάδες μετά τον τοκετό (Moreillon P. et al., 2005). Ένα 40 % των περιστατικών συνδέονται με χειρουργικές πρακτικές όπως κληληπλαστικές, αρθροσκοπήσεις, πλαστικές αναπλάσεις μαστού καθώς και με επιμολύνσεις χειρουργικών τραυμάτων.

Το σύνδρομο εμφανίζεται συνήθως 2 ημέρες μετά από τις ανωτέρω πρακτικές. Από την χειρουργική τομή απουσιάζει οποιοδήποτε σημείο φλεγμονής, γεγονός που υπογραμμίζει την σημασία της μέγιστης επαγρύπνησης από τον κλινικό γιατρό (Moreillon P. et al., 2005).

Το μη εμμηνορρυσιακό TSS έχει τα εξής χαρακτηριστικά: είναι συνήθως ενδονοσοκομειακή νόσος, παρατηρείται κυρίως σε γυναίκες (3:1), συνδέεται συχνά με πρόσφατη χορήγηση αντιβιοτικών και έχει συχνές επιπλοκές από νεφρούς και Κ.Ν.Σ (Moreillon P. et al., 2005).

Τα στελέχη συνδέονται με την παραγωγή TSST-1 μόνο στο 50 % των περιπτώσεων. Από τα στελέχη που δεν παράγουν TSST-1 τα μισά περίπου παράγουν εντεροτοξίνες Β ή C (Projan S.J. & Novick R.P., 1997).

Το κλινικό προφίλ μιας ασθενούς με εμμηνορρυσιακό TSS είναι μιας νεαρής γυναίκας 15-25 χρονών που κάνει χρήση tampons. Η νόσος εγκαθίσταται αιφνιδίως στην διάρκεια της έμμηνης ρύσης και οι κλινικές εκδηλώσεις εμπλέκουν πολλά οργανικά συστήματα. Στα χαρακτηριστικά συμπτώματα και σημεία περιλαμβάνονται έντονες μυαλγίες, πυρετός, έμετοι και διάρροια. Η ασθενής είναι συνήθως συγχυτική αλλά χωρίς εστιακά ή μηνιγγιτιδικά σημεία. Γρήγορα εγκαθίσταται βαρεία υπόταση. Μέσα σε λίγες ώρες αναπτύσσεται έντονο ερύθημα που μοιάζει με ηλιακό έγκαυμα και το οποίο συνοδεύεται από επιπεφυκίτιδα. Η φυσική εξέταση αποκαλύπτει υπεραιμία του κόλπου και συχνά πυώδες έκκριμα από το οποίο ενίοτε απομονώνεται *S.aureus*. Οι αιμοκαλλιέργειες είναι θετικές σε εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις.



Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί τα τελευταία χρόνια στην περιγραφή του μη εμμηνορρυσιακού συνδρόμου. Πολύ συχνά συνδέεται με μια μη εμφανή εστία λοίμωξης. Το 75% των περιπτώσεων αφορούν γυναίκες.

Ο δείκτης θνησιμότητας είναι υψηλότερος στο μη εμμηνορρυσιακό TSS, πιθανώς λόγω των δυσκολιών στο να τεθεί έγκαιρα η διάγνωση.

Οι υποτροπές είναι πολύ σπάνιες.

Στον πίνακα 4 παρατίθενται τα κυριότερα ευρήματα της οξείας φάσης του TSS (Projan S.J. & Novick R.P., 1997).

Πίνακας 4. Τα κυριότερα ευρήματα της οξείας φάσης του TSS *

Συμπτώματα & σημεία	%	Εργαστηριακά ευρήματα	%
Διάρροια	98	Αυξημένη κρεατινίνη ορού	69
Μυαλγίες	96	Θρομβοπενία †	59
Έμετοι	92	Υπασβεστιαμία ‡	58
Θερμοκρασία $\geq 40^{\circ} \text{C}$	87	Αζωθαιμία	57
Κεφαλαλγίες	77	Υπερχοληρυθριναιμία	54
Κυνάγχη	75	Αυξημένα ηπατικά ένζυμα	50
Υπεραιμία επιπεφυκότων	57	Λευκοκυττάρωση	48
Ελαττωμένη συνείδηση	40	πυουρία	46
Υπεραιμία του κόλπου	33	Αυξημένη CPK	41
Κολπικό έκκριμα	28	Αριστερή στροφή των λευκών $\geq 50\%$	36
Ρίγη	25		

* το ερύθημα & το shock αποτελούν μέρος του ορισμού του TSS και ως εκ τούτου δεν περιλαμβάνονται στον πίνακα.

† αιμοπετάλια < 100000

‡ $\text{Ca} \leq 7.5 \text{ mg/dl}$



Πίνακας 5. Κριτήρια για την διάγνωση του TSS

Θερμοκρασία $\geq 38.9^{\circ}\text{C}$

Συστολική πίεση $< 90\text{ mmHg}$

Ερύθημα ακολουθούμενο από αποφλίδωση, ειδικά στις παλάμες και στα πέλματα.

Συμμετοχή τουλάχιστον 3 από τα ακόλουθα συστήματα :

- γαστρεντερικό: έμετοι, διάρροιες
- μυοσκελετικό: έντονες μυαλγίες ή πενταπλάσια τουλάχιστον αύξηση της CPK.
- βλεννογόνοι (κόλπος, επιπεφυκότες ή φάρυγξ): έκδηλη υπεραίμια.
- νεφροί: τιμή κρεατινίνης τουλάχιστον διπλάσια της φυσιολογικής με πουρία απουσία ουρολοίμωξης.
- ήπαρ: τιμές χολερυθρίνης, AST, ALT τουλάχιστον διπλάσιες των φυσιολογικών
- αίμα: θρομβοπενία (αιμοπετάλια < 100000)
- Κ.Ν.Σ: αποπροσανατολισμός χωρίς εστιακά νευρολογικά σημεία.
- αρνητικός εργαστηριακός έλεγχος για λεπτοσπείρωση, ιλαρά και κηλιδώδη πυρετό των βραχωδών ορέων.

A.6.3. Μικροβιαμία και Ένδοκαρδίτις

Η επίπτωση της σταφυλοκοκκικής βακτηριαμίας, τόσο από *S.aureus* όσο και από CoNS, έχει αυξηθεί σημαντικά τις 3 τελευταίες δεκαετίες, γεγονός που πρωτίστως έχει να κάνει με την αυξανόμενη χρήση αγγειακών καθετήρων.

Επιπροσθέτως, ο επιπολασμός του ινσουλινοεξαρτώμενου σακχαρώδους διαβήτη και της νεφρικής ανεπάρκειας, δύο νοσημάτων που επιπλέκονται με σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις, παραμένει υψηλός. Υπάρχει μια ολοένα αυξανόμενη «δεξαμενή» ασθενών οι οποίοι διατρέχουν τον κίνδυνο να αναπτύξουν ενδοκαρδίτιδα απότοκο σταφυλοκοκκικής βακτηριαμίας (Projan S.J. & Novick R.P., 1997). Η «δεξαμενή» αυτή περιλαμβάνει :

1. Τους χρήστες ενδοφλέβιων ουσιών (IVDA)
2. Τους γηριατρικούς ασθενείς με τις εκφυλιστικές βαλβιδοπάθειες που συνοδεύουν την ομάδα αυτή
3. Τους λήπτες προσθετικών βαλβίδων
4. Τις πολυάριθμες επιδημίες ρευματικού πυρετού με καρδίτιδα που ενέσκησαν την δεκαετία του '80 στις ΗΠΑ.
5. Τους ασθενείς με Χ.Ν.Α που φέρουν υποδόριο αρτηριοφλεβώδες συρίγγιο (AVF).

Η σταφυλοκοκκική βακτηριαμία αντιπροσωπεύει πλέον μια από τις κύριες ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις. Σύμφωνα με δεδομένα της National Nosocomial Infections Surveillance για την δεκαετία 1980-1989, οι CoNS είναι πλέον το συχνότερο αίτιο βακτηριαμίας. Από το 1980 έως το 1992 το ποσοστό των μικροβιαμιών από *S.aureus* αυξήθηκε από 12% σε 17%. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ποσοστά από 11 έως 38%.

Περίπου 10000 έως 20000 περιστατικά ενδοκαρδίτιδας διαγιγνώσκονται ετησίως στις ΗΠΑ. Εξ αυτών το 30-50 % είναι σταφυλοκοκκικής αιτιολογίας. Προσφάτως, η ενδοκαρδίτις εκτόπισε την μηνιγγίτιδα (χάρη στην εισαγωγή του εμβολίου έναντι του *H.influenzae*) από την 4^η θέση των πλέον απειλητικών για την ζωή λοιμώξεων (ακολουθεί την βακτηριακή σηψαιμία, την πνευμονία και το ενδοκοιλιακό απόστημα).

Στους περισσότερους ασθενείς με βακτηριαμία από *S.aureus* (64-97%) ανευρίσκεται πρωτοπαθής εστία λοίμωξης. Οι ενδαγγειακοί καθετήρες αποτελούν την συχνότερη πρωτοπαθή εστία .



Άλλες σημαντικές πηγές βακτηριαμίας από *S.aureus* είναι :

- Οι λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων (ιδίως ο διαβητικός πούς και οι λοιμώξεις χειρουργικών τραυμάτων)
- Οι λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού (2-14%).
- Οι λοιμώξεις οστών και αρθρώσεων (1-15%).

Λοιμώδης ενδοκαρδίτις διαγιγνώσκεται στο 2-41% των περιπτώσεων βακτηριαμίας από *S.aureus* και είναι ιδιαίτερα συχνή στα πλαίσια της βακτηριαμίας της κοινότητας και της βακτηριαμίας των IVDA (Projan S.J. & Novick R.P., 1997).

A.6.4. Πνευμονία

Ο *S.aureus* ευθύνεται για το 20-30% των περιπτώσεων νοσοκομειακής πνευμονίας, ενώ αντίθετα ευθύνεται για ένα πολύ μικρό ποσοστό των περιπτώσεων πνευμονίας της κοινότητας. Η σταφυλοκοκκική πνευμονία μπορεί να οφείλεται είτε σε εισρόφηση είτε σε αιματογενή διασπορά και μπορεί να επιπλέκεται ή όχι με εμπύημα (Projan S.J. & Novick R.P., 1997).

A.6.5. Λοιμώξεις οστών και αρθρώσεων

Οι σταφυλόκοκκοι, παρά την δραματική αύξηση της επίπτωσης οστεομυελίτιδας από Gram-αρνητικά βακτηρίδια, αντιπροσωπεύουν ακόμη το συχνότερο αίτιο οστεομυελίτιδας.

Στους ενήλικες, ο *S.aureus* ευθύνεται για το 50-70% των περιπτώσεων οστεομυελίτιδας, ενώ για όλες τις ηλικιακές ομάδες το ποσοστό αυτό αγγίζει το 80-90% (Moreillon P. et al., 2005). Ο *S.aureus* είναι το συχνότερο αίτιο οξείας σηπτικής αρθρίτιδας στις περισσότερες ηλικιακές ομάδες. Στους ενήλικες με μη γονοκοκκική αρθρίτιδα, ο *S.aureus* ευθύνεται για το 60% όλων των λοιμώξεων των αρθρώσεων.

Σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα ή οποιαδήποτε άλλη χρόνια αρθρίτιδα, το ανωτέρω ποσοστό φτάνει το 80%.

A.6.6. Τροφική δηλητηρίαση

Η τροφική δηλητηρίαση από *S. aureus* λαμβάνει χώραν υπό μορφή επιδημιών. Ο *S. aureus* αντιπροσωπεύει το δεύτερο συχνότερο αίτιο οξείας τροφικής δηλητηρίασης στις Η.Π.Α και ευθύνεται για το 30% των τροφογενών νοσημάτων παγκοσμίως (Moreillon P. et al., 2005). Οφείλεται στην κατάποση προσχηματισμένης εντεροτοξίνης (SE). Η εκτιμώμενη συμπτωματική δόση κυμαίνεται μεταξύ 288 και 432 ng. Υπάρχουν 6 τύποι τοξίνης: SEA-SEE και SHE. Πρόκειται για τοξίνες που διεγείρουν το φρενικό νεύρο, το κέντρο του εμέτου και το συμπαθητικό νευρικό σύστημα. Υπάρχουν ενδείξεις ότι ασκούν απ'ευθείας βλάβη στον εντερικό βλεννογόνο.

Οι προσβεβλημένοι ασθενείς αναπτύσσουν αντισώματα έναντι της SE. Τα άτομα αυτά θα εμφανίσουν ηπιότερη συμπτωματολογία εάν τυχόν νοσήσουν εκ νέου. Όμως πολλοί ασθενείς δεν αναπτύσσουν αντισώματα έναντι της SEA. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο η SEA προκαλεί τόσο συχνά τροφική δηλητηρίαση. Μελέτη των επιδημιών που κατεγράφησαν στο Ηνωμένο Βασίλειο στην εικοσαετία 1969-90 έδειξε ότι το 80% των στελεχών που απομονώθηκαν παράγγαλαν SEA (Projan S.J. & Novick R.P., 1997).



A.7. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η προκαταρκτική ταυτοποίηση του γένους θα βασιστεί στις κλασικές μικροβιολογικές μεθόδους όπως χρώση κατά Gram και αντίδραση καταλάσης. Η οριστική ταυτοποίηση γίνεται με μια σειρά βιοχημικών δοκιμασιών.

Η περαιτέρω διάκριση του *S.aureus* από τους CoNS θα στηριχτεί σε μια σειρά δοκιμασιών όπως :

α. Δοκιμασία ελεύθερης κοαγκουλάσης σωληναρίου

β. Δοκιμασία συγκόλλησης σωματιδίων latex σε πλάκα (slide agglutination test)

Υπάρχουν πολλά εμπορικά kit, τα περισσότερα των οποίων ανιχνεύουν την πρωτεΐνη A και / ή τον παράγοντα αδράς συγκολλησεως (clumping factor) (Winn W.C. et al., 2006).

Πολλά υποσχόμενη είναι μια νέα μέθοδος ανίχνευσης της SaG (ενδο-β-N-ακετυλογλυκοζαμινιδάσης), ενός ενζύμου που παράγεται από όλα τα στελέχη *S.aureus* (Winn W.C. et al, 2006).

γ. Δοκιμασία DNA-άσης

δ. Δοκιμασία θερμοανθεκτικής νουκλεάσης

ε. Μοριακές μέθοδοι

Επειδή όλες οι ανωτέρω «συμβατικές» δοκιμασίες δίνουν ενίοτε ψευδώς θετικά αποτελέσματα, σπάνια εμφανίζεται η ανάγκη να καταφύγουμε σε μοριακές μεθόδους.

Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται κυρίως στην PCR και κατά κανόνα ανιχνεύουν ταυτόχρονα και την ανοχή στην μεθικιλίνη, όπου τα προβλήματα των φαινοτυπικών μεθόδων είναι συχνά (Brown D. et al., 2005). Έχουν κατασκευαστεί primers για μια σειρά «στόχων» ειδικών για το είδος (species specific). Μεταξύ των στόχων αυτών περιλαμβάνονται η νουκλεάση (nuc), η κοαγκουλάση (coa), η πρωτεΐνη A(spa), οι παράγοντες femA και femB, η αλληλουχία 16SrRNA και άλλοι (Brown D. et al., 2005).

A.8. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Στις αρχές της δεκαετίας του '70, ο ιατρικός κόσμος αναγκάστηκε να εγκαταλείψει την πεποίθησή του ότι, με δεδομένη την δυνατότητα επιλογής μεταξύ μίας πληθώρας αντιμικροβιακών παραγόντων, όλες οι βακτηριακές λοιμώξεις είναι θεραπεύσιμες. Η αισιοδοξία του αυτή κλονίστηκε από την ραγδαία επιδείνωση του προβλήματος της αντοχής στα αντιβιοτικά. Το πρόβλημα είναι ακόμα πιο έντονο για τα Gram θετικά βακτήρια όπως οι πνευμονιόκοκκοι, οι εντερόκοκκοι και οι σταφυλόκοκκοι (Lowy F.D., 2003).

Ο *S. aureus* είναι ίσως το παθογόνο που μας προβληματίζει περισσότερο. Αυτό οφείλεται στο τεράστιο γενετικό του «οπλοστάσιο» που του προσδίδει υψηλού βαθμού λοιμογονικότητα καθώς και την ικανότητα να επιβιώνει σε ολόενα και πιο εχθρικά περιβάλλοντα (Oliveira D.C. et al., 2002).

Τίποτα δεν απεικονίζει καλύτερα αυτήν την ικανότητα του *S. aureus* από την ολόενα αυξανόμενη αντοχή του. Είναι πλέον διαπιστωμένη η εμφάνιση στελεχών *S. aureus* τα οποία ανέπτυξαν μηχανισμούς αντοχής σε όλους πρακτικά τους αντιμικροβιακούς παράγοντες, και μάλιστα λίγο καιρό μετά την εισαγωγή των τελευταίων στην κλινική πράξη (Oliveira D.C. et al., 2002).

Όταν η πενικιλίνη εισήχθη στην θεραπευτική, όλα τα στελέχη *S. aureus* ήταν απολύτως ευαίσθητα σ'αυτήν και μάλιστα, πολλές από τις πρώτες επιτυχίες της θεραπείας με πενικιλίνη συνδέθηκαν με την επιτυχή αντιμετώπιση κάποιων σταφυλοκοκκικών νοσημάτων τα οποία μέχρι τότε ήταν ανίατα (Oliveira D.C. et al., 2002).

Την ίδια κιόλας χρονιά (1944) δημοσιεύτηκε η πρώτη αναφορά στελέχους *S. aureus* ανθεκτικού στην πενικιλίνη (Kirby WMM: extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant Staphylococci. *Science* 1944; 99: 452-3)

Όπως θα δούμε αναλυτικά στην συνέχεια, η αντοχή αυτή οφείλεται στην πρόσκτηση ενός πλασμιδιακού γονιδίου το οποίο κωδικοποιεί για την σύνθεση μιας β-λακταμάσης. Ήδη από τα μέσα της δεκαετίας του '50 τα στελέχη αυτά ήταν διαδεδομένα σε τέτοιο βαθμό που η πενικιλίνη έπαψε να είναι ένας αποτελεσματικός θεραπευτικός παράγων έναντι των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων (Oliveira D.C. et al., 2002).



Παρ'όλο που τα ανθεκτικά στην πενικιλίνη στελέχη *S.aureus* ήταν διαδεδομένα στα νοσοκομεία από τις αρχές της δεκαετίας του '50, τα στελέχη της κοινότητας θεωρούνταν ότι είναι πενικιλίνη-ευαίσθητα. Έτσι η πενικιλίνη εξακολουθούσε να θεωρείται ως ένας αποτελεσματικός αντισταφυλοκοκκικός παράγων μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του '70 (Chambers H.F., 2001).

Η πρώτη αναλυτική καταγραφή της αντοχής του *S.aureus* έγινε το 1969 από τους Jessen et al. στο Statens Serum Institut της Δανίας. Εκεί εξετάστηκαν πάνω από 2000 στελέχη *S.aureus* που απομονώθηκαν από αιμοκαλλιέργειες στην διάρκεια των ετών 1957 έως 1966. Όλα τα στελέχη έφεραν επαρκείς πληροφορίες για την προέλευση της λοίμωξης (νοσοκομειακή ή της κοινότητας). Στην μελέτη αυτή επιβεβαιώθηκε ο υψηλός επιπολασμός της αντοχής στην πενικιλίνη μεταξύ των νοσοκομειακών στελεχών (85-90%). Επίσης κατεγράφησαν υψηλά ποσοστά αντοχής στην στρεπτομυκίνη, στις τετρακυκλίνες και στην ερυθρομυκίνη. Ο επιπολασμός της αντοχής στην πενικιλίνη μεταξύ των στελεχών της κοινότητας βρέθηκε να είναι απροσδόκητα υψηλός (65-70%) (Chambers H.F., 2001).

Ο επόμενος σταθμός στην ιστορία της αντοχής του *S.aureus* ήταν η εμφάνιση της αντοχής στην μεθικιλίνη. Πρόκειται για ένα γεγονός με τεράστιο αντίκτυπο από κλινική και επιδημιολογική άποψη καθώς η πρόσκτηση ενός και μόνου γενετικού στοιχείου προσδίδει αντοχή στην πλέον δημοφιλή τάξη αντιβιοτικών, τις β-λακτάμες. Λόγω της εξαιρετικής σημασίας του, ο μηχανισμός αυτός αντοχής θα αναλυθεί διεξοδικά στη συνέχεια

A.8.1. Μηχανισμοί ανταλλαγής γενετικού υλικού

Τα πλασμίδια είναι συνήθη προς φυσικούς πληθυσμούς των περισσότερων ειδών του γένους. Είναι σπάνια (< 2% των στελεχών) στο είδος *S.auricularis* και σχετικά ασυνήθη στα είδη *S.schleiferi* και *S.sciuri* (<20% των στελεχών).

Τα πλασμίδια του *S.aureus* ταξινομούνται σε 3 τάξεις :

Πλασμίδια τάξεως I

Είναι μικρού μεγέθους (1-5kbp) και ανευρίσκονται σε μεγάλους αριθμούς εντός των βακτηριακών κυττάρων (10-60 /κύτταρο). Αναδιπλασιάζονται με τον μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου (rolling circle), γι'αυτό ονομάζονται ssDNA-πλασμίδια μιάς και στη διάρκεια του αναδιπλασιασμού σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο ssDNA.

Συνήθως κωδικοποιούν για την ανθεκτικότητα σε ένα μόνο αντιβιοτικό ή είναι κρυπτικά. Τα πλασμίδια αυτά είναι τα πλέον διαδεδομένα εντός του γένους *Staphylococcus*. Αποτελούνται κυρίως από «κασέτες» γενετικού υλικού ή θραύσματα DNA που δεν είναι τρικοζόνια.

Στα πλασμίδια προς τάξεως I συναντάμε :

- Ομάδα PT181

Ομάδα μικρών πλασμιδίων (4-4.6 kbp) που κωδικοποιούν για την ανθεκτικότητα στην χλωραμφαινικόλη και προς τετρακυκλίνες.

- Ομάδα PC194

Κάποια μέλη προς οικογένειας προς σχετίζονται στενά με κάποια πλασμίδια του γένους *Bacillus* και του *E.faecalis*.

- Ομάδα PSN2

Τα περισσότερα πλασμίδια προς οικογένειας προς (2-2.5 kbp) κωδικοποιούν για την ανθεκτικότητα στην Ερυθρομυκίνη και φέρουν την αλληλουχία ανασυνδυασμού (recombination site) RS_A , ενώ σπανίως είναι κρυπτικά.

Εάν εξαιρέσει κανείς την περιοχή ελέγχου του γονιδίου *ermC* που εμφανίζει μεταβλητότητα, τα πλασμίδια αυτά εμφανίζουν υψηλού βαθμού σταθερότητα.

Μέλος προς οικογένειας προς είναι και ένα γονίδιο που απαντάται φυσικώς στον *B.subtilis*.



- Ομάδα PE194

Αντιπροσωπείται από το πλασμίδιο PE194 του *S.aureus* που περιέχει ένα *ermC* γονίδιο σχεδόν ταυτόσημο με το γονίδιο *ermC* προς οικογένειας PSN2, προς η λειτουργική του οργάνωση μοιάζει με κάποια πλάσμιδια προς οικογένειας PT181.

Αρκετά όμοια πλασμίδια ανθεκτικότητας στην Ερυθρομυκίνη έχουν απομονωθεί και από μέλη του είδους *S.saprophyticus*.

Πλασμίδια τάξεως II

Έχουν μέγεθος 15-40 kbp, απαντούν σε μικρούς αριθμούς εντός των βακτηρίων

(4-6 / βακτήριο) και αναδιπλασιάζονται με τον «θ» μηχανισμό αναδιπλασιασμού.

Φέρουν ποικίλους συνδυασμούς γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και βαρέα μέταλλα, πολλά εκ των οποίων εδράζονται σε τρανσποζόνια (Tn4001, Tn4002, Tn4003, Tn4004, Tn 551, Tn552). Τα πλασμίδια τάξεως II ανευρίσκονται σε πολλά είδη του γένους, προς, σε αντίθεση με τα πλασμίδια τάξεως I, είναι πολύ σπάνια στα είδη *S.hyicus*, *S.intermedius*, *S.simulans* και *S.lugdunensis*.

Πλασμίδια τάξεως III

Έχουν μέγεθος 30-60 kbp και φέρουν μια περιοχή συζευκτικής μεταφοράς (*tra*) μεγέθους 14 kbp που συχνά φέρει παραπλεύρως απ'ευθείας επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες εισχωρήσεως IS257(900bp).

Είναι προς σε θέση να κινητοποιήσουν ή να συμμεταφέρουν μικρά συνυπάρχοντα πλασμίδια τα οποία δεν είναι σε θέση να μεταφερθούν ανεξάρτητα.

Περιλαμβάνουν τα μεγάλα συζευκτικά πλασμίδια που μεταξύ των άλλων κωδικοποιούν:

- για την ανθεκτικότητα προς αμινογλυκοσίδες μέσω των Tn4001-IS257 υβριδικών στοιχείων
- για την ανθεκτικότητα στην τριμεθοπρίμη μέσω των Tn4003
- για την ανθεκτικότητα στην πενικιλίνη μέσω των Tn 552-like στοιχείων.
- για την ανθεκτικότητα σε αντισηπτικά και απολυμαντικά (βρωμιούχο αιθίδιο, τεταρτοταγείς αμίνες κλπ) μέσω των γονιδίων *qacC*.

Πολλά από αυτά τα πλασμίδια (Psk41, Pje1, Pgo1 και Puv3626) φέρουν ενσωματωμένο ένα αντίγραφο του πλασμιδίου Pub110 (τάξεως I/aadD) ενώ κάποια



άλλα (Pgo400) φέρουν γονίδιο υψηλού βαθμού ανθεκτικότητας στην mupirocin.

Το φαινόμενο προς μεταγωγής (transduction) έχει αποδειχθεί τόσο σε εργαστηριακούς όσο και σε φυσικούς πληθυσμούς *S.aureus* και *S.epidermidis*.

Οι φάγοι που συμμετέχουν στην γενικευμένη (generalized) μεταγωγή προς *S.aureus* ανήκουν στην ορολογική ομάδα Β.

Το φαινόμενο του μετασχηματισμού (transformation) έχει περιγραφεί στον *S.aureus* NCTC 8325 από το 1972. Η ικανότητα του στελέχους αυτού προς μετασχηματισμό εξαρτάται από την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων Ca^{++} και από την παρουσία ορισμένων βακτηριοφάγων οροτύπου Β (φ11,φ14,83^A,80^a).

Στον πίνακα 6 παρατίθενται οι 3 τάξεις των σταφυλοκοκκικών πλασμιδίων (Dyke K. & Gregory P., 1997).



Πίνακας 6. Τάξεις σταφυλοκοκκικών πλασμιδίων

ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΤΑΞΕΩΣ I	ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΤΑΞΕΩΣ II	ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΤΑΞΕΩΣ III
Οικογένεια pT181	Πλασμίδια που φέρουν γονίδια	Συζευκτικά πλασμίδια
pC221	β-λακταμασών &	οικογένειας pSK41
pC223	γονίδια αντοχής σε βαρέα	pCRG1600
pNS1	μέταλλα	pGO1
pS194	pI524	pGO400
pSK2	pUB108	pJE1
pUB112	pII147	pSH8
Οικογένεια PC194	pI258	pSK41
pIP855	pI9789	pTZ20
pIP1842	pSX267	pUW3626
pSK89	pII6907	Μη ταξινομημένα
pSK108	pSK23	pIP1156
pUB110	pI836	pJ3358
pWG32	pSK57	pSAJ1
Οικογένεια PSN2	pWG50	pTZ22
pOX2000	pI1071	pWBG637
pSK3	Οικογένεια pSK 1	pWBG707
Οικογένεια PE194	pSK1	
Οικογένεια pSK639	pSK4	
pSK639	pSK7	
pSK818	pSK14	
	pSK18	
	pSK105	
	pWG53	
	Μη ταξινομημένα	
	pIP630	
	pSTE1	
	pUL5050	

A.8.2 Αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά

A.8.2.1. Αντοχή μεσολαβούμενη από β-λακταμάσες

Το 1940 ένας αστυνομικός εισήχθη στο Νοσοκομείο John Radcliffe στην Οξφόρδη για μια βαρεία κυτταρίτιδα η οποία επεκτείνεται από μία βλάβη στην γωνία του στόματος. Από την βλάβη απομονώθηκαν *S.pyogenes* και *S.aureus*.

Επειδή το στέλεχος *S.aureus* ήταν ανθεκτικό στις σουλφοναμίδες χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ένα πειραματικό παρασκεύασμα πενικιλίνης. Ο ασθενής άρχισε να ανταποκρίνεται στην θεραπεία όμως οι ρυθμοί παραγωγής του σκευάσματος ήταν πολύ βραδείς και τελικά απεβίωσε (Abraham EP, Chain E, Fletcher CM et al. Further observations on penicillin. *Lancet* 1941; ii: 641-4).

Η εμπειρία αυτή κατέδειξε τις τεράστιες δυνατότητες της πενικιλίνης και έδωσε την ώθηση για την περαιτέρω ανάπτυξή της και την ευρεία εισαγωγή της στην θεραπευτική (1944). Η αντοχή εμφανίστηκε πολύ γρήγορα. Έτσι, το 1946 περίπου 6% των στελεχών *S.aureus* παρήγαγαν πενικιλινάση (β-λακταμάση) και ήταν ανθεκτικά στην πενικιλίνη.

Μελέτες που έγιναν σε Νοσοκομεία του Λονδίνου έδειξαν μια σημαντική αύξηση στο ποσοστό των πενικιλινοσυνασσωμένων στελεχών ως τα τέλη της δεκαετίας του '40 (Barber M., Rozwadowska - Dowzencko M. Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet* 1948; ii: 641-4). Οι λόγοι αυτής της ταχείας εξάπλωσης της αντοχής δεν είναι επακριβώς γνωστοί, είναι όμως βέβαιο ότι σ'αυτήν συνετέλεσε τα μέγιστα και το γεγονός ότι το γονίδιο της πενικιλινάσης εδράζεται σε πλασμίδιο. Έτσι στην διεθνή βιβλιογραφία γίνεται λόγος για «πλασμιδιακή επιδημία» (plasmid epidemic).

Είναι επίσης γνωστός και ένας άλλος λόγος για την ραγδαία εξάπλωση που επακολούθησε: ήταν η αλόγιστη χρήση της πενικιλίνης. Η πενικιλίνη κυκλοφορούσε ελεύθερα στο εμπόριο. Ο καθένας μπορούσε να προμηθευτεί πενικιλίνη σε σκόνη και να την χρησιμοποιήσει χωρίς συνταγογράφηση.



Σε όλες ανεξαιρέτως τις πληγές χρησιμοποιούσαν σκόνη πενικιλίνης, ενώ για τις λοιμώξεις του αναπνευστικού διετίθετο και σκόνη για εισπνοές !

Έτσι, στα τέλη του 1948, πάνω από το 50% των νοσοκομειακών στελεχών *S.aureus* στις ΗΠΑ και στο Ηνωμένο Βασίλειο ήταν ανθεκτικά στην πενικιλίνη (Grundmann H. et al., 2006).

Στα τέλη της δεκαετίας του '50, ο ανθεκτικός *S.aureus* αντιπροσώπευε ένα μείζον πρόβλημα σε πολλά νοσοκομεία. Κάποια στιγμή το παγκόσμιο ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στο στέλεχος 80/81 (phage type), τον πρώτο πανδημικό κλώνο πενικιλίνη-ανθεκτικού *S.aureus* (Williams R. E. O. : Epidemic Staphylococci. *Lancet* 1959; i: 190-5). Το στέλεχος αυτό, που έγινε γνωστό και ως «σταφυλόκοκκος των νοσοκομείων», εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 1954 στην Αυστραλία και γρήγορα εξαπλώθηκε σε άλλες ηπείρους με μια ταχύτητα και μια βαρύτητα που θύμιζαν την πανδημία της γρίπης (Grundmann H. et al., 2006). Άν και ανθεκτικό μόνο στην πενικιλίνη, ήταν ιδιαίτερα λοιμογόνο καθώς προκαλούσε βαρύτερες λοιμώξεις δέρματος και τραυμάτων όχι μόνο σε ασθενείς αλλά συχνά και στο ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό.

Το 1957, το 80/81 ευθυνόταν για όλες σχεδόν τις επιδημίες στις μαιευτικές κλινικές των ΗΠΑ και για το 50% όλων των νοσοκομειακών επιδημιών στο Ηνωμένο Βασίλειο. Το 1/3 των νοσηλευόμενων ασθενών με ρινική φορεία του στελέχους ανέπτυσαν σηψαιμία (Grundmann H. et al., 2006). Το στέλεχος 80/81 άρχισε να φθίνει την δεκαετία του 1960, όταν έκανε την εμφάνισή της η μεθικιλίνη.

Σήμερα, υπάρχουν αναφορές σύμφωνα με τις οποίες το ποσοστό των στελεχών *S.aureus* που παράγουν β-λακταμάση φτάνει το 93 % (Dyke K. & Gregory P., 1997).

A.8.2.1.1. Γενετική της σύνθεσης της β-λακταμάσης

Οι β-λακταμάσες των σταφυλοκόκκων ταξινομούνται σε 4 τύπους με βάση την αλληλεπίδρασή τους με αντιορό έναντι του κεκαθαμένου ενζύμου PC1: A, B, C και D. Στα περισσότερα λακταμασοπαραγωγά στελέχη η σύνθεση του ενζύμου είναι επαγωγίμη (inducible) ενώ η σύνθεση των ενζύμων τύπου D είναι σε κάποια στελέχη σταθερή (constitutive) και σε κάποια άλλα επαγωγίμη.

Σε κάποιες πρώιμες μελέτες του συστήματος επαγωγής ταυτοποιήθηκαν το δομικό γονίδιο blaZ και τα ρυθμιστικά γονίδια blaI, blaR1 και blaR2. Τα γονίδια blaZ, blaI και blaR1 συχνά ανευρίσκονται σε μεγάλα πλασμίδια ενώ το blaR2 είναι πάντοτε χρωμοσωμικό. Το blaZ μπορεί να ανευρεθεί σε διάφορες θέσεις του χρωμοσώματος διότι υπάρχουν ενδείξεις για την ύπαρξη τρανσποζονίων τα οποία περιέχουν το blaZ αλλά δεν έχουν ειδικές θέσεις εισχώρησης στο χρωμόσωμα. Το blaZ βρέθηκε στο χρωμόσωμα του *S.aureus PS80* (NCTC9789) και διαπιστώθηκε ότι μπορούσε να μεταφερθεί σε πλασμίδιο (Dyke K. & Gregory P., 1997).

Έκτοτε (1969), έχουν περιγραφεί πολλά τρανσποζόνια που περιέχουν το blaZ γονίδιο:

- Tn552 (6545 bp)
- Tn4002 (6.7 kb)
- Tn3852 (7.3 kb)
- Tn4201 (6.6 kb)

Τα τρανσποζόνια αυτά εμφανίζουν μεγάλες ομοιότητες μεταξύ τους και πιθανώς έχουν κοινή προέλευση. Απεδείχθη ότι τα τρανσποζόνια αυτά είναι «ενεργά», με την έννοια ότι τόσο το Tn4201 όσο και το Tn3852 μπορούν να «αντιμετατεθούν» (translocation).

Η πλήρης αλληλουχία του Tn552 έχει ήδη ταυτοποιηθεί, γεγονός που απετέλεσε σημαντική πρόοδο στην κατανόησή μας πάνω στα τρανσποζόνια και πάνω στην ρύθμιση της σύνθεσης β-λακταμάσης. Υπάρχουν τελικές ανεστραμμένες επαναλήψεις (inverted repeats) μήκους περίπου 120 bp ενώ εμπεριέχονται 6 αναγνωστικά πλαίσια :

- *orf480* (τρανσποζάση)
- *orf271* (επικουρική τρανσποζάση)
- BinL (ρεκομπινάση)
- blaZ (β-λακταμάση)



- blaI (καταστολέας /repressor)
Συνδέεται ειδικά με τον operator του blaZ
- blaR1 (μεταγωγέας σήματος/signal ή sensor transducer)

Η σειρά των γονιδίων(5' → 3') στο βακτηριακό χρωμόσωμα είναι :

blaI → blaR1 → blaZ

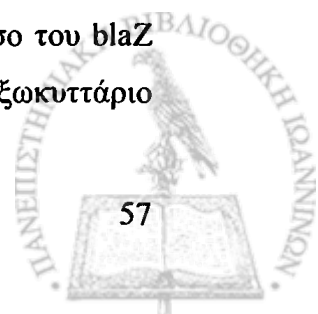
Τα blaI και blaR1 βρίσκονται σε διαφορετικό κλώνο(strand) DNA σε σχέση με αυτό. Επομένως, μεταγράφονται προς αντίθετες κατευθύνσεις (Berger-Bachi B. & Rohrer S., 2002).

A.8.2.1.2. Μοντέλο για την επαγωγή (induction)

Η πρωτεΐνη BlaR1 είναι μια πρωτεΐνη που εκτείνεται καθ'όλο το μήκος της μεμβράνης του βακτηρίου και φέρει ένα εξωκυττάριο πεδίο(domain)που συνδέεται με το β-λακταμικό αντιβιοτικό και ένα κυτταροπλασματικό πεδίο μεταλλοπρωτεάσης που εμπλέκεται στην μεταγωγή του σήματος (Hackbarth C. & Chambers H., 1993; Berger-Bachi B. & Rohrer S, 2002).

Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, όταν το β-λακταμικό αντιβιοτικό (επαγωγέας) συνδέεται με το C-τελικό άκρο της BlaR1 (εξωκυττάριο πεδίο), παρατηρείται μία άμεση ή έμμεση μεταβίβαση /μεταγωγή ενός σήματος προς την BlaI πρωτεΐνη. Η φύση του σήματος αυτού δεν είναι γνωστή, όπως επίσης δεν είναι γνωστό εάν η BlaI τροποποιείται ομοιοπολικά ή τροποποιείται με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις (Dyke K. & Gregory P., 1997).

Σύμφωνα με κάποια νεώτερα δεδομένα (Zhang H. et al., 2001), το σήμα μεταδίδεται μέσω μιας ειδικής ως προς τη θέση (site specific) πρωτεολυτικής διάσπασης τόσο του μεταγωγέα, ο οποίος αυτοενεργοποιείται, όσο και του καταστολέα, ο οποίος αδρανοποιείται. Αποτέλεσμα της μεταβίβασης του σήματος αυτού είναι ότι η BlaI δεν συνδέεται πλέον την περιοχή του χειριστή (operator), γεγονός που συνεπάγεται την αυξημένη μεταγραφή των blaZ και blaR1/blaI. Όπως θα δούμε και στην συνέχεια, οι BlaI και MecI μπορούν να αναγνωρίσουν τις ρυθμιστικές περιοχές και των δύο συστημάτων (mec και bla),και επομένως αναστέλλουν την μεταγραφή τόσο του blaZ όσο και του mecA. Έτσι η σύνδεση ενός επαγωγέα (αντιβιοτικού) στο εξωκυττάριο



πεδίο της MecR1 επιφέρει τις ίδιες μεταβολές και στο σύστημα *mecA-mecR1-mecI* (Berger-Bachi B. & Rohrer S., 2002).

Η αυξημένη μεταγραφή των ανωτέρω γονιδίων σημαίνει αυξημένη παραγωγή β-λακταμάσης και ρυθμιστικών πρωτεϊνών (Hackbarth C. & Chambers H., 1993).

Αξίζει να σημειωθεί εδώ, ότι ενώ οι BlaI και MecI μπορούν να αναγνωρίσουν τις ρυθμιστικές περιοχές αμφοτέρων των συστημάτων, η διάσπασή τους από τις blaR1 και MecR1 αντίστοιχα είναι ειδική (Berger-Bachi B. & Rohrer S., 2002). Οι ποιοτικές διαφορές μεταξύ των συστημάτων blaZ/ blaR1/blaI και mecA/mecR1/mecI έχουν επιπτώσεις πάνω στην έκφραση της αντοχής (Berger-Bachi B. & Rohrer S., 2002).

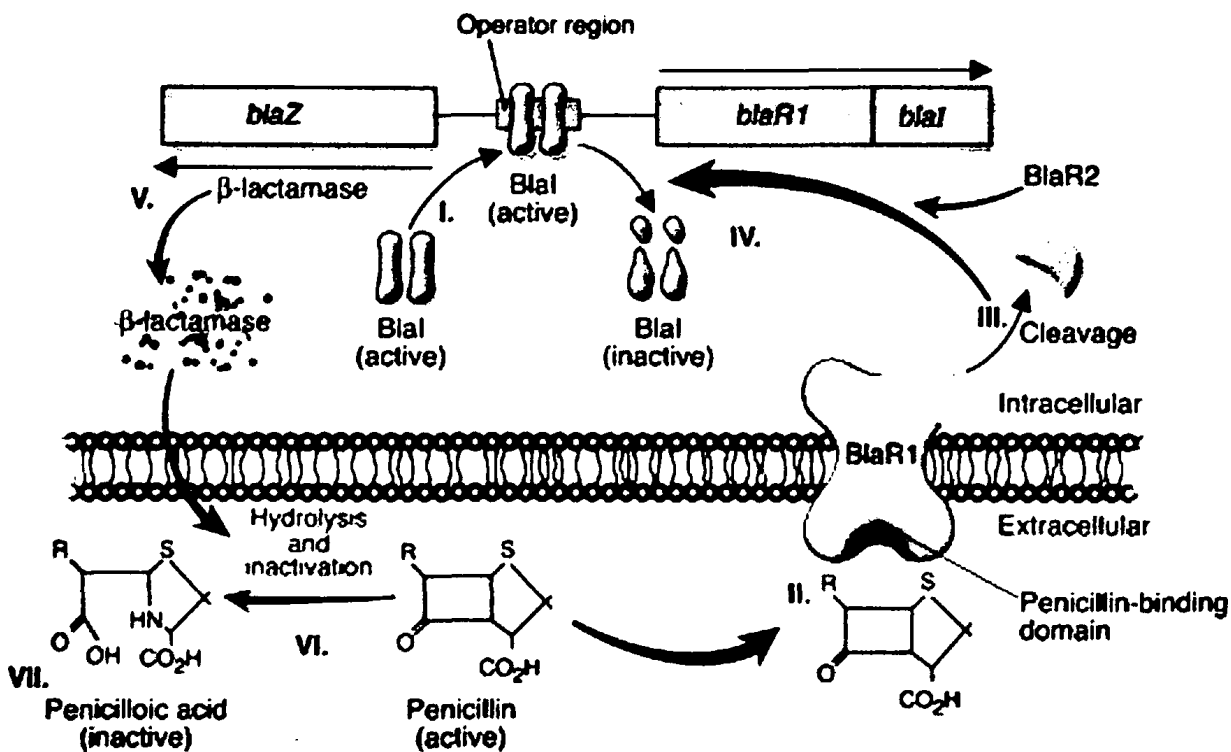
Η κινητική της επαγωγής του συστήματος mecR1/mecI είναι πολύ βραδύτερη από την κινητική του συστήματος blaR1/blaI. Η MecR1, παρότι επάγεται από την κεφοξιδίνη, δεν είναι στην πραγματικότητα αρκούντως ευαίσθητη στην μεθικιλίνη /οξακιλλίνη. Αυτό σημαίνει ότι η επαγωγή (induction) της παραγωγής PBP2'είναι εξαιρετικά βραδεία (Berger-Bachi B. & Rohrer S., 2002). Πράγματι, στα στελέχη εκείνα που φέρουν ανέπαφη την ρυθμιστική περιοχή mecR1/mecI,όπως είναι για παράδειγμα τα λεγόμενα pre-MRSA στελέχη, το mecA είναι ισχυρώς κατεσταλμένο. Αποτέλεσμα είναι τα στελέχη αυτά να επιδεικνύουν χαμηλά επίπεδα αντοχής (Berger-Bachi B. & Rohrer S., 2002).

Στο σχήμα 1 απεικονίζεται το bla οπερόνιο (Zhang H. et al., 2001)

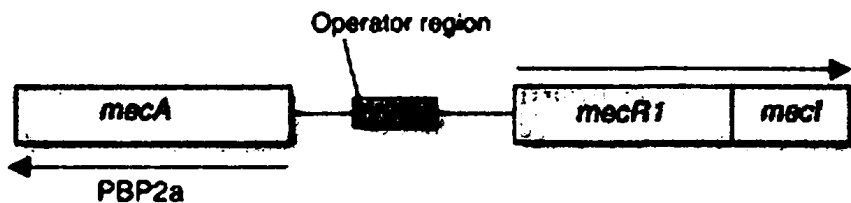


Σχήμα 1. Το bla οπερόνιο

a



b



A.8.2.2. Αντοχή μη μεσολαβούμενη από β-λακταμάσες (Αντοχή στην μεθικιλίνη)

Τα πρώτα χρόνια της δεκαετίας του '60 είχαμε την σύνθεση νέων αντιβιοτικών, τα περισσότερα εκ των οποίων στρέφονταν έναντι του *S.aureus*.

Οι πρώτες κεφαλοσπορίνες-κεφαλοθίνη και κεφαλοριδίνη-ανεπτύχθησαν κυρίως για την σταθερότητά τους έναντι της σταφυλοκοκκικής πενικιλινάσης, όμως σύντομα «παρακάμφθηκαν» όταν βρέθηκε ο τρόπος να υποκατασταθεί η 6 φαινυλ-ακετυλομάδα από άλλες ακυλομάδες. Η ανακάλυψη αυτή υπήρξε η αφετηρία της συνθετικής οδού για την σύνθεση της μεθικιλίνης, της ναφκιλίνης και της οξακιλίνης. Οι ενώσεις αυτές φέρουν ογκώδεις δ'ακυλομάδες που παρεμποδίζουν την διάσπαση του λακταμικού δακτυλίου, παρατείνοντας έτσι την δράση τους.

Επειδή οι σταφυλόκοκκοι εκκρίνουν την β-λακταμάση τους εξωκυτταρίως, προστατεύοντας έτσι ολόκληρο τον βακτηριακό πληθυσμό, υπήρξε μικρή ή και καθόλου επιλογή στελεχών που παρήγαγον ισχυρότερες β-λακταμάσες (Livermore D., 2000). Αυτό έρχεται σε πλήρη αντίθεση με τα Gram(-) βακτήρια όπου, λόγω της παραμονής της β-λακταμάσης στον περιπλασματικό χώρο, επελέγησαν στελέχη (variant strains) τα οποία παρήγαγαν περισσότερες ή ισχυρότερες β-λακταμάσες (Livermore D., 2000).

Εκτός από την ανάπτυξη των πενικιλινασοάντοχων β-λακταμικών αντιβιοτικών, τα πρώτα χρόνια της δεκαετίας του '60 είχαμε και την εισαγωγή της γενταμικίνης, η οποία εμφάνιζε καλύτερη αντισταφυλοκοκκική δράση και λιγότερη τοξικότητα σε σχέση με τις παλαιότερες αμινογλυκοσίδες. Όμως, παρά τις σημαντικές αυτές επιτυχίες, η εμφάνιση του πρώτου ανθεκτικού στην μεθικιλίνη στελέχους δεν άργησε καθόλου και κυριολεκτικά συνέπεσε με την άφιξη των σκευασμάτων στο εμπόριο (Jevons MP: Calbenin- resistant *staphylococci* (1961) *British Medical Journal*; I : 124-125).

Είναι γνωστό ότι ο κύριος στόχος των β-λακταμικών αντιβιοτικών είναι οι πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs), ένζυμα κείμενα επί της κυτταροπλασματικής μεμβράνης με δράση γλυκοσυλτρανσφεράσης, τρανσπεπτιδάσης, D,D-καρβοξυπεπτιδάσης και ενδοπεπτιδάσης (Russel A.D. & Chopra I., 1996)



Οι σημαντικότερες δράσεις των PBP's είναι οι ακόλουθες :

- i. Η αντίδραση τρανσγλυκοσυλίωσης (transglycosylation), δηλαδή ο πολυμερισμός των μονομερών γλυκάνης (δισακχαριτών GlcNAc-MurNAc) σε αλυσίδες γλυκάνης. Πρέπει να σημειωθεί ότι η δράση τρανσγλυκοσυλάσης δεν αναστέλλεται από τα β-λακταμικά αντιβιοτικά.
- ii. Η αντίδραση τρανσπεπτιδίωσης (transpeptidation), δηλαδή η χιαστή σύνδεση (crosslinking) των πλευρικών πενταπεπτιδικών γεφυρών με γέφυρες πενταγλυκίνης (Russel A.D. & Chopra I., 1996).

Αναλυτικότερα, στο στάδιο αυτό η PBP αναγνωρίζει τα διπεπτίδια D-ala-D-ala της πλευρικής πενταπεπτιδικής αλυσίδας των μονομερών πεπτιδογλυκάνης, διασπά τον τελευταίο δεσμό ανάμεσα στα δύο μόρια ala και συνδέει την προτελευταία D-ala στην κορυφή των γεφυρών πενταγλυκίνης που προεξέχουν από τα προϋπάρχοντα στρώματα γλυκάνης (Hiramatsu K., 2001). Ένα 20% των διπεπτιδίων D-ala-D-ala (6×10^6 /κύτταρο) δεν υφίστανται καμία τροποποίηση από τις PBP (Hiramatsu K., 2001).

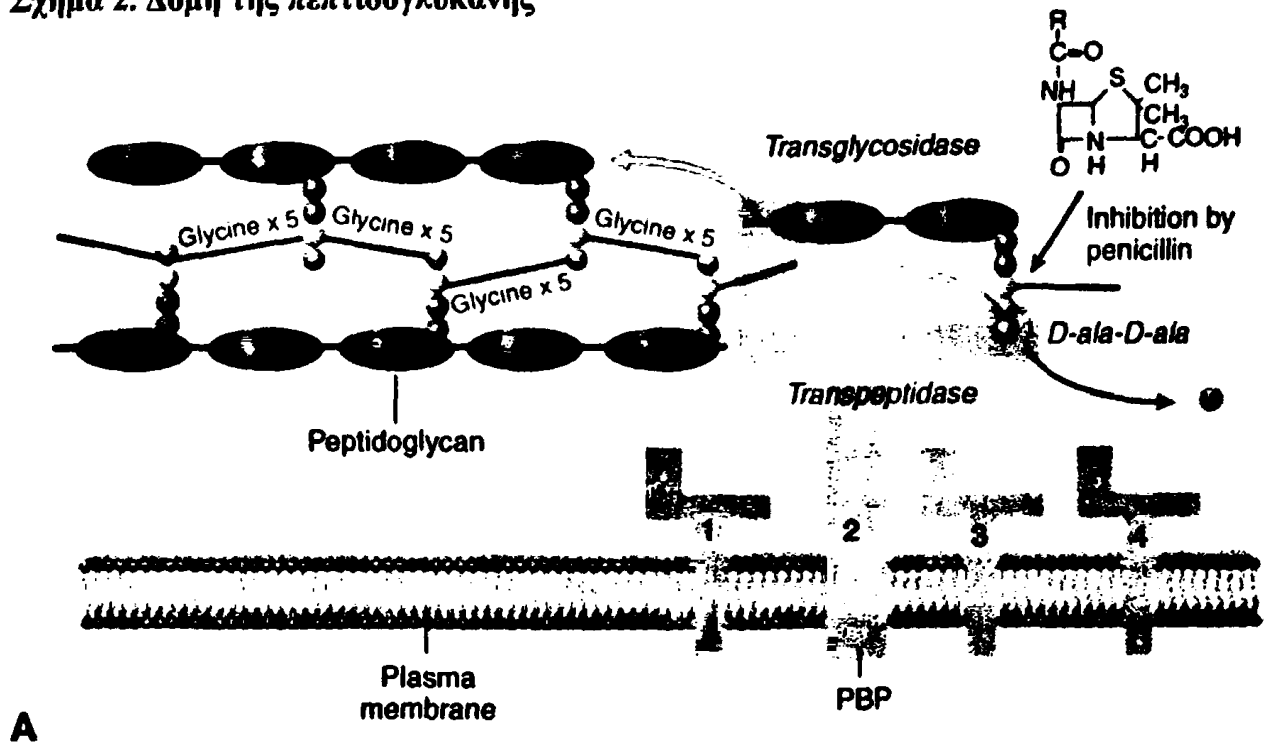
Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά αποτελούν δομικά ανάλογα του διπεπτιδίου D-ala-D-ala της πλευρικής πενταπεπτιδικής αλυσίδας που αποτελεί το φυσιολογικό υπόστρωμα των PBP's. Κατά συνέπεια, β-λακτάμες και διπεπτίδια ανταγωνίζονται για σύνδεση με τις PBP's (7; Hiramatsu K., 2001).

Τόσο τα ευαίσθητα όσο και τα ανθεκτικά στελέχη *S.aureus* παράγουν 4 κύρια είδη PBP's, PBP's 1, 2, 3 και 4, με μοριακές μάζες 85, 81, 75 και 45 kDa αντίστοιχα. Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά εμφανίζουν υψηλή χημική συγγένεια προς τις PBP's 1, 2 και 3, με αποτέλεσμα να συνδέονται ομοιοπολικά. Η σύνδεση β-λακταμικών αντιβιοτικών και PBP's αποβαίνει θανατηφόρος για το βακτήριο. Τα ανθεκτικά στην μεθικιλίνη στελέχη οφείλουν την ανθεκτικότητά τους στην παραγωγή μιάς επιπλέον PBP, της PBP2a ή PBP2'.

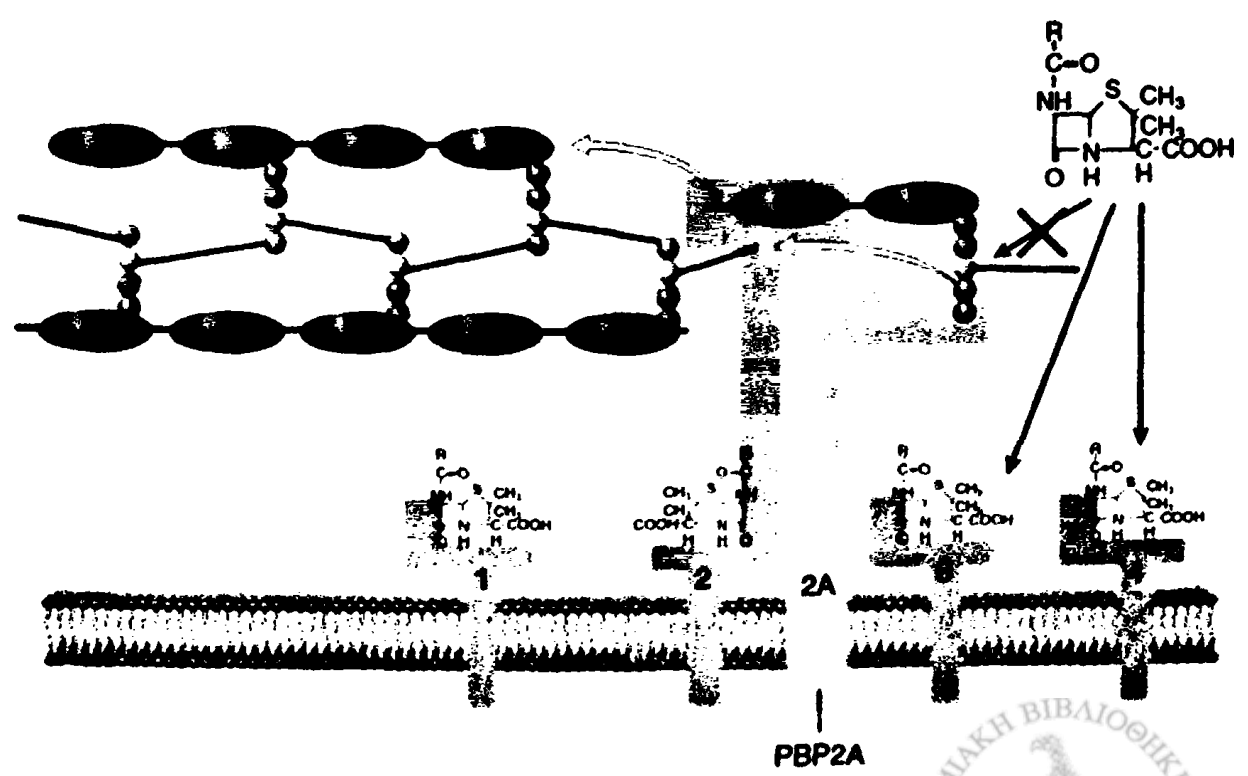
Η PBP2a, λόγω χαμηλής χημικής συγγένειας με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά μπορεί να υποκαταστήσει τις φυσιολογικές PBP's και αναλαμβάνει την σύνθεση πεπτιδογλυκάνης σε συγκεντρώσεις β-λακταμικού αντιβιοτικού οι οποίες άλλως θα ήταν θανατηφόρες (Chambers H., 1997). Η σύνθεση PBP2a από ένα στέλεχος σταφυλοκόκκου προσδίδει στο στέλεχος αυτό ανοχή σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

Στο σχήμα 2 απεικονίζεται η δομή της πεπτιδογλυκάνης καθώς και ο μηχανισμός δράσης των PBP's (Moreillon P. et al., 2005).

Σχήμα 2. Δομή της πεπτιδογλυκάνης



A



B



Το mec οπερόνιο

Ένα επιπρόσθετο τμήμα χρωμοσωμικού DNA, το οποίο δεν ανευρίσκεται σε ευαίσθητα στελέχη σταφυλοκόκκων, ευθύνεται για την σύνθεση της PBP2a (Chambers H., 1997; Brakstad O. & Måland J., 1997). Το επιπρόσθετο αυτό στοιχείο ονομάζεται mec οπερόνιο, έχει μήκος 30 – 50 kb και περιλαμβάνει :

- το δομικό γονίδιο για την PBP2a(*mecA*).
- τα λειτουργικά γονίδια *mecI* και *mecR1* που ρυθμίζουν την μεταγραφή του *mecA*. Το *mecI* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη-καταστολέα (repressor), ενώ το *mecR1* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη-μεταγωγέα σήματος (signal transducer). Το *mecI* μπορεί να καταστείλει την μεταγραφή του *mecA* αλλά και του *blaZ* (Berger-Bachi B. & Rohrer S., 2002).
- 20 έως 40 kb *mec*- συνδεδεμένου DNA (*mec*-associated DNA).

Η σειρά των ανωτέρω γονιδίων (5' → 3') στο βακτηριακό χρωμόσωμα είναι η ακόλουθη : *mecI* → *mecR1* → *mecA*

Το *mecA* βρίσκεται σε διαφορετικό κλώνο DNA σε σχέση με τα *mecI/ mecR1* και επομένως μεταγράφεται με αντίθετη κατεύθυνση (Hiramatsu K. et al., 2001; Berger-Bachi B. & Rohrer S., 2002).

Όπως θα δούμε αναλυτικά στη συνέχεια, το mec οπερόνιο εντάσσεται πλέον εντός μιας «γονιδιακής νησίδας» (GI) που ονομάζεται SCC_{mec} (Staphylococcal cassette chromosome mec).

Βασική δομή του γονιδιώματος του *S.aureus*

Η πλήρης χαρτογράφηση (genome sequencing) του γονιδιώματος του *S.aureus* έγινε σχετικά πρόσφατα (Kuroda et al., 2001; Baba et al., 2002). Έτσι, γνωρίζουμε πλέον ότι το χρωμόσωμα του *S.aureus* αποτελείται από 2 κατηγορίες DNA :

- γενετικό background, προερχόμενο από κάποιο κοινό προγονικό βακτήριο (κάθετη μετάδοση /vertical transmission) το οποίο στην συνέχεια αποσχίστηκε στα γένη *Bacillus* spp και *Staphylococcus* spp (Ito T. et al., 2003).
- γονιδιακές νησίδες (GI /Genomic islands)οι οποίες προήλθαν από άλλα είδη με οριζόντια μεταφορά (horizontal/lateral transfer).

Έχουν εντοπισθεί 8 γονιδιακές νησίδες, εκ των οποίων οι 7 αφορούν γονίδια λοιμογονικότητας (virulence) και μόνο μία φέρει γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά. Πρόκειται για την νησίδα SCCmec (Staphylococcal cassette chromosome mec).

Γονιδιακή νησίδα SCCmec

(Staphylococcal cassette chromosome mec)

Οι μεθικιλίνη-ανθεκτικοί σταφυλόκοκκοι προέκυψαν όταν ενσωμάτωσαν στο χρωμόσωμά τους την γονιδιακή νησίδα SCCmec (Ito T. et al., 2004). Η νησίδα αυτή ανευρίσκεται σε μια συγκεκριμένη θέση (attBsc), εντός μιας περιοχής με άγνωστη λειτουργία (orfX). Η θέση αυτή βρίσκεται πολύ κοντά στην θέση έναρξης του αναδιπλασιασμού (origin of replication /oriT), μεταξύ των γονιδίων *sra* και *purA* (Hiramatsu K. et al., 2001; Hiramatsu K. et al., 2002; Ito T. et al., 2003).

Η ενσωμάτωση της SCCmec κοντά στην oriT ίσως έχει στρατηγική σημασία καθ' ότι επιτρέπει στο βακτήριο να αποκτήσει γρήγορα κάποια χρήσιμα γονίδια ανθεκτικότητας προερχόμενα από άλλα γένη βακτηρίων. Ευρισκόμενα κοντά στην oriT, τα γονίδια αυτά έχουν αυξημένες πιθανότητες να περάσουν σε πολλαπλά αντίτυπα στα θυγατρικά κύτταρα, αντισταθμίζοντας έτσι, μερικώς τουλάχιστον, την ανεπαρκή μεταγραφή τους (Hiramatsu K. et al., 2001; Ito T. et al., 2003).

Η SCCmec διαφέρει από όλα τα άλλα γνωστά κινητά γενετικά στοιχεία (mobile genetic elements) όπως οι βακτηριοφάγοι, τα τρανσποζόνια, τα συζευκτικά τρανσποζόνια και τα ενσωματωμένα πλασμίδια αφού δεν φέρει γονίδια σχετιζόμενα με φάγους ούτε ειδικές τρανσποζάσες ούτε γονίδια *tra* (Hiramatsu K. et al., 2001; Hiramatsu K. et al., 2002). Για την μετακίνησή της φέρει 2 ειδικά γονίδια που κωδικοποιούν για τις ρεκομπινάσες A και B (*ccrA* και *ccrB*). Η έκφραση αμφοτέρων των πρωτεϊνών αυτών προάγει την ειδική ως προς την θέση (site specific) ενσωμάτωση της SCCmec στη θέση attBsc (Ito T. et al., 2003). Με άλλα λόγια, παρουσία των ενζύμων αυτών η SCCmec ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα με τον σωστό προσανατολισμό, όπως επίσης αποσπάται με ακρίβεια από αυτό (Hiramatsu K. et al., 2001). Τα άκρα της SCCmec φέρουν άμεσες και ανεστραμμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (direct & inverted repeat sequences). Η μία εξ αυτών των αλληλουχιών βρίσκεται εντός του χρωμοσώματος και η άλλη εντός της SCCmec (Ito T. et al., 2003).



Η SCCmec αποτελείται από 2 βασικά γενετικά συστατικά :

- το γονιδιακό σύμπλεγμα mec το οποίο περιλαμβάνει το δομικό γονίδιο mecA και τα ρυθμιστικά γονίδια mecI και mecR1. Τα ρυθμιστικά γονίδια μπορούν να είναι είτε ακέραια είτε «ακρωτηριασμένα».
- Το γονιδιακό σύμπλεγμα ccr.

Πέραν των 2 αυτών βασικών συμπλεγμάτων, η SCCmec περιέχει και μια ποικιλία ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων (orf) τα οποία διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων SCCmec. Οι περιοχές αυτές ονομάζονται J- περιοχές (junk-yard) επειδή πολλά orf είναι κατά τα φαινόμενα ψευδογονίδια ή έχουν κάποια άγνωστη χρησιμότητα για τον ξενιστή.

Υπάρχουν 4 τάξεις συμπλεγμάτων mec

- ΤΑΞΗ Α

Πρόκειται για την αρχική τάξη η οποία περιλαμβάνει κατά σειρά (5' → 3') τα γονίδια mecI και mecR1 ακέραια, το mecA και την αλληλουχία εισχωρήσεως IS 431.

Το γονίδιο mecR1 «χωρίζεται» από το mecA με τον προαγωγέα (promoter) και τον χειριστή (operator) του τελευταίου.

Κάποια από τα συμπλέγματα τάξεως Α φέρουν την αλληλουχία IS 431 και στα δύο άκρα τους.

- ΤΑΞΗ Β

Στα συμπλέγματα της τάξεως αυτής βρίσκουμε κατά σειρά μια «ακρωτηριασμένη» IS 1272, ένα «ακρωτηριασμένο» mecR1 (μόνο το 5' άκρο του), το mecA και την IS 431.

Το mecI έχει απαλειφθεί εντελώς (deletion) ενώ η IS 1272 καταλαμβάνει την θέση του mecI και μέρους του mecR1 (Hiramatsu K. et al., 2002)

- ΤΑΞΗ C

Εδώ βρίσκουμε κατά σειρά την IS 431, ένα ακρωτηριασμένο mecR1 (ΔmecR1), το mecA και ξανά στο 3' άκρο την IS 431.

- ΤΑΞΗ D

Εδώ συναντάμε κατά σειρά ένα ακρωτηριασμένο mecR1, το mecA και την IS 431.

Στο είδος *S.aureus* ανευρίσκονται μόνο οι τάξεις A και B, τα συμπλέγματα τάξεως C κατανέμονται κυρίως στο είδος *S.haemolyticus* ενώ το σύμπλεγμα τάξεως D έχει βρεθεί μόνο στο είδος *S.hominis* (Hiramatsu K. et al., 2001). Στο 5' άκρο του συμπλέγματος *mec* βρίσκουμε το γονιδιακό σύμπλεγμα *ccr* (*ccr* gene complex), το οποίο περιέχει τα γονίδια *ccrA* και *ccrB*.

Έχουν βρεθεί 4 αλλότυποι για καθένα από τα γονίδια : *ccrA1/ccrA2/ccrA3/ccrA4* και *ccrB1/ccrB2/ccrB3/ccrB4* (Ito T. et al., 2004). Εξ αυτών των τεσσάρων αλλοτύπων φαίνεται πως μόνο τα γονίδια *ccrA* και *ccrB* τύπου 2 είναι λειτουργικώς ακέραια: όταν τα γονίδια αυτά κλωνοποιήθηκαν και εισήχθησαν στο στέλεχος N315 παρατηρήθηκε μια ακριβής απόσχιση τις SCC*mec* από το χρωμόσωμα. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκαν γονίδια *ccrA* και *ccrB* τύπου 1 ή 3, η απόσχιση δεν ήταν ακριβής. Πιθανώς τα γονίδια αυτά υπέστησαν κάποιες μεταλλάξεις οι οποίες κατήργησαν την λειτουργία τους ως ρεκομπινασών.

Αλλότυποι SCC*mec*

Οι νησίδες SCC*mec* ταξινομούνται σε αλλότυπους με βάση τον συνδυασμό τάξεως του συμπλέγματος *mec* και τύπου του συμπλέγματος *ccr*.

Περιγράφονται 5 αλλότυποι SCC*mec* :

ΤΥΠΟΣ I

Έχει μέγεθος 34.3 kb. Φέρει *mec* σύμπλεγμα τάξεως B και σύμπλεγμα *ccr* τύπου 1 (*ccrA1* και *ccrB1*) (Hiramatsu K. et al., 2001). Πέραν του *mecA* γονιδίου δεν φέρει άλλα γονίδια αντοχής.

ΤΥΠΟΣ II

Έχει μέγεθος 53 kb (Deurenberg R.H. et al., 2007). Φέρει *mec* σύμπλεγμα τάξεως A και σύμπλεγμα *ccr* τύπου 2 (*ccrA2* και *ccrB2*) (Hiramatsu K. et al., 2001). Στα στοιχεία αυτού του τύπου ανευρίσκονται πολλά γονίδια αντοχής που εδράζονται σε τρανσποζόνια (Tn554) ή πλασμίδια (*pUB110*, *pI258*, *pT181*) ενσωματωμένα εντός του SCC*mec* (Deurenberg R.H. et al., 2007).

Το πλασμίδιο *pUB110* φέρει το γονίδιο *ant(4')*, υπεύθυνο για την αντοχή στην καναμυκίνη, τομπραμυκίνη και μπλεομυκίνη.



Το πλασμίδιο pI258 κωδικοποιεί για την αντοχή στις πενικιλίνες και στα βαρέα μέταλλα.

Το πλασμίδιο pT181 κωδικοποιεί για την αντοχή στις τετρακυκλίνες.

Το τρανσποζόνιο Tn554 φέρει το γονίδιο *emA*, υπεύθυνο για την επαγωγίμη αντοχή στις μακρολίδες, λινκοσαμίδες και στρεπτογραμίνες (Deurenberg R.H. et al., 2007).

Συχνά, το γονίδιο *mecI* φέρει μεταλλάξεις εκτός από κάποια στελέχη που είναι ευαίσθητα στην μεθικιλίνη.

Τα στελέχη που φέρουν το *mec* σύμπλεγμα τάξεως A και είναι ευαίσθητα στην μεθικιλίνη χαρακτηρίζονται ως *pre-MRSA* /*pre-MRSA*. Το στέλεχος N315 αποτελεί το αρχετυπικό *pre-MRSA* στέλεχος (Hiramatsu K. et al., 2002).

Ως γνωστόν, το *mecI* κωδικοποιεί για έναν ισχυρό καταστολέα τις μεταγραφής του *mecA*. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η αδρανοποίηση του *mecI* με μεταλλαξιογένεση αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο πρόσκτησης αντοχής και ίσως αντιπροσωπεύει ένα απαραίτητο βήμα στην ανάπτυξη αντοχής (Hiramatsu K. et al., 2002).

ΤΥΠΟΣ III

Έχει μέγεθος 66.9 kb. Φέρει *mec* σύμπλεγμα τάξεως A και σύμπλεγμα *ccr* τύπου 3 (*ccrA3* και *ccrB3*) (Hiramatsu K. et al., 2001 ; Deurenberg R.H. et al., 2007).

ΤΥΠΟΣ IV

Διακρίνουμε εδώ 7 υποκατηγορίες, τις IVa, IVb, IVc, IVd, IVe, IVf και IVg (Deurenberg R.H. et al., 2007). Και οι τρεις αποτελούνται από ένα *mec* σύμπλεγμα τάξεως B και σύμπλεγμα *ccr* τύπου 4 (*ccrA4* και *ccrB4*) (Deurenberg R.H. et al., 2007).

Οι τύποι IVa και IVb δεν φέρουν κανένα γονίδιο αντοχής πέραν του *mecA*.

ΤΥΠΟΣ V

Πρόκειται για έναν αλλότυπο που αναγνωρίστηκε πρόσφατα σε ένα στέλεχος MRSA της κοινότητας που απομονώθηκε στην Αυστραλία (στέλεχος WIS/WBG8318).

Ο αλλότυπος αυτός φέρει τον συνδυασμό του *mec* συμπλέγματος τάξεως C2 με ένα νέο σύμπλεγμα *ccr* το οποίο χαρακτηρίστηκε ως *ccrC* (Ito T. et al., 2004; Deurenberg R.H. et al., 2007). Το μέγεθός του (28kb) είναι παρόμοιο με αυτό του αλλότυπου IV και το μοναδικό γονίδιο αντοχής που φέρει είναι το *mecA*.

Πίνακας 7.

Ταξινόμηση των διαφόρων τύπων SCCmec ανάλογα με την γεωγραφική κατανομή τους (Ito T. et al., 2004; Deurenberg R.H. et al., 2007)

ΤΥΠΟΣ	Έτος Εντόπισης	Αντιπροσωπευτικά στελέχη	Γεωγραφική κατανομή ¹	Πηγή ²
I	1961	NCTC 10442 (Μ.Βρετανία)	Παγκόσμια (B) ³	ΝΟΣ
II	1982	N315 (Pre-MRSA) Mu50 82/20-1 93/H44	Ιαπωνία Κορέα ΗΠΑ	ΝΟΣ
III	1984 1985	85/3907 (Γερμανία) 82/2082 (Ν.Ζηλανδία)	Παγκόσμια (B)	ΝΟΣ
IV	Δεκαετία '90 ⁴	MW2 (IVa)(USA 400) CA05 (IVa) JCSC1968 8/6-3P (IVb) JCSC1978 81/108 (IVc) Ιαπωνία	Παγκόσμια (Π) ⁵	ΚΟΙΝ
V	2004	WIS (WBG8318) Αυστραλία NORSA 1(81/0342) NORSA 2	Παγκόσμια	ΚΟΙΝ

¹ Σχετική κατανομή κάθε τύπου σε στελέχη που απομονώθηκαν από 23 χώρες.

² Σχετική επίπτωση σε Νοσοκομεία ή στην κοινότητα.

³ B σημαίνει «Βρετανική κατανομή», με την έννοια ότι έχει εντοπιστεί σε χώρες με στενές γεωγραφικές ή ιστορικές σχέσεις με την Μ.Βρετανία (Ευρώπη, Ν.Αφρική, Αυστραλία, Ν.Ζηλανδία, Ινδία, Hong Kong κλπ)

⁴ Μια αναδρομική μελέτη είναι σε εξέλιξη

⁵ Π σημαίνει παγκόσμια κατανομή. Μέχρι στιγμής ο τύπος αυτός έχει βρεθεί σε ΗΠΑ, Γαλλία, Αυστραλία και Ιαπωνία.



Η έκφραση της αντοχής στην μεθικιλίνη

Όπως έχουμε ήδη περιγράψει, η απόκτηση του συμπλέγματος *mec*, αποτελεί το πρώτο «γενετικό συμβάν» (genetic event) προκειμένου ένα στέλεχος *S.aureus* να καταστεί ανθεκτικό στις β-λακτάμες.

Σύμφωνα με τις πλέον κρατούσες απόψεις πάνω στην μοριακή εξέλιξη των MRSA, τα πλέον «αρχέγονα» στελέχη MRSA απέκτησαν *en bloc* τα γονίδια *mecA*, *mecI* και *mecR1* από κάποιο άγνωστο στέλεχος-δότη διαφορετικού είδους ή γένους (Hiramatsu K., 1995; Niemeier D. et al., 1996).

Τα παίνε αυτά στελέχη, αν και φέρουν το *mec* οπερόνιο, εμφανίζονται ως ευαίσθητα στην μεθικιλίνη (Berger-Bächli B., 1997; Hiramatsu K. et al., 2001; Kuwahara-Arai K. et al., 1996), δηλαδή εμφανίζουν MIC μικρότερες από τα κριτήρια της NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Οι μεθικιλίνη-ανθεκτικοί κλώνοι (subclones) που παράγουν τα στελέχη αυτά εμφανίζονται με πολύ χαμηλή συχνότητα, της τάξεως του $1:10^4$ - 10^5 (Hiramatsu K. et al., 2001; Kuwahara-Arai K. et al., 1996). Για τα στελέχη αυτά προτάθηκε ο όρος pre-MRSA και έχουν ως κύριο αντιπρόσωπο το στέλεχος N315.

Σήμερα, τα στελέχη αυτά εντάσσονται στον αλλότυπο II-A και πολύ σπάνια ανευρίσκονται πλέον σε κλινικά δείγματα. Ο αλλότυπος II-A φέρει *mec*-σύμπλεγμα τάξεως A. Στο σύμπλεγμα αυτό τα ρυθμιστικά γονίδια *mecI* και *mecR1* είναι ακέραια και πλήρως λειτουργικά. Όντας ακέραια και λειτουργικά, τα γονίδια αυτά καταστέλλουν ισχυρώς την μεταγραφή του *mecA*. Η ισχυρή αυτή καταστολή δεν αίρεται με την απομάκρυνση του πλασμιδίου που φέρει τα *bla* ρυθμιστικά γονίδια (Hiramatsu K. et al., 2001).

Τα στελέχη αυτά παράγουν PBP2a μόνο κατόπιν επαγωγής (Berger-Bächli B., 1997; Chambers H., 1997). Όμως, σε αντίθεση με το *bla* ρυθμιστικό σύστημα, το *mec*-ρυθμιστικό σύστημα δεν απαντά καλά στα περισσότερα β-λακταμικά αντιβιοτικά (Chambers H., 1997). Η πλήρης έκφραση της αντοχής στις β-λακτάμες επιτυγχάνεται για έναν περιορισμένο αριθμό αντιβιοτικών όπως η μοξαλακτάμη, η κεφτιζοξίμη και η κεφοξιτίνη. Πιθανολογείται ότι αυτό οφείλεται στην χαμηλή χημική συγγένεια του ενδοκυττάριου πεδίου (domain) σύνδεσης της MecR1 (Hiramatsu K. et al., 2001).

Η επαγωγή είναι βραδεία και η μεθικιλίνη /οξακιλλίνη αποτελεί έναν μάλλον ασθενή επαγωγέα (Berger-Bächli B., 1997; Chambers H., 1997; Hiramatsu K. et al., 2001). Έτσι, στα στελέχη αυτά η αντοχή στην μεθικιλίνη εγκαθίσταται βραδέως και η *in vitro* πλήρης επαγωγή της σύνθεσης PBP2a εμφανίζεται μετά από 48 ώρες (Berger-Bächli B., 1997).

Όλα τα μεθικιλίνη-ευαίσθητα στελέχη που φέρουν το *mecA* δεν εντάσσονται στην κατηγορία των *pre-MRSA*. Αντιθέτως, ταξινομούνται σε δύο (2) τουλάχιστον κατηγορίες. Ας δούμε αυτές τις δύο κατηγορίες συνοπτικά :

Την πρώτη κατηγορία συνθέτουν τα *pre-MRSA* στελέχη που μόλις περιγράψαμε. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται στελέχη που είναι ευαίσθητα στην μεθικιλίνη αλλά φέρουν ένα βασικό επίπεδο αντοχής σε ορισμένες β-λακτάμες όπως η μοξαλακτάμη και η κεφοξιτίνη (Kuwahara-Agai K. et al., 1996). Από τα στελέχη της κατηγορίας αυτής εύκολα αναπτύσσονται κλώνοι ανθεκτικοί σε όλες τις β-λακτάμες, εφόσον τα κύτταρα αυτά εκτεθούν σε εκλεκτικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών (*in vitro* επιλογή). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα στελέχη N315, 82/20-1 και 93/H44. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων (sequencing) που έγινε κατέδειξε ότι το *mecI* είναι ανέπαφο και στα τρία αυτά στελέχη.

Τα μέλη της δεύτερης κατηγορίας είναι ευαίσθητα σε όλες τις β-λακτάμες όπως μεθικιλίνη, οξακιλλίνη, ιμιπενέμη, κεφαζολίνη, κεφοξιτίνη, κεφτιζοξίμη και μοξαλακτάμη. Τα στελέχη αυτά δεν δίνουν ανθεκτικούς κλώνους αν εκτεθούν σε εκλεκτικές συγκεντρώσεις β-λακταμικών αντιβιοτικών. Ο λόγος για την ευαισθησία στις β-λακτάμες δεν είναι γνωστός, πιθανολογείται πάντως η αδρανοποίηση του *mecA* λόγω μεταλλάξεων (Kuwahara-Agai K. et al., 1996).

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι για την πλήρη έκφραση της αντοχής στην μεθικιλίνη δεν αρκεί η παρουσία του συμπλέγματος *mec*. Είναι βέβαιο ότι στην μοριακή εξέλιξη των *MRSA*, πέραν της πρόσκτησης του συμπλέγματος *mec*, υπήρξαν και κάποια άλλα «αναγκαία» γενετικά συμβάντα.

Πράγματι, στα κλινικά στελέχη *MRSA* που απομονώνονται σήμερα, το σύμπλεγμα *mec* δεν είναι ακέραιο. Στο περίπου 40% εξ αυτών το *mecI* έχει απαλειφθεί πλήρως, ενώ το *mecR1* είναι ακρωτηριασμένο στο 3' άκρο του.



Όσον αφορά τα υπόλοιπα, το *mecI* είναι μεν ακέραιο, αλλά παρατηρούνται σημειακές μεταλλάξεις, είτε εντός αυτού, είτε εντός του χειριστή του *mecA* (Hiramatsu K. et al., 2001). Στα στελέχη αυτά η παραγωγή PBP2a είναι επαγωγίμη αν μεν υπάρχει πλασμίδιο β-λακταμάσης, συστασιακή δε απουσία του πλασμιδίου αυτού (Chambers H., 1997).

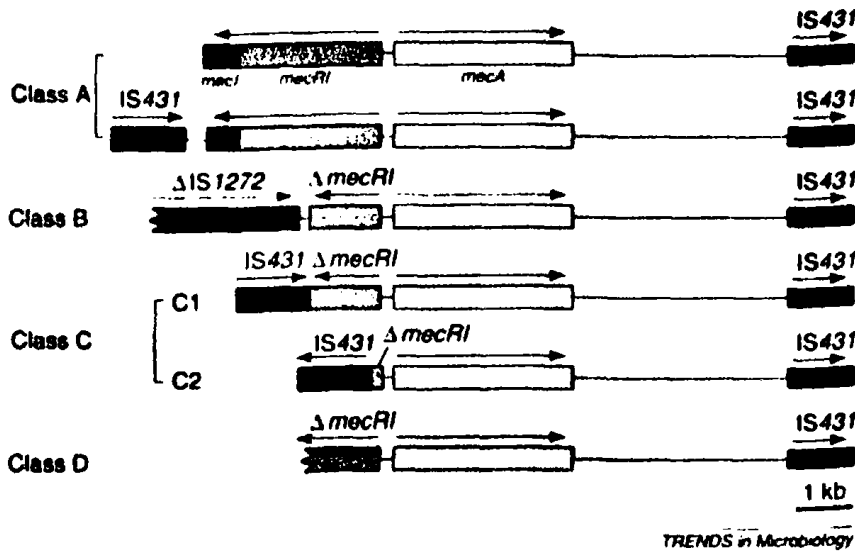
Σήμερα, υπάρχουν πολλές ενδείξεις σύμφωνα με τις οποίες οι μεταλλάξεις στις ρυθμιστικές αλληλουχίες είναι απαραίτητες για την έκφραση κλινικώς εμφανούς αντοχής στην μεθικιλίνη, παρά το γεγονός ότι η λειτουργική σημασία πολλών σημειακών μεταλλάξεων του *mecI* δεν έχει πλήρως καθοριστεί (Hiramatsu K., 1995; Niemeyer D. et al., 1996).

Η εισαγωγή πλασμιδίων που περιέχουν τα ρυθμιστικά στοιχεία *mecR1/mecI* εντός στελεχών με συστασιακή (constitutive) μεταγραφή του *mecA*, επέφερε ελάττωση τόσο της μεταγραφής του *mecA* όσο και των επιπέδων της αντοχής στην μεθικιλίνη (Berger-Bachi B., 1999). Όμως, υπήρξαν στελέχη στα οποία η αδρανοποίηση του *mecI* ή η υπερπαραγωγή *mecR1/mecI* δεν επέφεραν καμμία μεταβολή του βαθμού αντοχής. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι ο βαθμός επίδρασης των *mecR1/mecI* και του χειριστή πάνω στα επίπεδα αντοχής ίσως εξαρτάται και από το γενετικό background του συγκεκριμένου στελέχους (Berger-Bachi B., 1999).

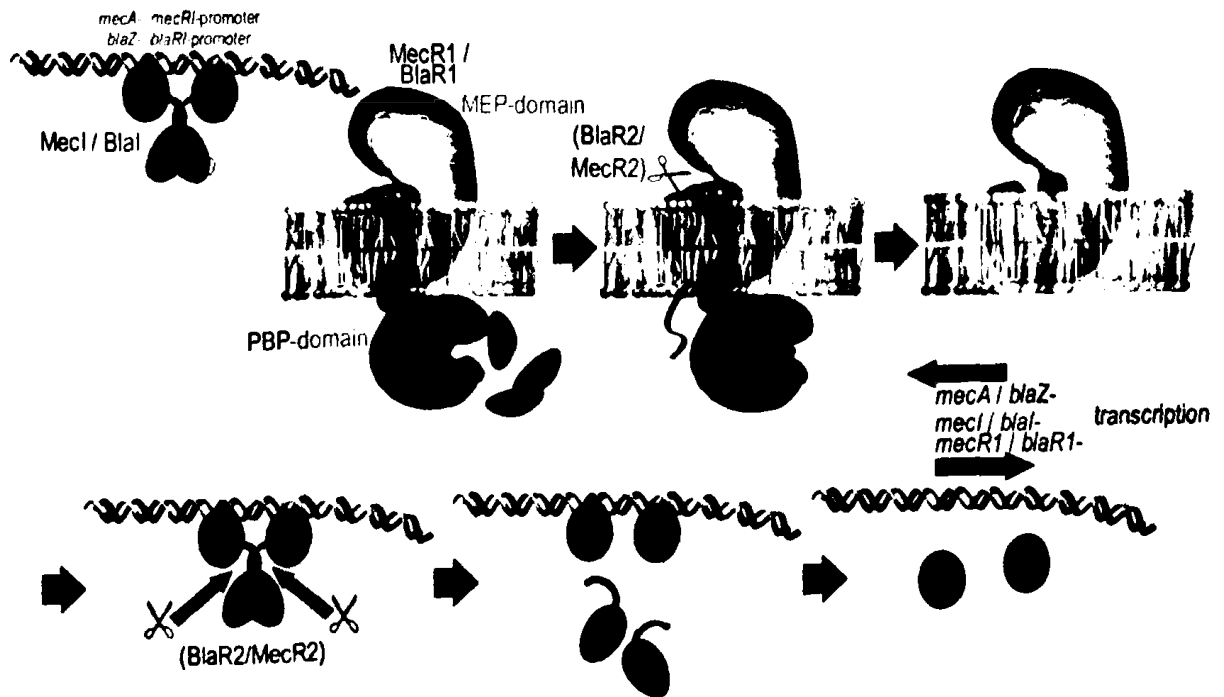
Παρομοίως, η εισαγωγή ενός πλασμιδίου πενικιλινάσης στο στέλεχος COL κατέστησε την παραγωγή PBP2a επαγωγίμη αλλά δεν επηρέασε τα επίπεδα αντοχής. Τα επίπεδα αυτά ελαττώθηκαν μόνο μετά από απενεργοποίηση του *blaR1* (Berger-Bachi B., 1999). Αυτή η έλλειψη συσχέτισης ανάμεσα στην ποσότητα της παραγόμενης PBP2a και στα επίπεδα αντοχής μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι κάποια γονίδια διαφορετικά από τα *mecA*, *mecR1-mecI* και *blaR1-blaI* ευθύνονται για τις διαφορές επιπέδων αντοχής που παρατηρούνται μεταξύ των διαφόρων στελεχών (Berger-Bachi B., 1994; Berger-Bachi B. & Rohrer S., 2002).

Στο σχήμα 3 απεικονίζονται οι τάξεις των συμπλεγμάτων *mec* (Archer G. & Niemeyer D., 1994).

Σχήμα 3. Τάξεις συμπλεγμάτων mec



Σχήμα 4. «Τρισδιάστατη» απεικόνιση του mec οπερόνιου

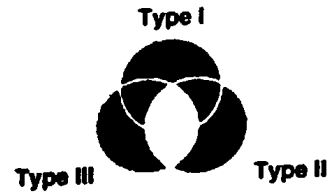
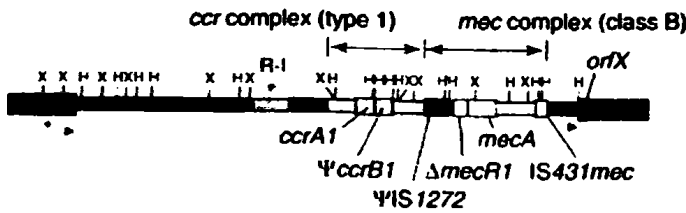


García-Castellanos R. et al. *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, No 17, pp. 17888-17896

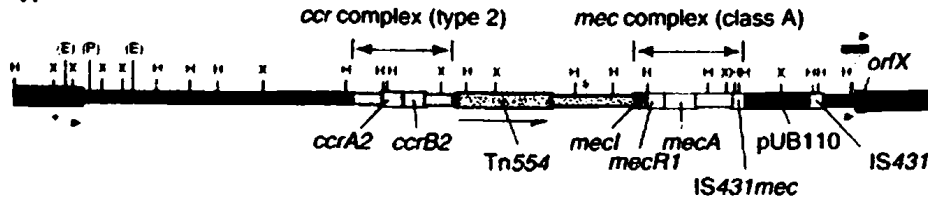


Σχήμα 5. Αλλότυποι SCC_{mec}

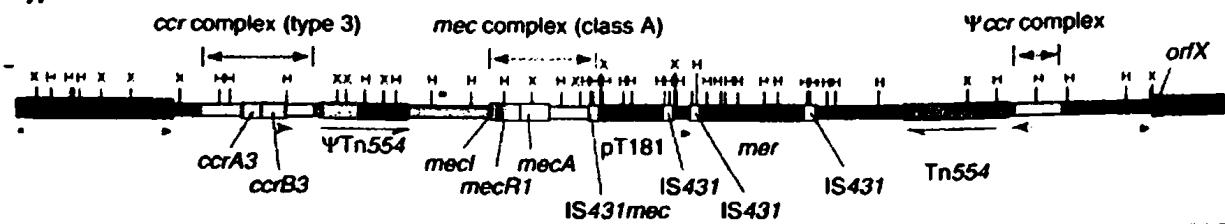
Type I SCC_{mec}



Type II SCC_{mec}

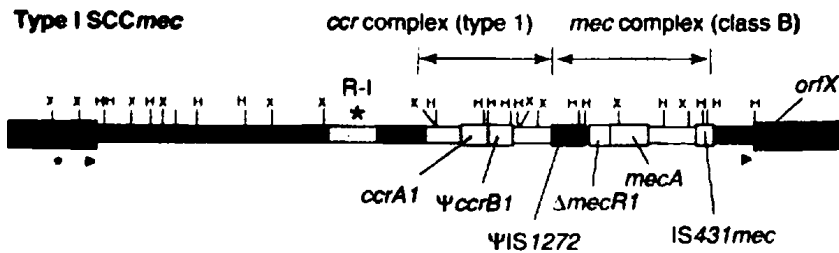


Type III SCC_{mec}

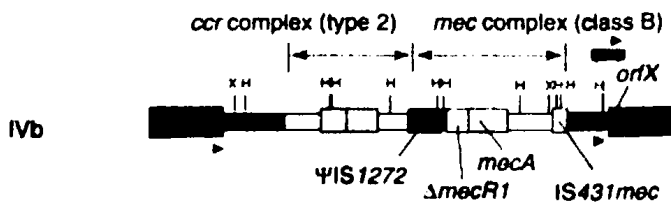
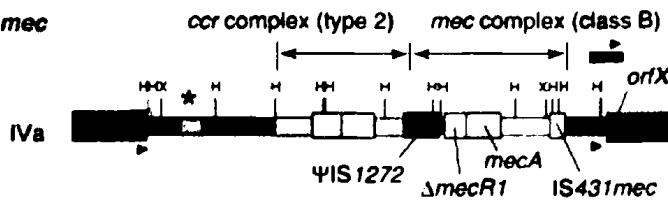


TRENDS in Microbiology

Type I SCC_{mec}



Type IV SCC_{mec}



TRENDS in Microbiology

Hiramatsu K., Cui L., Kuroda M., Ito T.

The emergence and evolution of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*.

Trends in Microbiology Vol.9 No.10, October 2001



Ετερογενής αντοχή

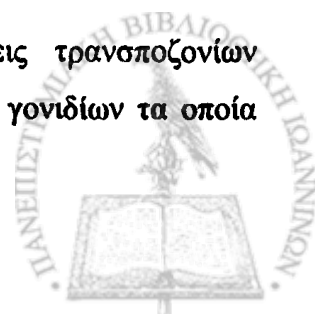
Σε κάθε περίπτωση, η άρση της καταστολής της μεταγραφής του *mecA* επιτρέπει στο στέλεχος να εκφράσει την αντοχή στην μεθικιλίνη. Όμως αυτή η άρση της καταστολής δεν καθιστά το στέλεχος πλήρως ανθεκτικό στις β-λακτάμες (Hiramatsu K. et al., 2001).

Αντιθέτως, ένας μικρός μόνο υποπληθυσμός του (0.1%) εκφράζει υψηλού βαθμού αντοχή στις β-λακτάμες. Πρόκειται για ένα φαινόμενο που αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των μεθικιλίνη-ανθεκτικών σταφυλοκόκκων και ονομάζεται ετερογενής αντοχή (heteroresistance). Η πλειοψηφία των κυττάρων του συγκεκριμένου στελέχους (99.9%) εμφανίζει χαμηλού βαθμού αντοχή, πολλές φορές με MIC ελάχιστα υψηλότερη αυτής των ευαίσθητων στελεχών (βασική αντοχή). Οι κλώνοι με την υψηλού βαθμού αντοχή εμφανίζονται με συχνότητα που κυμαίνεται από 10^{-7} έως 10^{-3} και η εμφάνισή τους αποδίδεται σε μεταλλάξεις που λαμβάνουν χώραν εντός του σταφυλοκοκκικού γονιδιώματος αλλά εκτός SCC_{mec} (Berger-Bachi B. & Rohrer S., 2002). Τόσο τα επίπεδα της βασικής αντοχής όσο και η συχνότητα εμφάνισης των ανθεκτικών υποπληθυσμών αποτελούν ειδικές για το στέλεχος (strain specific) ιδιότητες οι οποίες μπορούν να αναπαραχθούν κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες πειραματικές συνθήκες (Berger-Bachi B., 1994; Berger-Bachi B. & Rohrer S., 2002; Berger-Bachi B., 1999).

Ο ίδιος μηχανισμός φαίνεται πως παρατηρείται και *in vivo*, οδηγώντας στην επιλογή στελεχών με αυξανόμενη αντοχή (Berger-Bachi B., 1999). Με ελάχιστες εξαιρέσεις, οι ανθεκτικοί κλώνοι διατηρούν την υψηλού βαθμού αντοχή τους ακόμα και απουσία πίεσης επιλογής (selective pressure). Υπάρχουν βέβαια και κάποια σπάνια στελέχη στα οποία αυτοί οι ανθεκτικοί κλώνοι αποκτούν τα αρχικά επίπεδα αντοχής μετά από περίπου 20 γενεές.

Η υψηλού βαθμού αντοχή φαίνεται πως προκύπτει από πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς, εκ των οποίων λίγοι είναι μέχρι σήμερα γνωστοί. Μεταξύ των μηχανισμών αυτών περιγράφονται η υπέρμετρη έκφραση του *hmrA* ή του *hmrB* καθώς και η αδρανοποίηση του *LytH* (Berger-Bachi B. & Rohrer S., 2002).

Πληθώρα πειραμάτων αδρανοποίησης γονιδίων με εισχωρήσεις τρανσποζονίων (insertional inactivation) οδήγησαν στην ταυτοποίηση μιας σειράς γονιδίων τα οποία

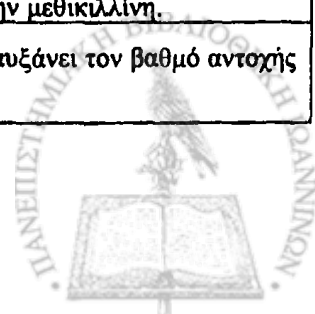


ονομάστηκαν παράγοντες fem ή aux (factors essential for methicillin resistance ή auxiliary factors) (Berger-Bachi B., 1994; Berger-Bachi B. & Rohrer S., 2002; Berger-Bachi B., 1999). Η δραστηριότητα των παραγόντων αυτών έχει μεγάλη σημασία για την έκφραση της αντοχής.

Σήμερα, είναι γνωστοί περισσότεροι από 20 παράγοντες fem. Οι σημαντικότεροι εξ αυτών παρατίθενται στον πίνακα 8 (Berger-Bachi B. & Rohrer S., 2002). Δεν είναι μόνο οι διαφορές στο γονιδίωμα που επηρεάζουν τα επίπεδα αντοχής. Όπως θα δούμε και στην συνέχεια, η αντοχή στην μεθικιλίνη επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από το καλλιεργητικό μέσο καθώς επίσης και από διάφορους εξωτερικούς παράγοντες όπως θερμοκρασία, PH, οσμωτικότητα, συγκέντρωση δισθενών κατιόντων, συνθήκες αναερόβιωσης και άλλοι (Berger-Bachi B., 1999).

Πίνακας 8. Παράγοντες fem

Παράγων	Λειτουργία και επίδραση πάνω στα επίπεδα αντοχής
femX (fmhB)	Σχηματισμός των πενταπεπτιδικών γεφυρών: προσθήκη του πρώτου μορίου gly στο πεπτίδιο «εκκίνησης» (stem peptide). Αδρανοποίηση του γονιδίου θανατηφόρος
femA	προσθήκη του 2 ^{ου} και 3 ^{ου} μορίου gly στο πεπτίδιο «εκκίνησης». Αδρανοποίηση του γονιδίου καταργεί την αντοχή στην μεθικιλίνη.
femB	προσθήκη του 4 ^{ου} και 5 ^{ου} μορίου gly στο πεπτίδιο «εκκίνησης». Αδρανοποίηση του γονιδίου ελαττώνει τον βαθμό αντοχής στην μεθικιλίνη.
femC(glnR)	Καταστολέας της συνθετάσης της γλουταμίνης. Αδρανοποίηση του γονιδίου ελαττώνει τον βαθμό αντοχής στην μεθικιλίνη.
femD(glmM)	Μουτάση της 6-φωσφορικής γλυκοζαμίνης Αδρανοποίηση του γονιδίου ελαττώνει τον βαθμό αντοχής στην μεθικιλίνη.
femE	Άγνωστη λειτουργία. Αδρανοποίηση του γονιδίου ελαττώνει ελαφρώς τον βαθμό αντοχής στην μεθικιλίνη.
FemF(murE)	Καταλύει την ενσωμάτωση της λυσίνης στο πεπτίδιο «εκκίνησης». Αδρανοποίηση του γονιδίου ελαττώνει τον βαθμό αντοχής στην μεθικιλίνη.
fmtA	Πρωτεΐνη της μεμβράνης. Αδρανοποίησή της ελαττώνει τον «χιασμό» /cross linking της πεπτιδογλυκάνης και ελαττώνει τον βαθμό αντοχής στην μεθικιλίνη.
fmtB(mrp)	Πρωτεΐνη της επιφάνειας του κυττάρου. Άγνωστη λειτουργία. Αδρανοποίηση του γονιδίου ελαττώνει τον βαθμό αντοχής στην μεθικιλίνη.
fmtC(mprF)	Πρωτεΐνη της μεμβράνης. Αδρανοποίησή του ελαττώνει τον βαθμό αντοχής στην μεθικιλίνη.
lIm	Άγνωστη λειτουργία. Αδρανοποίηση του γονιδίου ελαττώνει τον βαθμό αντοχής στην μεθικιλίνη.
lytH	Ομόλογος με διάφορα λυτικά ένζυμα. Αδρανοποίηση του γονιδίου αυξάνει τον βαθμό αντοχής στην μεθικιλίνη.
rbp2	Η παρουσία λειτουργικών πεδίων (domains) τρανσγλυκοσυλάσης είναι απαραίτητη για την έκφραση αντοχής στη μεθικιλίνη.
sigB	Εναλλακτικός παράγων μεταγραφής. Αδρανοποίησή του ελαττώνει τον βαθμό αντοχής στην μεθικιλίνη.
hmrA	Αμινοϋδρολάση. Υπέρμετρη έκφραση του γονιδίου αυξάνει τον βαθμό αντοχής στην μεθικιλίνη.
hmrB	Ομόλογος με πρωτεΐνη-φορέα ακυλομάδων. Υπέρμετρη έκφραση του γονιδίου αυξάνει τον βαθμό αντοχής στην μεθικιλίνη.
Dlt οπερόνιο	Μεταφορά D-ala σε τειχοϊκά οξέα. Αδρανοποίηση του γονιδίου αυξάνει τον βαθμό αντοχής στην μεθικιλίνη.



A.8.3. Αντοχή του *S.aureus* στις κινολόνες

Σε αντίθεση με τα Gram(-) βακτήρια, οι MIC των σταφυλοκόκκων για τις κινολόνες είναι σχετικά υψηλές (0.25-2 mg/l) και επομένως κοντά στις θεραπευτικές συγκεντρώσεις στον ανθρώπινο ορό (η peak συγκέντρωση της σιπροφλοξασίνης είναι 2 mg/l). Η χρήση αυτών των οριακά ενεργών φαρμάκων έναντι προβληματικών Gram(+) παθογόνων όπως οι MRSA, διευκόλυνε την επιλογή ανθεκτικών στελεχών.

Σήμερα, ο επιπολασμός της αντοχής στις κινολόνες μεταξύ των νοσοκομειακών MRSA πλησιάζει το 90 % (Moreillon P. et al., 2005). Οι κινολόνες αναστέλλουν την δράση της DNA γυράσης και της τοποϊσομεράσης IV, δύο ενζύμων της τάξεως των τοποϊσομερασών.

Η DNA γυράση είναι ένα τετραμερές αποτελούμενο από δύο υπομονάδες A και δύο υπομονάδες B, κωδικοποιούμενες από τα γονίδια *gyrA* και *gyrB* αντίστοιχα. Οι υπομονάδες *GyrA* συνδέονται με το DNA ενώ οι υπομονάδες *GyrB* έχουν δράση ATP-άσης (Schmitz F.-J. et al., 2002).

Η DNA γυράση εισάγει συνεχώς αρνητικές υπερελίξεις (supercoils) εντός του βακτηριακού χρωμοσώματος (Alberts B. et al., 2002). Ένα μόριο γυράσης μπορεί να εισαγάγει περίπου 100 υπερελίξεις ανά λεπτό (Lewin B., 1997). Προς τον σκοπό αυτό χρησιμοποιεί την ενέργεια που απελευθερώνεται από την υδρόλυση του ATP. Οι αρνητικές υπερελίξεις χάνονται από το βακτηριακό DNA κάθε φορά που μια περιοχή της έλικας ανοίγει, ελαττώνοντας έτσι την τάση υπερελίκωσης. Επομένως, η DNA γυράση καθιστά το άνοιγμα της DNA έλικας στα βακτήρια ενεργειακώς ευνοϊκό σε σχέση με το άνοιγμα μιας έλικας η οποία δεν είναι υπερελικωμένη (Alberts B. et al., 2002).

Συνοψίζοντας, μπορούμε να πούμε ότι ο σημαντικότερος ρόλος της DNA γυράσης είναι να διατηρεί έναν ορισμένο βαθμό υπερελίκωσης του DNA έτσι ώστε να διευκολύνεται η κίνησή του στην διάρκεια της αντιγραφής και της μεταγραφής (Schmitz F.-J. et al., 2002).

Η τοποϊσομεράση IV διαχωρίζει τα θυγατρικά DNA μόρια που προκύπτουν ύστερα από έναν κύκλο αναδιπλασιασμού (replication), προκειμένου να επιτευχθεί ο διαμοιρασμός τους στα δύο θυγατρικά κύτταρα (Schmitz F.-J. et al., 2002). Πρόκειται για ετεροτετραμερές αποτελούμενο από 2 υπομονάδες ParC και 2 υπομονάδες ParE. Στην περίπτωση του *S.aureus* τα ParC και ParE χαρακτηρίζονται ως grIA και grIB αντίστοιχα.

Οι ParC και ParE εμφανίζουν σημαντικού βαθμού ομολογία με τις gyrA και gyrB. Η DNA γυράση μπορεί να δράσει ως τοποϊσομεράση IV, αλλά με πολύ μικρότερη αποτελεσματικότητα. Αντίθετα, η τοποϊσομεράση IV δεν μπορεί να υποκαταστήσει την DNA γυράση. Για τα περισσότερα Gram (+) βακτήρια η τοποϊσομεράση IV αποτελεί τον πρωταρχικό στόχο των κινολονών ενώ η DNA γυράση τον δευτερεύοντα.

Κάποιες νεότερες κινολόνες εμφανίζουν παρόμοια χημική συγγένεια για αμφοτέρους τους στόχους. Το κομβικό σημείο στην δράση των κινολονών είναι ο σχηματισμός συμπλέγματος κινολόνης-ενζύμου-DNA, το οποίο περιέχει ένα θραύσμα DNA. Οι κινολόνες παγιδεύουν ένα ενδιάμεσο προϊόν στην διάρκεια της καταλυτικής αντίδρασης, αφήνοντας το κομμένο DNA προσκολλημένο στην τοποϊσομεράση. Πιστεύεται ότι τα θραύσματα αυτά μποκάρουν την κίνηση του DNA στην διάρκεια του αναδιπλασιασμού (Moreillon P. et al., 2005). Ο συνολικός βαθμός αναστολής της σύνθεσης του DNA σχετίζεται άμεσα από τον αριθμό των συμπλεγμάτων που σχηματίζονται.

Πρέπει να σημειώσουμε εδώ, ότι δεν ευθύνεται μόνο η αναστολή της σύνθεσης του DNA για την μικροβιοκτόνο δράση των κινολονών. Στην διαπίστωση αυτή οδηγηθήκαμε από την παρατήρηση ότι αναστολείς της μεταγραφής και της πρωτεϊνοσύνθεσης ελαττώνουν την βακτηριοκτόνο δράση κάποιων κινολονών χωρίς να επηρεάζουν την ικανότητά τους να αναστέλλουν την σύνθεση του DNA.

Για την πλήρη μικροβιοκτόνο δράση των κινολονών είναι πιθανό να χρειάζονται και κάποια άλλα νεοσυντιθέμενα γονιδιακά προϊόντα, η φύση των οποίων δεν είναι ακόμα γνωστή (Moreillon P. et al., 2005).



Υπάρχουν 3 βασικοί τύποι βακτηριακής αντοχής έναντι των αντιβιοτικών.

- i. τροποποίηση του στόχου του αντιβιοτικού
- ii. ενζυμική αδρανοποίηση ή αποδόμηση του αντιβιοτικού
- iii. τροποποίηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του αντιβιοτικού λόγω υπερέκφρασης των αντλιών απέκκρισης (efflux pumps) ή λόγω απώλειας πορινών.

Στην περίπτωση των φυσικών και ημισυνθετικών αντιβιοτικών παρατηρούνται και οι τρεις μηχανισμοί. Αντίθετα, στην περίπτωση των συνθετικών αντιβιοτικών δεν παρατηρείται ο 2^{ος} μηχανισμός αντοχής, καθώς τα βακτήρια δεν έχουν έρθει σε επαφή με το αντιβιοτικό εκτός εργαστηρίου (Schmitz F.-J. et al., 2002).

Έχει παρατηρηθεί ότι κάποιοι μύκητες (*Gloeophyllum striatum*) αποδομούν τις κινολόνες, ενώ τα προϊόντα κάποιων πλασμιδιακών γονιδίων (qnr) προστατεύουν την DNA γυράση και την τοποϊσομεράση IV από την δράση των αντιβιοτικών (Moreillon P. et al., 2005). Το μέλλον θα δείξει αν θα αναδειχθεί και αυτός ο 2^{ος} μηχανισμός αντοχής.

Τροποποίηση του στόχου του αντιβιοτικού

Η εξέλιξη της αντοχής στις κινολόνες εξελίσσεται βήμα προς βήμα, μέσω της συσσώρευσης αυτόματων μεταλλάξεων στα χρωμοσωμικά γονίδια. Οι μεταλλάξεις αυτές προσδίδουν αντοχή ειδικά στις κινολόνες ενώ ο 3^{ος} μηχανισμός προσδίδει αντοχή και σε άλλες οικογένειες αντιβιοτικών όπως οι β-λακτάμες, οι τετρακυκλίνες και η χλωραμφαινικόλη.

Οι πρώτες σημειακές μεταλλάξεις που εμφανίζονται ύστερα από έκθεση στις κινολόνες αφορούν συνήθως τον κύριο στόχο και προσδίδουν χαμηλού βαθμού αντοχή, ενώ δευτερογενείς μεταλλάξεις σε άλλα σημεία του κύριου στόχου ή στον δευτερεύοντα στόχο προσδίδουν στο στέλεχος αυξημένη αντοχή (Rice L.B. & Bonomo R.A., 2005).

Έτσι, οι πρώτες σημειακές μεταλλάξεις εμφανίζονται στο γονίδιο *grlA*, λαμβάνουν χώρα με συχνότητα 10^{-7} έως 10^{-8} και προκαλούν μια μέτρια αύξηση της MIC (0.5-2 mg/l). Τα στελέχη αυτά εξακολουθούν να χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητα σύμφωνα με τις οδηγίες της NCCLS, όμως η πρώτη αυτή μετάλλαξη ανοίγει τον δρόμο

σε μια δεύτερη μετάλλαξη εντός του *gyrA*, η οποία, σε συνδυασμό με την *grlA* μετάλλαξη, επιφέρει υψηλού βαθμού αντοχή (Moreillon P. et al., 2005).

Για τον λόγο αυτό, είναι πολύ σημαντικό να ανιχνεύσουμε αυτήν την 1^{ου} βαθμού αντοχή στις κινολόνες πριν ξεκινήσουμε ένα θεραπευτικό σχήμα με τις ενώσεις αυτές.

Στις παλαιάς γενεάς κινολόνες, οι μεταλλάξεις αυτές είναι συχνές και οδηγούν γρήγορα σε υψηλού βαθμού αντοχή. Οι νεότερες κινολόνες με την βελτιωμένη αντι-Gram(+) δράση (levofloxacin, moxifloxacin, gatifloxacin, garenoxacin) ασκούν μικρότερη πίεση επιλογής. Παρόλα αυτά, εξακολουθεί να υφίσταται ο κίνδυνος της επιλογής, ειδικά για βακτήρια τα οποία έχουν ήδη αποκτήσει έναν πρώτο βαθμό αντοχής στις κινολόνες (*grlA* μεταλλάκτες / MIC 2-8 mg/l) (Moreillon P. et al., 2005).

Η πλέον συχνή μονοσημειακή μετάλλαξη εντός του *grlA* είναι η Ser-80 → Phe ή Tyr (TCC → TTC ή TAC), ενώ η πλέον συχνή εντός του *gyrA* είναι η Ser-84 → Leu (TCA → TTA) (Tanaka M. et al., 2000).

Υπερέκφραση αντλιών απέκκρισης

Είναι αποδεδειγμένο ότι η υπερέκφραση τέτοιων αντλιών στα Gram(+) βακτήρια προκαλεί χαμηλού βαθμού αντοχή στις κινολόνες.

Σε αντίθεση με τους περισσότερους μηχανισμούς απέκκρισης, οι οποίοι είναι ειδικοί για ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό ή για κάποια συγκεκριμένη τάξη αντιβιοτικών, οι μηχανισμοί απέκκρισης των κινολονών είναι οι ίδιοι με τους μηχανισμούς απέκκρισης πολλών άλλων φαρμάκων.

Επιπροσθέτως, ενώ για τους περισσότερους μηχανισμούς απέκκρισης τα υπεύθυνα γονίδια εδράζονται σε κινητά γενετικά στοιχεία (κυρίως πλασμίδια), τα συστήματα απέκκρισης των κινολονών κωδικοποιούνται από χρωμοσωμικά γονίδια (Poole K., 2005).

Στην περίπτωση του *S.aureus*, το σημαντικότερο σύστημα απέκκρισης είναι οι *NorA* πρωτεΐνες της μεμβράνης. Οι πρωτεΐνες αυτές ανήκουν στην οικογένεια των MF συστημάτων απέκκρισης (major facilitators) και απεκκρίνουν τις υδρόφιλες κινολόνες χρησιμοποιώντας την ενέργεια της βαθμίδωσης (gradient) πρωτονίων εκατέρωθεν της μεμβράνης (Moreillon P. et al., 2005).



Μεταλλάξεις στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου *porA* οδηγούν σε υπερέκφρασή του, με αποτέλεσμα την εμφάνιση μετρίου βαθμού αντοχής στις παλαιότερες κινολόνες (νορφλοξασίνη, σιπροφλοξασίνη και λεβοφλοξασίνη) (Moreillon P. et al., 2005; Poole K., 2005).

Κάποιες άλλες κινολόνες, όπως η σπαρφλοξασίνη και η μοξιφλοξασίνη, δεν επηρεάζονται από την υπερέκφραση του *porA*, αν και κάποια νεώτερα δεδομένα δείχνουν ότι κάποιες λιγότερο μελετημένες αντλίες μπορούν να προκαλέσουν αντοχή και στις κινολόνες αυτές (Poole K., 2005). Πράγματι, πρόσφατα περιεγράφη ένας νέος μεταφορέας στον *S.aureus*, ο *NorB*, ο οποίος προσδίδει αντοχή σε ένα μεγαλύτερο φάσμα κινολονών, συμπεριλαμβανομένης της σπαρφλοξασίνης και της μοξιφλοξασίνης (Poole K., 2005).

A.8.4. Αντοχή στις μακρολίδες, λινκοσαμίδες και στρεπτογραμίνες

Έχουν περιγραφεί τρεις διαφορετικοί επίκτητοι μηχανισμοί MLS αντοχής στα Gram(+)βακτήρια:

1. Τροποποίηση του στόχου του αντιβιοτικού
2. Ενζυμική τροποποίηση του αντιβιοτικού
3. Ενεργητική απέκκριση του αντιβιοτικού

Ο πρώτος μηχανισμός είναι ο πλέον συχνός, αν και οι δύο τελευταίοι εμφανίζονται με ολοένα μεγαλύτερη συχνότητα (Verhoef J. et al., 2004).

Στη συνέχεια θα περιγραφούν εν συντομία αυτοί οι τρεις μηχανισμοί.

Τροποποίηση του στόχου του αντιβιοτικού

Τα αντιβιοτικά της ομάδας MLS συνδέονται με την υπομονάδα 50S των ριβοσωμάτων και αναστέλλουν την επιμήκυνση των πεπτιδικών αλυσίδων.

Η τροποποίηση του στόχου του αντιβιοτικού συνίσταται στην μεταγραφική μεθυλίωση μιας αδενίνης του οπερόνιου 23S rRNA από μια N-μεθυλ-τρανσφεράση (μεθυλάση). Το ένζυμο κωδικοποιείται από ένα γονίδιο της τάξεως *erm* (erythromycin ribosome methylase). Εξ αυτών άλλα (*ermA*) εδράζονται σε τραπεζοζόνια (Tn554) και άλλα (*ermC*) σε πλασμίδια (Pe194) (Moreillon P. et al., 2005).

Η ακριβής θέση της μεθυλίωσης εντοπίζεται σε μια απολύτως συγκεκριμένη θέση του rRNA και οδηγεί σε μια αλλοστερική τροποποίηση του στόχου, με αποτέλεσμα την ελάττωση της χημικής συγγένειας και την εμφάνιση αντοχής σε όλα τα αντιβιοτικά της ομάδας MLS_B (Rice L.B. & Bonomo R.A., 2005). Αυτό συμβαίνει, γιατί οι θέσεις σύνδεσης των αντιβιοτικών αυτών είτε είναι ταυτόσημες, είτε επικαλύπτονται (Verhoef J. et al., 2004).

Οι στρεπτογραμίνες τύπου A δεν επηρεάζονται και επομένως, η συνέργεια των δύο συστατικών των στρεπτογραμινών έναντι των MLS ανθεκτικών στελεχών διατηρείται.

Η έκφραση της MLS αντοχής στους σταφυλοκόκκους μπορεί να είναι σταθερή ή επαγωγίμη. Ο χαρακτήρας της αντοχής δεν έχει να κάνει με την τάξη του επηγονιδίου αλλά με την εξαρτάται από την αλληλουχία της ρυθμιστικής περιοχής η οποία προηγείται του δομικού γονιδίου της μεθυλάσης. Η ρύθμιση των περιοχών αυτών πραγματοποιείται με έναν μηχανισμό ενίσχυσης της μεταγραφής (translational attenuation), στον οποίο η δευτεροταγής δομή του mRNA επηρεάζει τον βαθμό της μεταγραφής (Verhoef J. et al., 2004).

Όταν η έκφραση της αντοχής είναι σταθερή, τα στελέχη είναι ανθεκτικά σε όλα τα αντιβιοτικά της ομάδας MLS_B. Αυτή η σταθερή MLS_B αντοχή, με ή χωρίς την συνύπαρξη μηχανισμού ενεργητικής απέκκρισης, είναι εξαιρετικά συχνή μεταξύ των νοσοκομειακών στελεχών MRSA (> 90%). Για τον λόγο αυτό τα αντιβιοτικά της ομάδας αυτής δεν αποτελούν φάρμακα πρώτης εκλογής. Εξαιρέση αποτελούν, όπως προαναφέραμε, οι στρεπτογραμίνες A (dalfopristin).

Τα στελέχη με επαγωγίμη αντοχή συνήθως περιέχουν ανενεργό mRNA για την μεθυλάση. Κατά συνέπεια, η αντοχή τύπου MLS_B δεν εκφράζεται (Rice L.B. & Bonomo R.A., 2005). Όμως, παρουσία κάποιου επαγωγέα, έχουμε ενεργοποίηση του mRNA και έκφραση της μεθυλάσης, οπότε τα στελέχη καθίστανται ανθεκτικά στις μακρολίδες με 14- και 15-μελή δακτύλιο λακτόνης. Οι μακρολίδες με 16-μελή δακτύλιο, οι λινκοσαμίδες και οι στρεπτογραμίνες παραμένουν ευαίσθητες. Ο λόγος για αυτήν την διαφοροποίηση της αντοχής είναι ότι στην περίπτωση των σταφυλοκόκκων, μόνο οι μακρολίδες με 14- και 15-μελή δακτύλιο είναι αποτελεσματικοί επαγωγείς της σύνθεσης της μεθυλάσης (Verhoef J. et al., 2004).



Αντίθετα, σε άλλα βακτήρια όπως οι στρεπτόκοκκοι, διάφορες μακρολίδες και λινκοσαμίδες μπορούν να δράσουν ως επαγωγείς, σε διάφορο βαθμό. Έτσι, στην περίπτωση των στρεπτοκόκκων η ριβοσωματική μεθυλίωση οδηγεί σε διασταυρούμενη αντοχή για όλη την ομάδα MLS_B (Verhoef J. et al., 2004).

Πρέπει να έχουμε κατά νου ότι, μεταλλάξεις που οδηγούν σε σταθερή αντοχή εμφανίζονται με αρκετά υψηλή συχνότητα (10^{-7} έως 10^{-8}). Κατά συνέπεια, για ένα στέλεχος με επαγωγίμη *erm* αντοχή (δηλαδή ανθεκτικό στην ερυθρομυκίνη και ευαίσθητο στην κλινδαμυκίνη) δεν πρέπει να χορηγούμε κλινδαμυκίνη διότι θα επιλεγούν MLS_B μεταλλάκτες με σταθερή αντοχή και επομένως ανθεκτικοί σε όλα τα αντιβιοτικά της ομάδας (Moreillon P. et al., 2005). Για την ανίχνευση των στελεχών με επαγωγίμη *erm* αντοχή πραγματοποιούμε στο εργαστήριο το λεγόμενο D-test.

Ενεργητική απέκκριση του φαρμάκου

Στον *S.aureus* και στους CNS συχνά ανιχνεύουμε το πλασμιδιακό γονίδιο *msr(A)*, το οποίο προσδίδει αντοχή στις μακρολίδες και στις στρεπτογραμίνες B (MS φαινότυπος αντοχής). Ο φορέας που κωδικοποιείται από το *msr(A)* ανήκει στην οικογένεια των ABC συστημάτων απέκκρισης (ATP-binding cassette family) (Poole K., 2005)

Σε αντίθεση με όλα τα άλλα συστήματα απέκκρισης, τα μέλη της ABC οικογένειας χρησιμοποιούν την υδρόλυση του ATP ως πηγή ενέργειας. Στον συγκεκριμένο μεταφορέα δεν έχουν ακόμα εντοπιστεί πεδία (domains) που διασχίζουν την κυτταρική μεμβράνη, γεγονός που εγείρει ερωτηματικά σχετικά με την ικανότητα του φορέα να λειτουργεί αυτόνομα. Ίσως η *Msr(A)* συνδέεται με κάποια άλλη πρωτεΐνη η οποία διαθέτει τέτοιο διαμεμβρανικό πεδίο (Poole K., 2005).

Άλλα γονίδια τα οποία έχουν περιγραφεί στον *S.aureus* είναι τα πλασμιδιακά *vga(A)* καθώς και τα *vga(A)_n* και *vga(B)*, τα οποία εδράζονται σε κινητά μεταθετά στοιχεία.

Τα γονίδια αυτά προσδίδουν χαμηλού βαθμού αντοχή στις λινκοσαμίδες και στις στρεπτογραμίνες A (dalfopristin) και πιστεύεται ότι ο φαινότυπος LS_A , ο οποίος ανευρίσκεται περιστασιακά σε στελέχη σταφυλοκόκκων, ίσως οφείλεται στα γονίδια αυτά (Poole K., 2005).

Τροποποίηση του φαρμάκου

Σε αντίθεση με την τροποποίηση του στόχου, η ενζυμική τροποποίηση των MLS_B αντιβιοτικών είναι άκρως ειδική (Verhoef J. et al., 2004).

Στον *S.aureus* έχουν περιγραφεί πλασμιδιακώς μεσολαβούμενα ένζυμα τα οποία αδενυλιώνουν, ακετυλιώνουν ή υδρολύουν τις μακρολίδες. Η αντοχή στις λινκοσαμίδες μεσολαβείται από το γονίδιο *linA*. Το προϊόν του γονιδίου αυτού είναι μια 3-λινκομυκίνη 4-*O*-νουκλεοτιδυλτρανσφεράση (Rice L.B. & Bonomo R.A., 2005).

Έχουν επίσης περιγραφεί, πάντοτε στον *S.aureus*, ένζυμα τα οποία αδρανοποιούν τις στρεπτογραμίνες A και B. Τα ένζυμα αυτά, η στρεπτογραμίνη A ακετυλτρανσφεράση και η στρεπτογραμίνη B υδρολάση κωδικοποιούνται από τα γονίδια *vgb* και *vat* αντίστοιχα. Τα γονίδια αυτά βρίσκονται, το ένα παραπλεύρως του άλλου, στο πλασμίδιο *Pip630*, ενώ εκατέρωθεν αυτών βρίσκονται ανεστραμμένα αντίγραφα (*inverted copies*) της αλληλουχίας εισχωρήσεως IS 257 (Verhoef J. et al., 2004).

Σημειώνεται τέλος, ότι τα ένζυμα αυτά προσδίδουν και χαμηλού βαθμού αντοχή στις λινκοσαμίδες (Rice L.B. & Bonomo R.A., 2005)

A.8.5. Αντοχή του *S.aureus* στα γλυκοπεπτίδια

Η χρήση της βανκομυκίνης αυξήθηκε δραματικά από τα μέσα της δεκαετίας του 1980, καθώς ήταν ο πλέον αξιόπιστος θεραπευτικός παράγων στις λοιμώξεις από MRSA. Το ενδιαφέρον στοιχείο στην περίπτωση της βανκομυκίνης είναι ότι, σε αντίθεση με τους άλλους αντισταφυλοκοκκικούς παράγοντες, η εμφάνιση αντοχής στο αντιβιοτικό αυτό παρατηρήθηκε σχεδόν 40 χρόνια μετά την εισαγωγή του στην θεραπευτική (Sakoulas G. & Moellering R.C. Jr, 2008).

Το πρώτο στέλεχος *S.aureus* με ενδιάμεση ευαισθησία στην βανκομυκίνη απομονώθηκε το 1996 από έναν παιδιατρικό ασθενή στην Ιαπωνία (Hiramatsu και συνεργάτες). Το στέλεχος αυτό ονομάστηκε Mu 50 και ήταν ο πρώτος εκπρόσωπος των λεγόμενων στελεχών VISA (*vancomycin-intermediate S.aureus*).

Ακολούθησε η απομόνωση αρκετών στελεχών VISA σε ΗΠΑ, Γαλλία, Κορέα, Ν.Αφρική, Βραζιλία και Σκωτία. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περισσότερα από 100 στελέχη VISA (Appelbaum P.C., 2006).



Όλα τα VISA στελέχη εμφανίζουν περιορισμένη αντοχή και στην τεϊκοπλανίνη, οπότε θα ήταν ορθότερο να μιλάμε για GISA στελέχη (glycopeptide-intermediate *S.aureus*). Τα στελέχη αυτά έχουν MIC μεταξύ 4 και 8 $\mu\text{g/ml}$. Πρόκειται για στελέχη από τον πληθυσμό των οποίων «αναδεικνύονται» με μεγάλη συχνότητα στελέχη VRSA. Η συχνότητα αυτή εκτιμάται ότι είναι της τάξεως του 10^{-6} ή και μεγαλύτερη (Hiramatsu K., 2001). Τα στελέχη αυτά θεωρούνται οι πρόδρομοι των VRSA.

Οι Hiramatsu et al. περιέγραψαν και μια πρόδρομη τάξη των VISA, τους hetero-VISA (hVISA) (Hiramatsu K. et al., 2004). Πρώτος εκπρόσωπος των hVISA ήταν το στέλεχος Mu3, το οποίο επίσης περιεγράφη το 1997 (Liu C. & Chambers H., 2003). Παρά το γεγονός ότι η MIC του στελέχους αυτού είναι 4 $\mu\text{g/ml}$, αν ένα εναιώρημα πυκνότητας 10^7 cfu's/ml του Mu3 επωαστεί για 18 ώρες και στη συνέχεια ανακαλλιεργηθεί σε άγαρ που περιέχει 4mg/l βανκομυκίνη, θα παρατηρηθεί ανάπτυξη αποικιών (Liu C. & Chambers H., 2003).

Η πληθυσμιακή ανάλυση (population analysis) του Mu3 δείχνει ότι στον ανωτέρω πληθυσμό των 10^7 cfu's/ml υπάρχουν περίπου 200 κύτταρα με MIC > 4 mg/l καθώς επίσης και άλλοι υποπληθυσμοί με διάφορα επίπεδα αντοχής στην βανκομυκίνη, συμπεριλαμβανομένου και ενός υποπληθυσμού με MIC \geq 8mg/l. Στην PFGE ηλεκτροφόρηση το Mu3 εμφάνισε ένα πανομοιότυπο pattern με το στέλεχος Mu 50 το οποίο είχε απομονωθεί αρκετούς μήνες νωρίτερα στο ίδιο Νοσοκομείο, γεγονός που υποδηλώνει κάποια κλωνική σχέση μεταξύ των δύο στελεχών (3; Liu C. & Chambers H., 2003).

Επιπλέον, επανειλημμένες ανακαλλιέργειες του Mu3 σε άγαρ με αυξανόμενες συγκεντρώσεις βανκομυκίνης οδηγούσαν στην εμφάνιση υποπληθυσμών με επίπεδα αντοχής παρόμοια με αυτά του Mu 50 (Liu C. & Chambers H., 2003). Αυτό το *in vitro* φαινόμενο υποδηλώνει ότι του αποικισμού ή της λοίμωξης από VISA ίσως προηγείται λοίμωξη από hVISA και ότι η επανειλημμένη έκθεση στην βανκομυκίνη ίσως λειτουργεί σαν πίεση επιλογής η οποία ευνοεί την ανάπτυξη ενός ομοιογενώς ανθεκτικού πληθυσμού.

Ας σημειωθεί εδώ, ότι έχει παρατηρηθεί ετεροαντοχή και στην τεϊκοπλανίνη. Η πληθυσμιακή ανάλυση είναι η μέθοδος αναφοράς για την ανίχνευση των hetero-VRSA. Αναλύει 10^7 - 10^9 cfu's, σε αντίθεση με τις συμβατικές μεθόδους που αναλύουν περίπου 10^4 cfu's.



Λόγω χαμηλής πυκνότητας ενοφθαλμισμού, τα συμβατικά tests ευαισθησίας (Bauer-Kirby) δεν μπορούν να ανιχνεύσουν ποσοτικά τον ανθεκτικό υποπληθυσμό εντός των hetero-VRSA στελεχών, ο οποίος αντιπροσωπεύει μόλις το $1/10^{5-6}$ του συνολικού πληθυσμού (Hiramatsu K., 2001).

Αλλά και οι αυτοματοποιημένες μέθοδοι προσδιορισμού της ευαισθησίας δεν μπορούν να διαχωρίσουν τους VSSA από τους hetero-VRSA, με ό,τι αυτό συνεπάγεται για την επιτυχή έκβαση μιας θεραπείας με βανκομυκίνη (Whitener C. et al., 2004; Appelbaum P.C., 2006).

Κάποιες πρόσφατες αλλαγές στο λογισμικό της έκδοσης 7.01 του Vitek (BioMerieux) ίσως έχουν βελτιώσει την ικανότητα ανίχνευσης των VISA (Fred C. et al., 2001).

Η NCCLS συνιστά την χρήση BHI άγαρ που περιέχει 6 $\mu\text{g/ml}$ βανκομυκίνη (Vancomycin agar screening plate) (Chang S. et al., 2003; Appelbaum P.C., 2006). Όσον αφορά το μέγεθος ενοφθαλμισμού στο Vancomycin agar screening plate, το CDC προτείνει 10^6 CFU/ml. Προβληματισμός έχει επικρατήσει από το γεγονός ότι το στέλεχος Mu3 δεν αναπτύσσεται στο άγαρ αυτό. Για τον λόγο αυτό, οι Hiramatsu et al προτείνουν τον ενοφθαλμισμό 10^8 CFU/ml σε BHI άγαρ που περιέχει 4 $\mu\text{g/ml}$ βανκομυκίνη καθώς και πρόδρομες ουσίες του τοιχώματος (Mu3 supplement) (Fred C. et al., 2001).

Κάποιοι ερευνητές επεσήμαναν ότι 23 από τα 25 στελέχη που αναπτύχθηκαν σ' αυτό το τελευταίο άγαρ χαρακτηρίζονταν ως ευαίσθητα σύμφωνα με τα κριτήρια της NCCLS (MIC ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$) (Fred C. et al., 2001). Για τον λόγο αυτό, το 2006, η NCCLS (CLSI) τροποποίησε τα κριτήριά της για τον προσδιορισμό της MIC του *S.aureus* στην βανκομυκίνη: ένα στέλεχος *S.aureus* χαρακτηρίζεται πλέον ως ευαίσθητο όταν η MIC ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$, ως μετρίως ευαίσθητο όταν η MIC κυμαίνεται από 4-8 $\mu\text{g/ml}$ και ως ανθεκτικό όταν η MIC ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$. Επιπλέον τονίζει ότι σε στελέχη με ζώνη αναστολής ≤ 14 mm πρέπει να προσδιορίζεται η MIC με κάποια μέθοδο αναφοράς.

Υπάρχουν 2 τύποι hetero-VRSA στελεχών :

1. Σταθερός τύπος

Στον τύπο αυτό ανήκει το στέλεχος Mu3.

Εγκαθίσταται είτε ύστερα από επανειλημμένες εκθέσεις σε βανκομυκίνη είτε ύστερα από από μια σταθερή γενετική τροποποίηση (Hiramatsu K., 2001).



2. Ασταθής τύπος

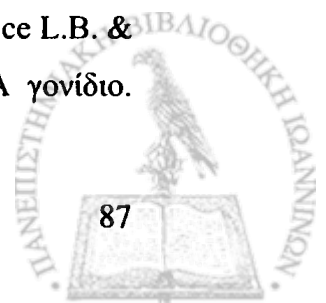
Τα στελέχη αυτά εκφράζουν ετεροαντοχή ευθύς εξαρχής μετά την απομόνωσή τους από ασθενείς στους οποίους χορηγείται βανκομυκίνη, όμως ο φαινότυπος αυτός χάνεται στην διάρκεια της συντήρησης των στελεχών αυτών σε μέσα ελεύθερα αντιβιοτικών.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι η αντοχή στην βανκομυκίνη στον VISA φαινότυπο έχει την τάση να «υποστρέφει». Πειράματα που έγιναν με 16 VISA στελέχη από όλον τον κόσμο έδειξαν ότι η MIC στην βανκομυκίνη επανερχόταν σε χαμηλά επίπεδα (2 mg/l) ύστερα από διαδοχικές ανακαλλιέργειες 10-84 ημερών. Τα 15 από τα 16 αυτά στελέχη εξακολουθούσαν να εμφανίζουν ετερογενή αντοχή παρόμοια με αυτήν του στελέχους Mu50, ενώ ένα καθίστατο εκ νέου ευαίσθητο. Όμως, έκθεση αυτών των στελεχών (revertants) σε 4 mg/l βανκομυκίνης είχε ως αποτέλεσμα την εκ νέου επιλογή VISA στελεχών με ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα ($10^{-4} - 10^{-5}$) (Hiramatsu K., 2001).

Σημειώνεται τέλος, ότι η έκφραση της αντοχής των hetero-VRSA στα γλυκοπεπτιδία επηρεάζεται από την έκθεσή τους στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Πρακτικά, όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, όταν χρησιμοποιούνται σε άριστες συγκεντρώσεις, αυξάνουν την αντοχή του στελέχους Mu3 στην βανκομυκίνη. Ο ανταγωνισμός αυτός, ο οποίος μπορεί να καταδειχθεί *in vitro*, θέτει ένα πρόβλημα για τον θεραπευτικό συνδυασμό βανκομυκίνης και β-λακταμικών αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση των VRSA. Αντίθετα, δεν παρατηρείται ανταγωνισμός μεταξύ β-λακταμικών και τεϊκοπλανίνης. Ο λόγος για την διαφορά αυτή δεν είναι γνωστός, ίσως όμως έχει να κάνει με το ότι υπάρχουν διαφορές στους μηχανισμούς αντοχής έναντι των δύο αυτών γλυκοπεπτιδίων (Hiramatsu K., 2001).

Το έτος 2002 είχαμε την απομόνωση των πρώτων VRSA στελεχών. Για πολλούς, η απομόνωση των στελεχών αυτών απετέλεσε το σημαντικότερο γεγονός των 20 τελευταίων ετών, όσον αφορά την βακτηριακή αντοχή (González-Zorn B. & Courvalin P., 2003).

Το πρώτο VRSA στέλεχος (στέλεχος Michigan/MI) απομονώθηκε στο Detroit τον Ιούνιο του 2002, ενώ το δεύτερο απομονώθηκε τον Οκτώβριο στο Hershey της Pennsylvania (στέλεχος PA/VRS2) (Chang S. et al., 2003; Appelbaum P.C., 2006). Εξαιρετική σημασία είχε το γεγονός ότι και στα δύο αυτά περιστατικά απομονώθηκε εκτός του VRSA και ένα στέλεχος *E.faecalis* με VanA φαινότυπο αντοχής (Rice L.B. & Bonomo R.A., 2005). Και τα δύο αυτά στελέχη VRSA έφεραν το VanA γονίδιο.



Κανένα από τα μέχρι τότε απομονωθέντα στελέχη VISA δεν έφεραν το γονίδιο αυτό ή κάποιο από τα γονίδια VanB, VanC, VanD ή VanE (Whitener C. et al., 2004; Smith Th.L. et al., 1999).

Είναι γνωστό ότι το VanA οπερόνιο εδράζεται σε τρανσποζόνια όπως το Tn1546, τα οποία γενικά ανευρίσκονται πάνω σε αυτομεταφερόμενα πλασμίδια (González-Zorn B. & Courvalin P., 2003).

Στο περιστατικό του Michigan απομονώθηκαν τα πλασμίδια του VRSA καθώς και του *E.faecalis* που απομονώθηκε στον ίδιο ασθενή. Ο VRSA έφερε ένα μονήρες πλασμίδιο μεγέθους 57.9 kb ενώ ο VRE έφερε 2 πλασμίδια των 45 και 95 kb. Τόσο στο σταφυλοκοκκικό όσο και στα εντεροκοκκικά πλασμίδια εντοπίστηκε η αλληλουχία Tn1546 (Chang S. et al., 2003; Weigel L.M. et al., 2003). Σύμφωνα με όλες τις ενδείξεις είχαμε μία μεταφορά του Tn1546 σε ένα συζευκτικό σταφυλοκοκκικό πλασμίδιο, το Plw1043, όπου και παρέμεινε (Rice L.B. & Bonomo R.A., 2005; Hiramatsu K. et al., 2004).

Και στην περίπτωση του VRS2 θεωρείται βέβαιη η οριζόντια μεταφορά του VanA από κάποιο άλλο στέλεχος VRE το οποίο είχε αποικίσει παλαιότερα τον ασθενή (Whitener C. et al., 2004).

Αξίζει να σημειωθεί εδώ, ότι αυτό το δεύτερο στέλεχος VRSA ήταν ευαίσθητο στην τεϊκοπλανίνη. Πρόκειται για ένα μη αναμενόμενο εύρημα δεδομένου ότι ο VanA φαινότυπος προσδίδει αντοχή και στα δύο γλυκοπεπτίδια. Δεδομένης και της χαμηλότερης M.I.C για την βανκομυκίνη την οποία εμφανίζει (32 µg/ml έναντι 1024 µg/ml του πρώτου στελέχους), ίσως στην περίπτωση του στελέχους αυτού να έχουμε ελαττωμένη έκφραση του VanA (Whitener C. et al., 2004).

Ιδιαίτερας μνείας χρήζει και το γεγονός ότι στο δεύτερο περιστατικό, ο ασθενής δεν είχε νοσηλευτεί σε Νοσοκομείο ούτε είχε λάβει βανκομυκίνη για τουλάχιστον μία πενταετία. Αυτό σημαίνει ότι οι VRSA κάνουν πλέον την εμφάνισή τους χωρίς να είναι απαραίτητη η πίεση επιλογής (selective pressure) από την χορήγηση βανκομυκίνης (Hiramatsu K. et al., 2004). Ίσως η συχνή χορήγηση άλλων αντιμικροβιακών παραγόντων να ασκεί επαρκή πίεση επιλογής ώστε να προάγεται ο αποικισμός και/ή η λοίμωξη με VRE και MRSA, που ενδεχόμενα οδηγούν στην εμφάνιση VRSA στελεχών (Whitener C. et al., 2004).



Το τρίτο στέλεχος VRSA, απομονώθηκε στην Νέα Υόρκη στις αρχές του 2004 (στέλεχος New York/VRS3) (Appelbaum P.C., 2006). Η M.I.C του VRS3 για την βανκομυκίνη ήταν 64 μg/ml. Με την χρήση PCR τεχνικών βρέθηκε και εδώ το VanA γονίδιο. Και στο στέλεχος αυτό, όπως και στο VRS2, οι μεγάλες διαφορές στην M.I.C για την βανκομυκίνη σε σχέση με το VRS1 θα μπορούσαν να αποδοθούν στον διαφορετικό βαθμό έκφρασης του VanA. Αυτός ο διαφορετικός βαθμός έκφρασης πιθανότατα σχετίζεται με το γεγονός ότι στην περίπτωση του 2^{ου} και του 3^{ου} στελέχους, το VanA εδράζεται σε ένα πλασμίδιο 120 kb, το οποίο αντιθέτως απουσιάζει στο VRS1 (Appelbaum P.C., 2006).

Μηχανισμός δράσης των γλυκοπεπτιδίων

Σε αντίθεση με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, των οποίων στόχος είναι οι PBPs, κύριος στόχος των γλυκοπεπτιδίων είναι τα τελικά διπεπτίδια D-Ala-D-Ala των μονομερών μουρεΐνης (Russel A.D. & Chopra I., 1996).

Η αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος από το γλυκοπεπτίδιο οφείλεται στον σχηματισμό συμπλέγματος ανάμεσα στο μόριο του αντιβιοτικού και στο C-τελικό άκρο του εν λόγω διπεπτιδίου. Η βανκομυκίνη δεν εισέρχεται εντός του κυτταροπλάσματος.

Επομένως, τα συμπλέγματα αυτά σχηματίζονται στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, μόλις η δομική μονάδα της πεπτιδογλυκάνης (GlcNAc-MurNAc-πλευρική πενταπεπτιδική αλυσίδα) εξέλθει από το κυτταρόπλασμα με την βοήθεια ενός λιπιδικού φορέα (Courvalin P., 2006).

Πιστεύεται ότι ο σχηματισμός συμπλέγματος διπεπτιδίου- αντιβιοτικού αναστέλλει τις αντιδράσεις που καταλύονται από τις τρανσγλυκοζιδάσες, τις τρανσπεπτιδάσες και τις D,D-καρβοξυπεπτιδάσες (Shlaes D.M. & Rice L.B., 1994; Arthur M. & Courvalin P., 1993). Διακόπτεται επομένως, τόσο ο «πολυμερισμός» των δομικών μονάδων όσο και ο επακόλουθος χιασμός (cross linking) των αλυσίδων πεπτιδογλυκάνης (Woodford N. et al., 1995).

Προκειμένου να συνδεθούν με τους στόχους τους, τα γλυκοπεπτίδια πρέπει να διασχίσουν περίπου 20 στρώματα πεπτιδογλυκάνης. Όμως, καθώς υπάρχουν πολλά ελεύθερα διπεπτίδια D-ala-D-ala (6×10^6 /κύτταρο) στα στρώματα πεπτιδογλυκάνης, πολλά μόρια γλυκοπεπτιδίου παγιδεύονται τελικά εντός αυτής.

Το γεγονός αυτό περιορίζει την θεραπευτική αποτελεσματικότητα των γλυκοπεπτιδίων.

Για παράδειγμα, αν σε έναν προσβεβλημένο ιστό υπάρχει μεγάλος αριθμός *S.aureus*, πολλά μόρια του χορηγούμενου γλυκοπεπτιδίου θα δεσμευτούν μεταξύ των στρωμάτων της πεπτιδογλυκάνης και η συγκέντρωση αντιβιοτικού στον ιστό θα είναι χαμηλότερη της απαιτούμενης (Hiramatsu K., 2001). Ως εκ τούτου, η φαρμακευτική θεραπεία ενός αποστήματος πρέπει κατά κανόνα να συνεπικουρείται από χειρουργική εξαίρεση ή παροχέτευσή του.

Για τον ίδιο ακριβώς λόγο, το test ευαισθησίας στα γλυκοπεπτιδία είναι περισσότερο περίπλοκο από το test ευαισθησίας στα λοιπά αντιβιοτικά, διότι μεταβολές στο μέγεθος ενοφθαλμισμού (inoculum size) επιφέρουν διακυμάνσεις της MIC.

Μηχανισμός αντοχής των σταφυλοκόκκων στην βανκομυκίνη

Σήμερα γνωρίζουμε ότι η πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος αποτελεί τον μείζονα μηχανισμό αντοχής των VISA στα γλυκοπεπτιδία.

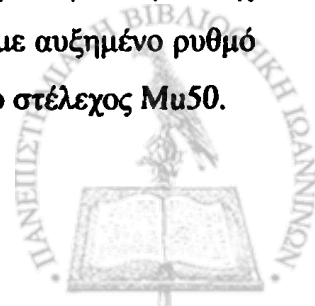
Αντιθέτως, η αντοχή των VRSA οφείλεται στην παρουσία οπερονίων τα οποία κωδικοποιούν για ένζυμα τα οποία :

- καταλύουν την σύνθεση διπεπτιδίων χαμηλής χημικής συγγένειας στα οποία η C-τελική D-Ala αντικαθίσταται από D-Lac ή D-Ser
- απομακρύνουν τα «ανταγωνιστικά» υψηλής χημικής συγγένειας διπεπτιδία D-Ala- D-Ala τα οποία παράγονται υπό κανονικές συνθήκες (Courvalin P., 2006).

Πρόκειται για τον ίδιο μηχανισμό αντοχής που παρατηρείται και στους VRE (vancomycin-resistant Enterococci). Για τον λόγο αυτό, θα περιγραφεί αναλυτικά στην αντίστοιχη παράγραφο.

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί μηχανισμοί που οδηγούν στην πάχυνση τού τοιχώματος :

Ο πρώτος μηχανισμός είναι η παραγωγή αυξημένων ποσοτήτων μονομερών μουρεΐνης, γεγονός που οδηγεί στον σχηματισμό περισσότερων στρωμάτων πεπτιδογλυκάνης (υπολογίζονται σε 30-40). Αποτέλεσμα της πάχυνσης αυτής είναι να παγιδούνται περισσότερα μόρια βανκομυκίνης μεταξύ των στρωμάτων της πεπτιδογλυκάνης αλλά και να απαιτούνται περισσότερα μόρια βανκομυκίνης προκειμένου να κορέσουν τα μονομερή μουρεΐνης που παράγονται με αυξημένο ρυθμό (Hiramatsu K., 2001). Ο πρώτος αυτός μηχανισμός παρατηρείται στο στέλεχος Mu50.



Ο δεύτερος μηχανισμός είναι ο ελαττωμένος ρυθμός ανακύκλωσης (turnover) των εξωτάτων-παλαιών στρωμάτων της πεπτιδογλυκάνης.

Υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί που συμβάλλουν, σε μικρότερο βαθμό, στην αντοχή του στελέχους Mu50. Ένας από τους μηχανισμούς αυτούς είναι η σύνθεση δομικά τροποποιημένων μονομερών μουρεΐνης (non amidated) τα οποία αποτελούν ανεπαρκή υποστρώματα για τον σχηματισμό γεφυρών πενταγλυκίνης. Η βιοσύνθεση αυτών των «ελαττωματικών» μονομερών οφείλεται στην κατανάλωση γλουταμίνης λόγω αυξημένης δραστηριότητας της συνθετάσης της 6-φωσφορικής γλουταμίνης, ενός ενζύμου της βιοσυνθετικής οδού των μονομερών μουρεΐνης (Hiramatsu K., 2001). Το τελικό αποτέλεσμα αυτής της αλληλουχίας γεγονότων είναι η αυξημένη αναλογία διπεπτιδίων D-ala-D-ala στο τοίχωμα της πεπτιδογλυκάνης (2.4 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τους VSSA). Αυτό σημαίνει ότι ένα στέλεχος Mu50, με ένα κυτταρικό τοίχωμα 1.5 φορά παχύτερο, μπορεί να παγιδεύσει 3.6 φορές περισσότερα μόρια βανκομυκίνης σε σχέση με τους VSSA (Hiramatsu K., 2001).

Βρέθηκε επίσης ότι τα τροποποιημένα μονομερή μουρεΐνης εμφανίζουν μεγαλύτερη χημική συγγένεια προς την βανκομυκίνη σε σχέση με τα φυσιολογικά, γεγονός που επίσης συμβάλλει στην αντοχή των στελεχών Mu50.

Η γενετική βάση της αντοχής στην βανκομυκίνη δεν έχει διαλευκανθεί ακόμη. Οι Hiramatsu et al έχουν ταυτοποιήσει κάποια νέα γονίδια, των οποίων η έκφραση στα Mu50 και Mu3 στελέχη είτε ενισχύεται είτε ελαττώνεται σε σχέση με τα VSSA. Είναι βέβαιο ότι θα έχουμε πολύ περισσότερες πληροφορίες μόλις ολοκληρωθεί το sequencing των στελεχών Mu50 και συγκριθούν με το N315, καθώς αυτό το τελευταίο είναι συγγενικό στέλεχος που διαφέρει σε λίγους μόνο φαινοτυπικούς χαρακτήρες όπως η αντοχή στην βανκομυκίνη.

Είναι πάντως ήδη γνωστό ότι η παρουσία του SCCmec στοιχείου δεν είναι απαραίτητη για την εμφάνιση αντοχής στην βανκομυκίνη. Πρόσφατα μάλιστα απομονώθηκε και ένα βανκομυκίνη-ανθεκτικό, μεθικιλίνη-ευαίσθητο στέλεχος, γεγονός που καταδεικνύει ότι η αντοχή στην βανκομυκίνη δεν περιορίζεται απαραίτητα στους MRSA (Hiramatsu K., 2001).

Αντοχή στην τεϊκοπλανίνη

Η τεϊκοπλανίνη έχει τον ίδιο μηχανισμό δράσης με την βανκομυκίνη. Επομένως, αναμένουμε τα δύο αυτά αντιβιοτικά να έχουν κοινό μηχανισμό αντοχής.

Πράγματι, όλα τα στελέχη VRSA που αναλύθηκαν ήταν ανθεκτικά και στην τεϊκοπλανίνη ($MIC \geq 8 \text{ mg/l}$). Είναι της αξιοσημείωτο το γεγονός ότι τα μισά περίπου στελέχη VRSA τα οποία κατέστησαν εκ νέου ευαίσθητα στην βανκομυκίνη (revertant), διατηρούσαν ενδιάμεση ευαισθησία στην τεϊκοπλανίνη ($MIC=8-16 \text{ mg/l}$).

Επομένως, ίσως υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί, εκτός από την πάχυνση του τοιχώματος, που συμβάλλουν στην αντοχή στην τεϊκοπλανίνη. Στην υπόθεση αυτή συμβάλλει, εκτός από το παραπάνω εύρημα, και το γεγονός ότι αρχικά (1990), εμφανίστηκαν στελέχη MRSA με ενδιάμεση ευαισθησία στην τεϊκοπλανίνη και ευαίσθητα στην βανκομυκίνη.

Έχει παρατηρηθεί ότι τεϊκοπλανίνη-ανθεκτικοί μεταλλάκτες *S.aureus* ($MIC=16 \text{ mg/l}$) υπερπαρήγαγαν PBP2' σε σχέση με το μητρικό στέλεχος. Υπερπαραγωγή PBP2' παρατηρείται και στα στελέχη Mu50 και Mu3 (αμφότερα τεϊκοπλανίνη-ανθεκτικά).

Οι Hiramatsu et al απέδειξαν ότι η πειραματική υπερπαραγωγή PBP2' σε ένα στέλεχος VSSA προκαλούσε αύξηση της MIC για την βανκομυκίνη κατά 1 mg/l (από 1 σε 2 mg/l) και σημαντική αύξηση της MIC για την τεϊκοπλανίνη (από 2 σε 82 mg/l). Της δείχνει και η οριακή αύξηση της MIC την οποία προκαλεί, η υπερπαραγωγή PBP2' από μόνη της δεν οδηγεί σε πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος.

Απ' την άλλη μεριά, αυξάνει τον ρυθμό του χιασμού (crosslinking) των αλυσίδων πεπτιδογλυκάνης (Hiramatsu K., 2001). Το εύρημα αυτό καταδεικνύει εκ νέου την διαφορά ανάμεσα στα δύο γλυκοπεπίδια. Ίσως η τεϊκοπλανίνη να αναστέλλει σε μεγαλύτερο βαθμό την τρανσπεπτιδίωση και η βανκομυκίνη να αναστέλλει περισσότερο την τρανσγλυκοσυλίωση (Hiramatsu K., 2001).



Βιολογική σημασία των hetero-VRSA

Από βιολογική σκοπιά, οι hetero-VRSA φαίνεται πως αντιπροσωπεύουν ένα επιτυχές οικολογικό επίτευγμα του *S.aureus* προκειμένου να εξασφαλίσει την επιβίωσή του απέναντι στην πίεση της βανκομυκίνης. Παρόλο που η βανκομυκίνη αναστέλλει το 99.9% της πληθυσμού hetero-VRSA, της πολύ μικρός υποπληθυσμός επιβιώνει και αναπτύσσεται παρουσία 4 mg/l βανκομυκίνης, τιμή η οποία αντιπροσωπεύει την μέγιστη συγκέντρωση που μπορεί να επιτευχθεί στην πλειονότητα των ιστών.

Προκειμένου να επιβιώσουν στην πίεση της βανκομυκίνης, τα στελέχη αυτά έπρεπε να συνθέτουν πεπαχυσμένα κυτταρικά τοιχώματα. Για να επιτύχουν αυτήν την πάχυνση, έπρεπε να συσσωρεύσουν πολλαπλές μεταλλάξεις προκειμένου να ενεργοποιήσουν μεταβολικές οδούς σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, να αυξήσουν την πρόσληψη θρεπτικών ουσιών και να «εκτρέψουν» την ροή μεταβολιτών της την κατεύθυνση της σύνθεσης συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος (Hiramatsu K. et al., 2004).

Είναι προφανές ότι η εμφάνιση των VISA υπήρξε το αποτέλεσμα της μακροχρόνιου εξελικτικού process. Επειδή οι VISA καταναλώνουν περισσότερη ενέργεια σε σχέση με της VSSA, αναπτύσσονται με πολύ βραδύτερους ρυθμούς. Το υψηλό ενεργειακό κόστος, καθώς και οι βιολογικοί περιορισμοί που επιβάλλει η ίδια η πάχυνση του τοιχώματος, έχουν καταστήσει την εξέλιξη των VISA αυτοπεριοριζόμενη ενώ αντίθετα, η VanA-μεσολαβούμενη αντοχή στην βανκομυκίνη είναι εξαιρετικά πλεονεκτική, τόσο από οικολογική όσο και από επιδημιολογική σκοπιά (González-Zorn B. & Courvalin P., 2003).

Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι η βανκομυκίνη και η αρμπεκασίνη (αμινογλυκοσίδη που εγκρίθηκε το 1990) δεν ήταν διαθέσιμες στην Ιαπωνία ως το 1991. Μέχρι τότε, η συνήθης θεραπευτική πρακτική για τις λοιμώξεις από MRSA, ήταν η χορήγηση β-λακταμικών αντιβιοτικών (imipenem, flomoxef και cefmetazole). Σύμφωνα με τα τότε δεδομένα (MIC), τα αντιβιοτικά αυτά ήταν αποτελεσματικά καθώς τα MRSA στελέχη των αρχών της δεκαετίας του '80 εμφάνιζαν ετερογενή αντοχή στην μεθικιλίνη (hetero-MRSA). Η πρακτική αυτή οδήγησε, περί τα τέλη της δεκαετίας, στην εμφάνιση κλώνου με υψηλού βαθμού αντοχή (κλώνος homo-MRSA ή κλωνότυπος IIA), ο οποίος κατέστη ο κυρίαρχος κλώνος την δεκαετία του '90.

Η in vitro επιλογή hetero-MRSA στελεχών είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση



homo-MRSA μεταλλακτών με συχνότητα $10^{-4} - 10^{-5}$. Εξαιρετικά ενδιαφέρουσα ήταν η παρατήρηση ότι ένα 5-10% των μεταλλακτών αυτών ήταν hetero-VRSA, γεγονός που δείχνει ότι οι hetero-VRSA στην Ιαπωνία της δεκαετίας του '80 ίσως προήλθαν από τα MRSA στελέχη της εποχής τα οποία υπέστησαν πίεση από τα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Και πράγματι, βρέθηκαν αρκετά στελέχη hetero-VRSA περί τα τέλη της δεκαετίας του '80, δηλαδή πολύ πριν την εισαγωγή της βανκομυκίνης στην χώρα αυτή. Προφανώς υπάρχει κάποιος κοινός μηχανισμός μετατροπής της ετεροαντοχής στην μεθικιλίνη σε ομοιογενή και των VSSA σε hetero-VRSA (Hiramatsu K., 2001).

A.8.6. Αντοχή του *S.aureus* στις αμινογλυκοσίδες

Ο κύριος μηχανισμός αντοχής του *S.aureus* στις αμινογλυκοσίδες είναι η ενζυμική τροποποίηση. Υπάρχουν και ελάσσονες μηχανισμοί αντοχής, όπως η ριβοσωματική τροποποίηση και η ελαττωμένη διαπερατότητα του βακτηριακού τοιχώματος.

Τα τροποποιητικά ένζυμα (modifying enzymes) κατατάσσονται σε 3 τάξεις ανάλογα με τον τύπο της τροποποίησης την οποία επιφέρουν : φωσφοτρανσφεράσες (APH), ακετυλοτρανσφεράσες (AAC) και νουκλεοτιδυλτρανσφεράσες (ANT). Κάθε τάξη χωρίζεται σε υποκατηγορίες με βάση την θέση της τροποποίησης και την ειδικότητα στο υπόστρωμα.

Συχνά τα ένζυμα αυτά είναι σε θέση να τροποποιήσουν περισσότερες της μιάς αμινογλυκοσίδες, κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο δεδομένης της μεγάλης ομοιότητάς τους.

Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί 8 γονίδια αντοχής. Συχνά ανευρίσκονται στο ίδιο στέλεχος περισσότερα του ενός γονίδια.

Ιδιαίτερη ανησυχία προκαλεί η ταχεία εξάπλωση του ενζύμου AAC(6') APH(2''). Το ένζυμο αυτό έχει διττή λειτουργία (bifunctional) και ανευρίσκεται στο τρανσποζόνιο Tn4001 των *S.aureus* και *E.faecalis*. Τα ευρήματα του sequencing υποδηλώνουν ότι το ένζυμο αυτό προήλθε από την «τήξη» δύο γονιδίων (Verhoef J. et al., 2004).

Σχετικά με την προέλευση των τροποποιητικών ενζύμων έχουν προταθεί δύο θεωρίες :



Σύμφωνα με την πρώτη, τα ένζυμα αυτά προέρχονται από τους ίδιους μικροοργανισμούς που συνθέτουν αμινογλυκοσίδες και εξασφαλίζουν την αυτοπροστασία τους έναντι του παραγόμενου από αυτά αντιβιοτικού.

Σύμφωνα με την δεύτερη, προήλθαν από μεταλλάξεις γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν για ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας (Moreillon P. et al., 2005).

Μοριακή εξέλιξη των MRSA

Σήμερα αναγνωρίζονται παγκοσμίως 5 κύριοι, «πανδημικοί» κλώνοι MRSA, στους οποίους εμπίπτει το 68 % περίπου όλων των στελεχών που απομονώνονται παγκοσμίως (Deurenberg R.H. et al., 2007; Oliveira D.C. et al., 2002; Oliveira D.C. et al., 2001).

Η αναγνώριση των κλώνων αυτών έγινε στα πλαίσια της πρωτοβουλίας CEMNET και επετεύχθη με τον συνδυασμό μοριακών μεθόδων τυποποίησης όπως ClaI :: mecA polymorphism, ClaI :: Tn554 insertion patterns και SmaI :: PFGE (Oliveira D.C. et al., 2002; Oliveira D.C. et al., 2001).

Οι κλώνοι αυτοί χαρακτηρίστηκαν ως ακολούθως :

- Ιβηρικός
- Βραζιλιάνικος
- Ουγγρικός
- Νέας Υόρκης / Ιαπωνίας
- Παιδιατρικός

Τα πρώιμα ευρωπαϊκά στελέχη MRSA από το Ηνωμένο Βασίλειο και την Δανία αποτελούν μέλη του λεγόμενου «αρχαϊκού» κλώνου, ο οποίος δεν υφίσταται πλέον και ο οποίος εμφανίζει μεγάλες ομοιότητες με τον Ιβηρικό κλώνο (Oliveira D.C. et al., 2001).

Το μείζον κριτήριο για την αρχική ταξινόμηση των MRSA στελεχών στους 5 προαναφερθέντες κλώνους ήταν το PFGE pattern. Πρόκειται για μια τεχνική υψηλής αναλυτικής ικανότητας, ικανή να καταγράψει γενετικές μεταβολές που επισυμβαίνουν σε βραχυπρόθεσμη κλίμακα όπως ανακατανομές (rearrangements), καθώς και πρόσκτηση ή απώλεια αλληλουχιών DNA. Αντίθετα, δεν είναι σε θέση να καταγράψει γενετικές μεταβολές που συσσωρεύονται βραδέως, όπως για παράδειγμα μεταβολές οφειλόμενες σε μεταλλάξεις (Oliveira D.C. et al., 2001).

Έτσι, προκειμένου να μελετηθούν οι μακροπρόθεσμες εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των MRSA στελεχών επανεξετάστηκαν αντιπροσωπευτικά στελέχη των 5 κλώνων με νεότερες τεχνικές όπως η MLST (Oliveira D.C. et al., 2001).

Με την χρήση της MLST ταυτοποιήθηκαν 2 μείζονα γενετικά υπόβαθρα, Α και Β.

Στο υπόβαθρο Α ταξινομήθηκαν τα ακόλουθα MLST profiles (Oliveira D.C. et al., 2001):

- profile 3-3-1-1-4-4-16 (υπόβαθρο Α1)
- profile 3-3-1-12-4-4-16 (υπόβαθρο Α2)
- profile 3-3-1-1-4-4-3 (υπόβαθρο Α3)
- profile 2-3-1-1-4-4-3 (υπόβαθρο Α4)

Το δεύτερο προγονικό υπόβαθρο, τελείως διαφορετικό από το πρώτο, με profile 1-4-1-4-12-1-10, ταυτοποιήθηκε σε MRSA στελέχη τα οποία αρχικά είχαν ταξινομηθεί στους κλώνους Νέας Υόρκης / Ιαπωνίας και Παιδιατρικό (Oliveira D.C. et al., 2002; Oliveira D.C. et al., 2001).

Σε μεταγενέστερες μελέτες συνδυάστηκαν και άλλες μέθοδοι ταυτοποίησης, όπως η SCCmec typing και η spaA typing. Και στις μελέτες αυτές επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη των 5 κύριων κλωνικών συμπλεγμάτων (Deurenberg R.H. et al., 2007; Enright M.C. et al., 2002).

Απο τους διάφορους συνδυασμούς μεθόδων τυποποίησης προέκυψαν πολλά ταξινομητικά σχήματα (MLST profile, Sequence type, clonal complex, SCCmec και spa type). Είναι βέβαιο ότι τα σχήματα αυτά θα υποστούν τροποποιήσεις προκειμένου να βρεθεί μια παγκόσμια αποδεκτή ονοματολογία (Deurenberg R.H. et al., 2007; Enright M.C. et al., 2002).

Η πλέον τρέχουσα ταξινόμηση, η οποία αποπειράται να «συγκεράσει» όλες τις παραπάνω, είναι αυτή που παρατίθεται στον πίνακα που ακολουθεί. Σύμφωνα με την ταξινόμηση αυτή υπάρχουν 5 μείζονα κλωνικά συμπλέγματα : CC5, CC8, CC22, CC30 και CC45. Κάθε κλωνικό σύμπλεγμα αποτελείται από μικρότερους κλώνους (ST's).

Περαιτέρω μελέτες αντιπροσωπευτικών στελεχών αυτών των 5 κλώνων έδειξαν ότι οι κλώνοι αυτοί εξελίχθηκαν από μόλις δύο διακριτά γενετικά υπόβαθρα (Oliveira D.C. et al., 2002).



Το 1ο προγονικό υπόβαθρο (background A) μπορεί να ανιχνευτεί στα πολύ πρώιμα Ευρωπαϊκά στελέχη MRSA, καθώς και στα MSSA στελέχη που εμφανίστηκαν στα νοσοκομεία της Δανίας περί τα τέλη της δεκαετίας του 50, δηλαδή λίγο πριν από την εισαγωγή των αντισταφυλοκοκκικών πενικιλινών στην θεραπευτική (Oliveira D.C. et al., 2002).

Ο πλέον αρχέγονος κλώνος του υπόβαθρου αυτού θεωρείται σήμερα ο ST-8 MSSA, ένας κλώνος ιδιαίτερα επιτυχής από οικολογική σκοπιά. Από σημειακή μετάλλαξη του ST-8 MSSA προήλθε ο ST-250 MSSA, ο οποίος ήταν κατά τα φαινόμενα ο πρώτος κλώνος ο οποίος ενσωμάτωσε το στοιχείο SCC mec τάξεως I (Gordon R. & Lowy F.D., 2008). Αυτός ήταν ο EMRSA κλώνος που ανιχνεύτηκε για 1^η φορά το 1961 στο Ηνωμένο Βασίλειο (ST 250 MRSA-I, «αρχαϊκός» MRSA) (Deurenberg R.H. et al., 2007; Oliveira D.C. et al., 2002; Enright M.C. et al., 2002). Σήμερα ο κλώνος αυτός είναι πολύ σπάνιος.

Η μελέτη της φύσεως των πρώιμων MRSA στελεχών κατέστη δυνατή χάρη στην μακρόπνοη στρατηγική υγείας της Δανίας να διαφυλάξει, από τα μέσα της δεκαετίας του 50, όλα ανεξαιρέτως τα στελέχη *S.aureus* που απομονώθηκαν από αιμοκαλλιέργειες (Hiramatsu K. et al., 2004). Τα στελέχη αυτά έφεραν παρόμοια μοριακά profiles με τα πρώιμα MRSA στελέχη που απομονώθηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο.

Χαρακτηριστικά των στελεχών αυτών ήταν :

- η χαμηλή M.I.C για την μεθικιλίνη (6-25 µg/ml)
- ετερογενής έκφραση αντοχής
- απουσία του ρυθμιστικού γονιδίου mecI
- απουσία του Tn554

Από τον ST-250 MRSA-I προήλθε, με σημειακή μετάλλαξη στο gmk, ο κλώνος ST 247-MRSA-I. Πρόκειται για έναν από τους πλέον διαδεδομένους κλώνους παγκοσμίως και αντιστοιχεί στον Ιβηρικό κλώνο, σύμφωνα με την παλαιά ονοματολογία (Enright M.C. et al., 2002). Ο ST-247-MRSA-I έχει αποκτήσει, σε σχέση με τον ST-250 MRSA-I, επιπρόσθετα γονίδια σε πλασμίδια (Pub110) και τρανσποζόνια (Tn554).

Έτσι, σε αντίθεση με τον περιορισμένο φαινότυπο αντοχής των αρχαϊκών στελεχών (PSTEM*), τα περισσότερα στελέχη του Ιβηρικού κλώνου είναι ανθεκτικά στα περισσότερα αντιβιοτικά πλὴν της κοτριμοξαζόλης και των γλυκοπεπτιδίων (*PSTEM : penicillin/Streptomycin/Tetracycline/Erythromycin/Methicillin). Άλλοι δύο σημαντικοί κλώνοι που προήλθαν από τον ST-8 MSSA είναι οι κλώνοι ST-8-MRSA-II και ST-8-MRSA-IV. Πιστεύεται πως οι κλώνοι αυτοί προήλθαν από πολλαπλές ανεξάρτητες εισχωρήσεις των στοιχείων SCCmec-II και SCCmec-IV αντίστοιχα εντός του ST-8 MSSA (Enright M.C. et al., 2002).

Ο 4^{ος} μείζων κλώνος εντός του CC8 είναι ST-239-MRSA-III. Αντιστοιχεί στον Βραζιλιάνικο κλώνο, σύμφωνα με την παλαιά ονοματολογία. Ο κλώνος αυτός προέκυψε από ομόλογο ανασυνδυασμό ενός τμήματος 557 kb του χρωμοσώματος του ST-30 και του χρωμοσώματος του ST-8-MRSA-III (Deurenberg R.H. et al., 2007).

Στον πίνακα 9 καταγράφονται οι κυριώτεροι κλώνοι MRSA σύμφωνα με διάφορα ταξινομητικά σχήματα (Deurenberg R.H. et al., 2007; Oliveira D.C. et al., 2002; Gordon R. & Lowy F.D., 2008).



Πίνακας 9. Οι κυριότεροι κλώνοι MRSA

ΚΛΩΝΟΣ ¹	MLST Profile ²	ST ³	CC ⁴	SCC mec	κατανομή
«αρχαϊκός»	3-3-1-1-4-4-16	250	8	I	DEN, GER, SW, UK, USA, ÖST
N.Γερμανία	1-4-1-4-12-24-29	228	5	I	BEL, DEN, GER, IT, SP, SW
UK EMRSA-3	1-4-1-4-12-1-10	5	5	I	NOR, POL, UK
Ιβηρικός, UK EMRSA-5 /-17	3-3-1-12-4-4-16	247	8	IA	BEL, DEN, FIN, FRA, GER, IT, NETH, POR
Ιρλανδικός-1	3-3-1-1-4-4-3	8	8	II	IR, UK, USA, AU
N.Υ/Ιαπωνία	1-4-1-4-12-1-10	5	5	II	AU, BEL, CAN, DEN, FIN, FRA, GER, IR, JAP
UK EMRSA 16, USA 200	2-2-2-2-3-3-2	36	30	II	ΕΛΛΑΣ, UK, USA, AU, BEL, CAN, FIN, DEN, IR, NOR, SP, SW, SWE,
Brazil/Hung, EMRSA 1/4/7/9/11	2-3-1-1-4-4-3	239	8	III	ΕΛΛΑΣ, AU, FIN, GER, BRAZ, POL, POR, ÖST
Berlin, USA 600	10-14-8-6-10-3-2	45	45	IV	AU, BEL, FIN, GER, HUN, NETH, NOR, SP, SWE, SW, USA
Παιδιατρικός, USA 800	1-4-1-4-12-1-10	5	5	IV	AU, DEN, FRA, NOR, POL, POR, SP, SWE, UK, USA
UK EMRSA 2/6, USA 300, USA 500	3-3-1-1-4-4-3	8	8	IV	AU, BEL, DEN, CZE, GER, IRE, NZeal
UK EMRSA 15	7-6-1-5-8-8-6	22	22	IV	UK, NOR, POR, SP, SWE

¹ αρχική / αυθαίρετη ονοματολογία

² αλληλόμορφα γονίδια των 7 loci: arC, aroE, glpF, gmK, pta, tri, yqiL

- 2 στελέχη MRSA εντάσσονται στο ίδιο κλωνικό σύμπλεγμα όταν οι αλληλουχίες στα 5 από τα 7 ανωτέρω γονίδια ταυτίζονται
- Κάθε κλώνος περιλαμβάνει στελέχη τα οποία φέρουν τον ίδιο ST /allelic profile

³ ST = sequence type /allelic profile

⁴ CC = clonal complex

EMRSA = Epidemic MRSA

* Η MLST / multilocus sequencing typing, σε αντίθεση με την PFGE, είναι κατάλληλη για μακροπρόθεσμες επιδημιολογικές μελέτες, καθότι ανιχνεύει μεταβολές οι οποίες συσσωρεύονται βραδέως (Enright M.C. et al., 2002; Enright M.C. et al., 2000).

Πράγματι, δύο στελέχη τα οποία φέρουν εμφανείς διαφορές στο PFGE pattern μπορούν να έχουν το ίδιο MLST pattern (Oliveira D.C. et al., 2001). Βασίζεται στην ανάλυση της αλληλουχίας τμημάτων μεγέθους 0.5 kb από 7 γονίδια του *S.aureus* : *atC*, *agoE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *trpI* και *yciL*. Τα τμήματα αυτά αντιπροσωπεύουν τον «σταθερό πυρήνα» του βακτηριακού χρωμοσώματος. Οι διαφορετικές αλληλουχίες εκάστου εξ αυτών των 7 τμημάτων χαρακτηρίζονται ως αλληλόμορφοι και κάθε στέλεχος ορίζεται από τους αλληλόμορφους και των 7 γονιδίων (allelic profile/sequence type-ST) (Enright M.C. et al., 2002; Enright M.C. et al., 2000). Δύο στελέχη *S.aureus* εντάσσονται στο ίδιο κλωνικό σύμπλεγμα (Clonal Complex) όταν 5 από τα 7 προαναφερθέντα γονίδια τους φέρουν ταυτόσημες αλληλουχίες (Deurenberg R.H. et al., 2007; Enright M.C. et al., 2002). Κάποιοι ερευνητές ενίσχυσαν το παραπάνω σχήμα ταυτοποίησης προσθέτοντας μια νέα ομάδα 7 άκρως μεταβλητών γονιδίων (*sas*). Κατασκεύασαν έτσι ένα πληρέστερο εξελικτικό μοντέλο των MRSA (Robinson D.A. & Enright M.C., 2003).

Επιδημιολογία των MRSA

Η διασπορά των MRSA είναι σήμερα παγκόσμια, τόσο στο νοσοκομειακό όσο και στο εξωνοσοκομειακό περιβάλλον.

Στη χώρα μας, τα ποσοστά των MRSA είναι υψηλά, ιδιαίτερα στα νοσοκομεία των μεγάλων αστικών κέντρων. Τα ποσοστά αυτά κυμαίνονται από 41% έως 50%, ποσοστά που είναι από τα υψηλότερα στην Ευρώπη (Πετεινάκη Ε.Α. & Μανιάτης Α.Ν., 2000).

Σε μελέτη στελεχών *S.aureus* που απομονώθηκαν από 7 νοσοκομεία της Ελλάδας στη διάρκεια του 1997 το ποσοστό των MRSA ήταν 41% (Kantzanou M. et al., 1999).

Στην Ευρωπαϊκή μελέτη SENTRY, στην οποία συμμετείχαν 25 Πανεπιστημιακά νοσοκομεία και η οποία διήρκησε από τον Απρίλιο του 1997 έως τον Φεβρουάριο του 1999, το ποσοστό των MRSA σε νοσοκομεία των Αθηνών ήταν της



τάξεως του 34% (Fluit A.C. et al., 2001).

Η επόμενη μελέτη SENTRY διήρκησε από τον Ιανουάριο του 1999 έως τον Δεκέμβριο του 2002 με την συμμετοχή 495 νοσοκομείων από 26 χώρες (Tiemersma E.W. et al., 2004). Τα ευρήματα της μελέτης αυτής παρατίθενται στον πίνακα 10.

**Πίνακας 10. Ποσοστά των MRSA σε διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες
(Στοιχεία EARSS / European Antibiotic Resistance Surveillance System)**

Χώρα	Αριθμός Νοσοκομείων	Αριθμός στελεχών	MRSA (%)
Αυστρία	11	656	8.8 %
Βέλγιο	36	2953	23.6 %
Δανία	22	2406	0.6 %
Φινλανδία	17	1990	1 %
Γαλλία	24	3376	33.1 %
Γερμανία	25	3757	13.8 %
Ιρλανδία	19	2897	41.2 %
Ηνωμένο Βασίλειο	27	5343	41.5 %
Σουηδία	54	6071	0.8 %
Ισπανία	35	2985	24.8 %
Πορτογαλία	15	1540	34.7 %
Ιταλία	57	3593	40.9 %
Ισραήλ	5	849	38.4 %
Μάλτα	1	240	43.8 %
Ελλάς*	19	1126	44.4 %

* περίοδος συμμετοχής: Ιανουάριος 1999 έως Δεκέμβριος 2001 και Ιούλιος 2002 έως Δεκέμβριος 2002

Τα σημαντικότερα συμπεράσματα των μελετών SENTRY είναι:

- Ο επιπολασμός (prevalence) των MRSA εμφανίζει σημαντικές διακυμάνσεις τόσο μεταξύ διαφορετικών χωρών όσο και μεταξύ νοσοκομείων της ίδιας χώρας.
- Στην Ευρώπη παρατηρείται μια διαβάθμιση συχνότητας από Βορρά προς Νότο. Έτσι, στις Σκανδιναβικές χώρες τα MRSA στελέχη είναι σπάνια (< 1%) ενώ στις μεσογειακές είναι πολύ συχνότερα (> 40%). Ο λόγος για τον χαμηλό επιπολασμό των MRSA σε μερικά νοσοκομεία πιθανότατα σχετίζεται με την ταχεία ταυτοποίηση και την αυστηρή πολιτική απομόνωσης των ασθενών που είναι αποικισμένοι με MRSA, σε συνδυασμό με την ορθολογική χρήση αντιβιοτικών (Fluit A.C. et al., 2001).

Σύμφωνα με όλες τις ενδείξεις, η επιδημιολογία των MRSA έχει αλλάξει (Chambers H.F., 2001). Την αλλαγή αυτή σηματοδότησε η εμφάνιση των MRSA στελεχών που προέρχονται από την κοινότητα (CA-MRSA /community-acquired). Ως MRSA στελέχη της κοινότητας (CA-MRSA) χαρακτηρίζονται τα στελέχη εκείνα τα οποία απομονώνονται από ασθενείς στα εξωτερικά ιατρεία ή σε ιατρεία που εξυπηρετούν την κοινότητα, ή από νοσηλευόμενους ασθενείς τις πρώτες 48 ώρες μετά την εισαγωγή τους. Επιπλέον, πρέπει οι ασθενείς αυτοί να μην έχουν ιστορικό λοίμωξης ή φορείας MRSA, ή ιστορικό νοσηλείας για ένα έτος, αιμοκάθαρσης, χειρουργικής επέμβασης, μόνιμου καθετήρα ή προσθετικού υλικού (Σπηλιοπούλου I., 2006; Deurenberg R.H. et al., 2007).

Η πρώτη επιδημία από CA-MRSA κατεγράφη το 1993 μεταξύ ιθαγενών της Δυτικής Αυστραλίας χωρίς καμία επαφή με νοσηλευτική μονάδα οποιασδήποτε βαθμίδας. Ακολούθησε η περιγραφή τεσσάρων θανατηφόρων κρουσμάτων νεκρωτικής πνευμονίας από CA-MRSA στις ΗΠΑ κατά την χρονική περίοδο 1997-1999.

Υπάρχουν πρόσφατες αναφορές ότι, εκτός από νεκρωτική πνευμονία, οι CA-MRSA προκαλούν λοιμώξεις στις οποίες ο *S.aureus* θεωρείται ασυνήθης αιτιολογικός παράγων (Gordon R. & Lowy F.D., 2008). Έχουν περιγραφεί περιστατικά νεκρωτικής περιτονίτιδας (fasciitis), πυομυοσίτιδας, κεραυνοβόλου πορφύρας και συνδρόμου Waterhouse-Friderichsen (Adem P.V. et al., 2005; Miler L.G. et al., 2005).



CA-MRSA και HA-MRSA (Hospital-acquired) παρουσιάζουν 3 βασικές διαφορές :

Η πρώτη διαφορά είναι ότι οι CA-MRSA, σε αντίθεση με τους HA-MRSA, είναι συνήθως ευαίσθητοι στα αντιβιοτικά πλύν των β-λακταμικών (Hiramatsu K. et al., 2002).

Όπως θα δούμε αναλυτικά στην συνέχεια, τα CA-MRSA στελέχη εμφανίζουν χαμηλές τιμές M.I.C στην οξακιλίνη (0.38-128 mg/l), με κίνδυνο να μην ταυτοποιηθούν αν δεν χρησιμοποιείται στο εργαστήριο κάποια μοριακή μέθοδος ανίχνευσης του γονιδίου *mecA* (Σπηλιοπούλου I., 2006).

Η δεύτερη διαφορά τους είναι ότι οι CA-MRSA είναι κατά κανόνα περισσότερο λοιμογόνοι. Στην διαφορά αυτή συμβάλλει πιθανώς η παραγωγή της τοξίνης PVL. Η συσχέτιση ανάμεσα στην παραγωγή PVL και στην αυξημένη λοιμογονικότητα χρήζει περαιτέρω διερεύνησης καθώς υπάρχουν διάφορες αντικρουόμενες απόψεις. Πρόσφατα περιεγράφησαν κάποια κυτταρολυτικά πεπτιδία (phenol-soluble modulins) τα οποία ίσως αποτελούν τους κύριους παράγοντες λοιμογονικότητας των CA-MRSA (Gordon R. & Lowy F.D., 2008).

Η τρίτη διαφορά των CA-MRSA από τους HA-MRSA είναι ότι οι πρώτοι εμφανίζουν μεγαλύτερη κλωνική ποικιλομορφία (Enright M.C. et al., 2002).

Στην Ευρώπη η πλειονότητα των CA-MRSA φέρει την γονιδιακή νησίδα SCC_{mec} τύπου IV και ακολουθεί ο τύπος V (Σπηλιοπούλου I., 2006).

Υπάρχουν αντικρουόμενες αναφορές για το κατά πόσο υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην νησίδα SCC_{mec} τύπου IV και στην παραγωγή PVL-τοξίνης. Σύμφωνα με κάποιους ερευνητές, οι CA-MRSA χαρακτηρίζονται από την νησίδα SCC_{mec} τύπου IV και η παραγωγή PVL αποτελεί σταθερό γνώρισμα τους.

Αντίθετα, κάποιοι άλλοι δεν βρήκαν καμία συσχέτιση ανάμεσα σε CA-MRSA, SCC_{mec} τύπου IV και PVL (Deurenberg R.H. et al., 2007).

Νεότερες μελέτες κατέδειξαν PVL-θετικά στελέχη CA-MRSA τα οποία έφεραν νησίδες SCC_{mec} τύπου I και III καθώς επίσης και PVL-θετικά HA-MRSA στελέχη.

Σήμερα εκτιμάται ότι λιγότερα από 5% των στελεχών MRSA που φέρουν νησίδες SCC_{mec} τύπου I-III παράγουν PVL, ενώ αντίθετα η PVL παράγεται από ένα σημαντικό ποσοστό στελεχών που φέρουν SCC_{mec} τύπου IV (40-90%) (Deresinski S., 2005).

Είναι βέβαιο ότι απαιτούνται περαιτέρω μελέτες προκειμένου να διαπιστωθεί η πιθανή σχέση μεταξύ SCCmec τύπου IV ή V και PVL. Τα CA-MRSA στελέχη που απομονώνονται σε διάφορα σημεία του πλανήτη διαφέρουν στον τύπο SCCmec, στα PFGE και MLST patterns καθώς και στα spa profiles.

Έτσι, έχουμε τον ST30 να κυριαρχεί μεταξύ των Αυστραλιανών και των Νοτιοαμερικανικών στελεχών, τον ST80 να κυριαρχεί μεταξύ των Ευρωπαϊκών και των στελεχών από την Μέση Ανατολή και τέλος, τους ST1(USA400), ST8 (USA300) και ST59 να κυριαρχούν μεταξύ των στελεχών που απομονώνονται στις ΗΠΑ (Deurenberg R.H. et al., 2007).

Ο επιπολασμός των CA-MRSA παγκοσμίως είναι ακόμα χαμηλός, όμως όλα δείχνουν ότι σταδιακά αυξάνεται.

Ένα ιδιαίτερα ανησυχητικό στοιχείο είναι ότι οι CA-MRSA φαίνεται να εξαπλώνονται και στα νοσοκομεία, και σε πολλά από αυτά αντικαθιστούν παλαιότερους ενδονοσοκομειακούς κλώνους (Σπηλιοπούλου Ι., 2006).

Σύμφωνα με τα πλέον πρόσφατα δεδομένα, ο επιπολασμός των CA-MRSA μεταξύ ατόμων που δεν φέρουν κανένα παράγοντα κινδύνου είναι 0.24% (Deurenberg R.H. et al., 2007).

Στην Ευρώπη, ο επιπολασμός των CA-MRSA κυμαίνεται από 0.03-1.5% (Deurenberg R.H. et al., 2007).

Στην Ελλάδα, η πρώτη αναφορά για CA-MRSA προέρχεται από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών (ΠΓΝΠ) (Σπηλιοπούλου Ι., 2006). Σε πολυκεντρική μελέτη που ακολούθησε, διάρκειας τριών ετών, παρατηρήθηκε η διασπορά των CA-MRSA στελεχών με αυξανόμενη συχνότητα τόσο στην κοινότητα όσο και στο ΠΓΝΠ, ιδίως στα χειρουργικά του τμήματα (Chini V. et al., 2006).

Τα CA-MRSA στελέχη που μελετήθηκαν στην Ελλάδα ανήκουν σε 2 κλώνους: η πλειονότητα στον ST80, τον Ευρωπαϊκό κυρίαρχο κλώνο, και στον ST5, που απομονώθηκε στην Λάρισα και στην Πάτρα στην διετία 2004-2005 (Σπηλιοπούλου Ι., 2006).

Η προέλευση των CA-MRSA αποτελεί σημείο διαφωνίας μεταξύ των ερευνητών. Σύμφωνα με ορισμένους οι CA-MRSA προέρχονται από νοσοκομειακά στελέχη (HA-MRSA). Αν έχει συμβεί κάτι τέτοιο, θα πρέπει οι CA-MRSA να έχουν υποστεί σημαντικές αλλαγές καθώς φέρουν διαφορετικά PFGE profiles από τους HA-



MRSA και επιπλέον έχουν απωλέσει την αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά (Chambers H.F., 2001). Σύμφωνα με τη δεύτερη ομάδα ερευνητών, οι CA-MRSA προήλθαν από οριζόντια μεταφορά νησίδων SCCmec σε ένα υπόβαθρο μεθικιλίνη-ευαίσθητων στελεχών (Ma X.X. et al., 2002; Ito T. et al., 2004).

Σε μια πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι ένας CA-MRSA και ένας HA-MRSA κλώνος έχουν κοινό προγονικό υπόβαθρο.

Στη διάρκεια της δεκαετίας του 50, ένας κλώνος *S.aureus* ανθεκτικός στην πενικιλίνη (ο phage type 80/81), έκανε την εμφάνισή του παγκοσμίως, τόσο σε νοσοκομεία όσο και στην κοινότητα. Ο κλώνος αυτός γρήγορα εξαλείφθηκε λόγω της εισαγωγής των πενικιλινασοάντοχων β-λακταμικών αντιβιοτικών την δεκαετία του 60. Απεδείχθη ότι ο κλώνος αυτός ήταν ο ST30-MSSA, ο οποίος παρήγαγε και PVL.

Ο κλώνος επανεμφανίστηκε και απέκτησε την νησίδα SCCmec τύπου IV, καθιστάμενος έτσι ο κύριος CA-MRSA κλώνος στην Αυστραλία (ST30-MRSA-IV).

Επιπροσθέτως, ο ST30-MSSA απέκτησε επίσης και την νησίδα SCCmec τύπου II, πιθανώς μέσω αρκετών ενδιάμεσων σταδίων, και κατέστη ο πανδημικός κλώνος EMRSA-16 (ST36-MRSA-II) (Deurenberg R.H. et al., 2007).

Ανακεφαλαιώνοντας, βλέπουμε σήμερα πως ακόμα και στην κοινότητα, οι MRSA έχουν αρχίσει να εκτοπίζουν τους MSSA και καθιερώνονται πλέον ως φυσιολογικοί αποικιστές του ανθρώπου (Hiramatsu K. et al., 2002). Αυτή η αλλαγή στην επιδημιολογία των MRSA φέρει σημαντικές ομοιότητες με την προηγούμενη σημαντική αλλαγή στην επιδημιολογία των σταφυλοκόκκων, όταν τα στελέχη *S.aureus* που παρήγαγαν πενικιλινάση εκτόπισαν από την ανθρώπινη χλωρίδα τα πενικιλίνη-ευαίσθητα στελέχη (Chambers H.F., 2001; Hiramatsu K. et al., 2002).

Πολλοί ερευνητές κάνουν λόγο και για μια δεύτερη ασυνήθη κατεύθυνση προς την οποία εξελίσσονται οι MRSA. Η κατεύθυνση αυτή αφορά τα νοσοκομειακά στελέχη και συνίσταται στην πρόσκτηση πολλαπλής αντοχής στα αντιβιοτικά, με δυσμενέστερη όλων την αντοχή στα γλυκοπεπτίδια (Peacock S.J., 2005). Πράγματι, τα τελευταία χρόνια καταγράφεται μια αύξηση της MIC του *S.aureus* στην βανκομυκίνη.

Μια μεγάλη μελέτη η οποία χρησιμοποίησε την βάση δεδομένων του προγράμματος SENTRY για την περίοδο 1997-2003 δεν κατέγραψε τέτοια αύξηση.

Το ποσοστό των στελεχών με MIC > 2 µg/ml κυμάνθηκε από 0 έως 0.1% κατ'έτος (Jones R.N., 2006).



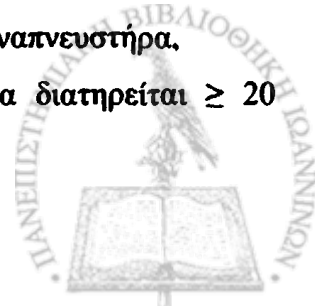
Σε κάποιες άλλες μελέτες όμως κατεδείχθη μια μικρή, πλὴν ὅμως σημαντική αύξηση της MIC στην βανκομυκίνη, τόσο των MRSA ὡς και των MSSA.

Ἡ μεγαλύτερη ἀπὸ τις μελέτες αυτές ἦταν μια ἀνάλυση 6000 στελεχῶν *S.aureus* τα οποία ἀπομονώθηκαν σε διάστημα μίας πενταετίας ἀπὸ ἓνα πανεπιστημιακὸ νοσοκομεῖο της California. Σύμφωνα με την μελέτη αὐτή το ποσοστὸ των στελεχῶν με MIC=1 μg/ml αὐξήθηκε ἀπὸ 19.9% το 2000 σε 70.4% το 2004 (P<0.01). Ὁ ἐπιπολασμὸς τόσο των VISA ὡς και των VRSA ἐξακολουθοῦσε να εἶναι ἐξαιρετικά χαμηλὸς (Wang G. et al., 2006). Το φαινόμενο αὐτὸ της «αναρρίχησης» της MIC του *S.aureus* στην βανκομυκίνη εἶναι ἰδιαίτερα ἀνησυχητικὸ καθὼς μια σειρά προσφάτων εργασιῶν ἀποδεικνύει ὅτι συνδέεται με αὐξημένα ποσοστά θεραπευτικῶν ἀποτυχιῶν καθὼς και με αὐξημένη θνησιμότητα (Sakoulas G. et al., 2004; Moise P.A. et al., 2007). Ἡ ἀνωτέρω συσχέτιση ἀνάμεσα στην αὐξηση της MIC και στην ἐλαττωμένη κλινικὴ ἀποτελεσματικότητά του φαρμάκου ἔχει να κάνει και με το γεγονός ὅτι ἡ συχνότητα των hVISA στελεχῶν αὐξάνει ὡς αὐξάνει ἡ MIC. Ἐκτιμᾶται ὅτι το ποσοστὸ των hVISA αὐξάνεται ἀπὸ 57% σε 81% και 100% ὅταν ἡ MIC αὐξάνεται ἀπὸ 1 σε 2 και 4 μg/ml ἀντίστοιχα (Sakoulas G. & Moellering R.C. Jr, 2008). Εἶναι ἀπολύτως τεκμηριωμένο ὅτι και ἡ ἑτεροαντοχή στην βανκομυκίνη συνδέεται με πτωχὴ κλινικὴ ἔκβαση (outcome) (Liu C. & Chambers H., 2003). Ἐτσι, με δεδομένο ὅτι ἡ ἀνίχνευση των hVISA εἶναι ἐξαιρετικά προβληματικὴ, ἡ χρῆση της βανκομυκίνης σε λοιμῶξεις ἀπὸ MRSA στελέχη με Vancomycin MIC > 1 μg/ml πρέπει να γίνεται με μεγάλη προσοχή.

Ὁ προσδιορισμὸς της MBC των στελεχῶν αὐτῶν θεωρεῖται πλέον ἐπιβεβλημένος, ἐιδικά στις περιπτώσεις βακτηραιμίας και ἐνδοκαρδίτιδας (Jones R.N., 2006). Ὁ καλύτερος δείκτης της ἀποτελεσματικότητάς της βανκομυκίνης ἐναντι ἐνὸς συγκεκριμένου στελέχους *S.aureus* θεωρεῖται ὁ λόγος AUC/MIC (AUC= area under concentration curve) (Soriano A. et al., 2008).

Πολλοὶ ἐιδικοί συνιστοῦν την χορήγηση της βανκομυκίνης σε υψηλές δόσεις προκειμένου να αὐξήσουμε την ἀποτελεσματικότητά της και προκειμένου να παρεμποδίσουμε την ἀνάπτυξη ἀντοχής.

Για παράδειγμα, σύμφωνα με τις οδηγίες της American Thoracic Society για την θεραπεία της νοσοκομειακῆς πνευμονίας και της πνευμονίας ἀπὸ ἀναπνευστήρα, ἡ ἐλάχιστη (trough) συγκέντρωση της βανκομυκίνης πρέπει να διατηρεῖται ≥ 20



μg/ml. Υπήρξαν πάντως κάποιες εργασίες σύμφωνα με τις οποίες αυτή η κλιμάκωση των δόσεων δεν επιφέρει κάποιο θεραπευτικό όφελος.

Σύμφωνα με κάποιες άλλες τέλος, διατηρώντας ελάχιστη συγκέντρωση βανκομυκίνης > 10 μg/ml αποφεύγεται η επιλογή hVISA στελεχών (Sakoulas G. & Moellering R.C. Jr, 2008).

A.9. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ *S.aureus*

Η αντιμικροβιακή θεραπεία των λοιμώξεων από *S.aureus*, πρέπει, σε κάθε περίπτωση, να κατευθύνεται με βάση το test ευαισθησίας του συγκεκριμένου στελέχους (Bamberg D.M. & Boyd S.E., 2005).

Κεφαλαιώδους σημασίας και άμεσης προτεραιότητας είναι η διάνοιξη και παροχέτευση του αποστήματος ή των αποστημάτων που πιθανόν να υπάρχουν, μια πρακτική γνωστή της ιατρούς πολύ πριν από την έλευση της πενικιλίνης (Grayson M.L., 2006).

Τα λακταμασοπαραγωγά, μεθικιλίνη-ευαίσθητα στελέχη *S.aureus* (MSSA), αντιμετωπίζονται με κάποια ημισυνθετική πενικιλίνη της ναφκιλλίνη Ε.Φ ή δικλοξακιλλίνη per os. Οι κεφαλοσπορίνες 1^{ης} γενεάς της κεφαλεξίνη per os και κεφαζολίνη Ε.Φ αποτελούν καλές εναλλακτικές λύσεις (Bamberg D.M. & Boyd S.E., 2005).

Η βανκομυκίνη δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για την θεραπεία λοιμώξεων από MSSA στελέχη παρά μόνο εάν ο ασθενής είναι αλλεργικός στην πενικιλίνη. Οι λόγοι είναι αφενός μεν η αποφυγή της κατάχρησης του φαρμάκου αυτού και αφετέρου το γεγονός ότι η απάντηση στην χορήγηση βανκομυκίνης μπορεί να είναι βραδεία (Bamberg D.M. & Boyd S.E., 2005).

Στην θεραπεία των λοιμώξεων από MRSA, η βανκομυκίνη κατέχει δεσπόζουσα θέση. Είναι πιθανό, καθώς οι κλινικές δοκιμές με τα νέα αντιβιοτικά πληθαίνουν, αυτή η επιλογή της βανκομυκίνης ως αντιβιοτικού εκλογής να αλλάξει (Chandy C.J. & Schreiber J.R., 2006).

Οι CA-MRSA (της κοινότητας) εμφανίζονται σε σημαντικά ποσοστά ευαίσθητοι στην τριμεθοπρίμη-σουλφομεθοξαζόλη, στην κλινδαμυκίνη καθώς και στην δοξυκυκλίνη. Μπορούμε επομένως να λάβουμε υπ' όψιν της παράγοντες της στην εμπειρική θεραπεία των λοιμώξεων από CA-MRSA (Grayson L.M., 2006).

Σε μια πρόσφατη εργασία, η λινεζολίδα απεδείχθη εξίσου αποτελεσματική με την βανκομυκίνη στην θεραπεία σταφυλοκοκκικής βακτηριαμίας (Chandy C.J. & Schreiber J.R., 2006).

Αντίθετα, στην πνευμονία από HA-MRSA (νοσοκομειακούς), και πιθανώς και στην πνευμονία από CA-MRSA, υπάρχουν ενδείξεις ότι η βανκομυκίνη μπορεί να είναι υποδεέστερη της λινεζολίδης. Σε μια ανάλυση 2 διπλών-τυφλών μελετών ασθενών με νοσοκομειακή πνευμονία από HA-MRSA, διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς που έλαβαν λινεζολίδα εμφάνιζαν και υψηλότερους δείκτες επιβίωσης και υψηλότερους δείκτες κλινικής ίασης (clinical cure rates) (Wunderink R.G. et al., 2003). Για MRSA πνευμονία από αναπνευστήρα, η American Thoracic Society συγκαταλέγει την λινεζολίδα μαζί με την βανκομυκίνη στα φάρμακα εκλογής. Για την νεκρωτική πνευμονία από CA-MRSA τα δεδομένα για την λινεζολίδα είναι σχετικά περιορισμένα. Σε μια μελέτη βρέθηκε ότι ασθενείς με νεκρωτική πνευμονία οι οποίοι δεν ανταποκρίθηκαν στην βανκομυκίνη παρουσίασαν βελτίωση της κλινικής κατάστασης όταν έλαβαν κλινδαμυκίνη ή λινεζολίδα. Οι συγγραφείς της συγκεκριμένης μελέτης τονίζουν την σημασία της θεραπείας με αντιμικροβιακά φάρμακα τα οποία αναστέλλουν την παραγωγή PVL εξωτοξίνης (Micek S.T. et al., 2005).

Στον πίνακα 11 παρατίθενται κάποια τρέχοντα θεραπευτικά σχήματα για λοιμώξεις από *S.aureus* (Bamberg D.M. & Boyd S.E., 2005).



Πίνακας 11. Θεραπεία λοιμώξεων από *S.aureus*

Τύπος λοίμωξης	Αντιβιοτικό εκλογής	Εναλλακτικές επιλογές	Διάρκεια θεραπείας
Απλές, μη επιπεπλεγμένες λοιμώξεις δέρματος			
MSSA	Cephalexin Dicloxacillin	Clindamycin	5-7 ημέρες
MRSA	Clindamycin TMP/SMX Linezolid	-	
Επιπεπλεγμένες λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων			
MSSA	Nafcillin	Cefazolin Clindamycin	2-4 εβδομάδες
MRSA	Vancomycin	Linezolid Daptomycin	
Βακτηριαμία			
MSSA	Nafcillin	Cefazolin Vancomycin	2-4 εβδομάδες
MRSA	Vancomycin	Linezolid Daptomycin	
Λοιμώξεις από καθετήρες			
MSSA	Nafcillin	Cefazolin Vancomycin	2 εβδομάδες επι απουσίας ενδοκαρδίτιδος
MRSA	Vancomycin	Linezolid Daptomycin	
Οστεομυελίτις			
MSSA	Nafcillin Cefazolin	Clindamycin Κινολόνη + Rif	4-6 εβδομάδες
MRSA	Vancomycin	Linezolid Daptomycin	
Πνευμονία			
MSSA	Nafcillin	Vancomycin Clindamycin	10-14 ημέρες
MRSA	Vancomycin Linezolid	-	

B. *Enterococcus* spp

B.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Ο όρος «Εντεροκόκκος» πιθανότατα προέκυψε ταυτόχρονα με την ανακάλυψη του πρώτου μικροοργανισμού : Ο Thiercelin (1899) χρησιμοποίησε τον όρο για να περιγράψει βακτήρια που διατίθενται σε ζεύγη ή σε βραχείες αλυσίδες και παρατηρούνται στα κόπρανα.

Η ονομασία *Streptococcus faecalis* χρησιμοποιήθηκε από τους Andrews και Horder (1906) για να ταυτοποιήσουν έναν μικροοργανισμό κοπρανώδους προέλευσης ο οποίος προκαλούσε πήξη του γάλακτος και ζύμωνε την μαννιτόλη και την λακτόζη αλλά όχι την ραφινόζη.

Ο Orla-Jensen (1919) περιέγραψε έναν δεύτερο μικροοργανισμό, τον *S.faecium* ο οποίος διέφερε από τον *S.faecalis* στα ζυμωτικά patterns.

Ένα τρίτο είδος, ο *S.durans*, περιεγράφη από τους Sherman και Wing(1935) και εμφανίζει πολλές ομοιότητες με τον *S.faecium* αλλά έχει μικρότερη ζυμωτική δραστηριότητα.

Ο όρος «ομάδα των Εντεροκόκκων» χρησιμοποιήθηκε από τον Sherman (1938) για να περιγράψει τους στρεπτοκόκκους εκείνους που μπορούσαν να αναπτυχθούν μεταξύ 10 και 45⁰ C, σε ζωμό με PH 9.6 και σε ζωμό που περιέχει NaCl 6.5%, ενώ μπορούσαν να επιβιώσουν στους 60⁰ C για 30 min. Η «ομάδα των Εντεροκόκκων» του Sherman περιελάμβανε όλα τα γνωστά είδη εντεροκόκκων εκείνης της εποχής. Οι υπόλοιπες ομάδες του Sherman ήταν η ομάδα των «πυογόνων», η ομάδα «του γαλακτικού οξέος» (*S.lactis* και *S.cremoris*) και οι «πρασινίζοντες».

Το 1967 οι Nowlan και Deibel προσέθεσαν τον *S.avium* στο group των εντεροκόκκων.

Το 1970 ο Kalina πρότεινε την δημιουργία ενός ξεχωριστού γένους με βάση την κυτταρική δομή και τους φαινοτυπικούς χαρακτήρες που θα περιελάμβανε τα είδη *S.faecalis* και *S.faecium* καθώς και τα υποείδη τους. Καμία πρωτοβουλία δεν πάρθηκε πάνω στην πρόταση αυτή και η χρήση της ονομασίας "*Streptococcus*" συνεχίστηκε.

Γενετικές αναλύσεις από τους Schleifer και Kilpper-Balz (1984) κατέδειξαν ότι οι *S. faecalis* και *S. faecium* διαφέρουν επαρκώς από τα άλλα μέλη του γένους ώστε να μπορούν να ταξινομηθούν σε ένα ξεχωριστό γένος.

B.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Τα είδη *S. faecalis* και *S. faecium* αποσπάστηκαν το 1984 από το γένος *Streptococcus* προκειμένου να σχηματίσουν το γένος *Enterococcus*. Από τότε, άλλα δεκαεπτά (17) είδη έχουν προταθεί για να συμπεριληφθούν στο γένος *Enterococcus*. Οι προτάσεις βασίστηκαν σε μελέτες με DNA /DNA και DNA /rRNA υβριδισμό καθώς και με sequencing της υπομονάδας 16S του rRNA.

Σύμφωνα με το Bergey's manual, τα είδη που προτάθηκαν προς ένταξη στο γένος *Enterococcus* καθώς και οι συγγραφείς που τα περιέγραψαν είναι :

- E. faecalis* / Schleifer και Kilpper-Balz 1984
- E. faecium* / Schleifer και Kilpper-Balz 1984
- E. avium* / Collins et al 1984
- E. casseliflavus* / Collins et al 1984
- E. durans* / Collins et al 1984
- E. gallinarum* / Collins et al 1984
- E. malodoratus* / Collins et al 1984
- E. hirae* / Farrow και Collins 1985
- E. mundtii* / Collins, Farrow και Jones 1986
- E. raffinosus* / Collins et al 1989
- E. solitarius* / Collins et al 1989
- E. pseudoavium* / Collins et al 1989
- E. cecorum* / Williams et al 1989
- E. columbae* / Devriese et al 1990
- E. saccharolyticus* / Rodrigues και Collins 1990
- E. dispar* / Collins et al 1991
- E. sulfureus* / Martinez-Murcia και Collins 1991
- E. seriolicida* / Kusuda et al 1991
- E. flavescens* Pompei et al 1992



B.3. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

B.3.1. Μορφολογία

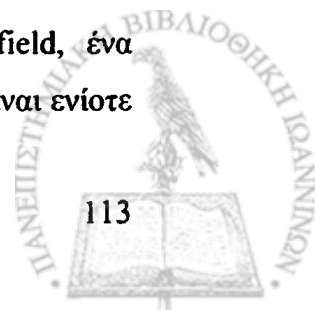
Gram θετικοί κόκκοι που διατάσσονται κατά μόναν, σε ζεύγη ή βραχείες αλυσίδες. Εμφανίζονται ως κοκκοβάκιλλοι όταν η χρώση Gram γίνεται από αποικίες σε άγαρ ενώ εμφανίζονται περισσότερο ωοειδείς όταν η Gram χρώση γίνεται από κάποιο θρεπτικό ζωμό. Ακίνητα με εξαίρεση τους *E.gallinarum* & *E.casseliflavus*. Μη σπορογόνα. Κάποιες αποικίες (περίπου το 1/3) εμφανίζουν β-αιμόλυση σε άγαρ που περιέχει ερυθρά ίππου, κονίκλου ή ανθρώπου, ενώ δεν εμφανίζουν αιμόλυση σε άγαρ που περιέχει ερυθρά προβάτου. Κάποιες αποικίες *E.durans* είναι β-αιμολυτικές ανεξαρτήτως τύπου άγαρ. Όλα τα υπόλοιπα είδη είναι μη αιμολυτικά ή α-αιμολυτικά. Τα στελέχη που εμφανίζονται ως α-αιμολυτικά είναι στην πραγματικότητα μη αιμολυτικά στελέχη που παράγουν H₂O₂ (Texeira L.M. & Facklam R.R., 2005).

B.3.2. Φυσιολογία-Μεταβολισμός

Είναι προαιρετικώς αναερόβιοι με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 35⁰ C και εύρος ανάπτυξης μεταξύ 10 και 45⁰ C. Όλοι αναπτύσσονται σε ζωμό που περιέχει NaCl 6.5%, υδρολύουν την εσκουλίνη παρουσία χολικών αλάτων 40 % (bile-aesculin άγαρ).

Οι περισσότεροι εντερόκοκκοι, με εξαίρεση τα είδη *E.cecorum*, *E.columbae* και *E.saccharolyticus*, υδρολύουν την πυρολιδονυλ-β-ναφθυλαμίδα (PYR) ενώ όλα τα στελέχη παράγουν αμινοπεπτιδάση της λευκίνης (LAP). Δεν περιέχουν κυτοχρώματα, όμως περιστασιακά μπορεί να παράγουν μια ψευδο-καταλάση και να δίνουν μια ασθενώς θετική αντίδραση. Συνήθως δεν ανάγουν τα νιτρικά, δεν πέπτουν την κυτταρίνη και την πηκτίνη και δεν υδρολύουν τα τριγλυκερίδια, παρά το γεγονός ότι έχουν ανιχνευτεί λιπάσες σε σπάνια στελέχη όλων των ειδών (Bridge & Sneath, 1983). Μόνο ένας πρωτεολυτικός βióτυπος του *S.faecalis* πέπτει την ζελατίνη και την καζεΐνη. Σε όλα σχεδόν τα στελέχη το τελικό προϊόν ζύμωσης της γλυκόζης είναι το γαλακτικό οξύ, ενώ δεν παράγεται αέριο.

Τα περισσότερα στελέχη παράγουν το αντιγόνο D κατά Lancefield, ένα λιποτειχοϊκό οξύ του κυτταρικού τοιχώματος του οποίου όμως η ανίχνευση είναι ενίοτε



δύσκολη και εξαρτάται τόσο από τον τρόπο εξαγωγής (extraction) του ενζύμου όσο και από την ποιότητα του χρησιμοποιούμενου αντιορού (Facklam & Washington 1991, Knudtson & Hartman 1993). Η περιεκτικότητα του DNA σε G + C κυμαίνεται από 37 – 45 mol %.

Οι διατροφικές απαιτήσεις των εντεροκόκκων είναι περίπλοκες. Η σχετική βιβλιογραφία είναι ακόμα πτωχή. Οι περισσότερες μελέτες πραγματοποιήθηκαν πάνω στον *E. faecalis* και σε κάποιες περιπτώσεις κάποια στελέχη ταυτοποιήθηκαν λάθος. Οι διατροφικές απαιτήσεις περιλαμβάνουν βιταμίνες του συμπλέγματος Β, αζωτούχες βάσεις και μια πηγή άνθρακα, συνήθως γλυκόζη. Σύμφωνα με μια από τις πλέον πρόσφατες εργασίες όλα τα στελέχη *E. faecalis* που μελετήθηκαν είχαν απόλυτη ανάγκη για ιστιδίνη, ισολευκίνη, μεθειονίνη και τρυπτοφάνη. Αντίθετα, ορισμένα μόνο στελέχη είχαν απόλυτη ανάγκη και για αργινίνη, γλυκίνη, γλουταμικό οξύ, λευκίνη και βαλίνη. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχουν διαφορές από στέλεχος σε στέλεχος, όσον αφορά τις διατροφικές απαιτήσεις. Οι έντονες πιέσεις επιλογής από μέρους των αντιβιοτικών δημιούργησαν άτυπες διατροφικές απαιτήσεις όπως για παράδειγμα στελέχη που απαιτούν βανκομυκίνη (vancomycin-requiring) (Teixeira L.M. & Facklam R.R., 2005).

B.4. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ

Οι εντερόκοκκοι είναι ευρέως διαδεδομένοι στη φύση. Ανευρίσκονται στα φυτά, στο έδαφος και στο νερό. Ανευρίσκονται επίσης σε πτηνά, έντομα και ερπετά.

Στον άνθρωπο και σε άλλα θηλαστικά, οι εντερόκοκκοι είναι αποικιστές του εντερικού σωλήνα (Moellering R.C. Jr, 2005). Συχνά, σε έναν συγκεκριμένο ξενιστή κυριαρχεί ένα είδος, γεγονός που ίσως σχετίζεται με την ηλικία. Στις περισσότερες εργασίες, ο *E. faecalis* αποτελεί το κυρίαρχο είδος στον άνθρωπο (Teixeira L.M. & Facklam R.R., 2005). Ορισμένα νοσήματα, όπως η ελκώδης κολίτις, μπορούν να διαταράξουν την φυσιολογική χλωρίδα, αυξάνοντας τον αποικισμό από εντεροκόκκους.

Μελέτες σε ζώα έδειξαν ότι ο αποικισμός επηρεάζεται και από παράγοντες του ξενιστού. Για παράδειγμα, ο *E. faecium* αποτελεί το κυρίαρχο είδος στα βοοειδή. Φυσικό habitat των εντεροκόκκων θεωρείται ο εντερικός σωλήνας, ενίοτε όμως ανευρίσκονται και στο κατώτερο γεννητικό σύστημα καθώς και στην στοματική κοιλότητα (Moellering R.C. Jr, 2005).



Οι εντεροκόκκοι ζωϊκής προέλευσης συχνά δίνουν άτυπες αντιδράσεις σε διαγνωστικά σημαντικές δοκιμασίες ζύμωσης υδατανθράκων. Αυτές περιλαμβάνουν την ζύμωση της ραφινόζης από τον *E.faecium* που απομονώνεται από πουλερικά και την ζύμωση της σορβιτόλης από τον *E.faecium* που απομονώνεται από σκύλους.

Η ύπαρξη αυτών των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών (ecovars) θα μπορούσε να αποβεί χρήσιμη για την διερεύνηση μιας πιθανής μεταφοράς στελεχών από ζώα σε ανθρώπους. Η προταθείσα από πολλούς ζωϊκή προέλευση των βανκομυκίνη-ανθεκτικών *E.faecium* (Klare et al.,1995, Aarestrup,1995), ίσως εξηγεί την εμφάνιση άτυπων φαινοτυπικών αντιδράσεων σε κλινικά στελέχη.

Υπάρχει ομοφωνία ως προς το ότι η παρουσία των εντεροκόκκων στο έδαφος και στο νερό αντιπροσωπεύει επιμόλυνση από ζωϊκές ή φυτικές πηγές. Η ικανότητά τους να επιβιώνουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα και κάτω από ακραίες συνθήκες έστρεψε το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών να αξιολογήσουν αν θα μπορούσαν να αποτελέσουν καλύτερο δείκτη μόλυνσης του νερού από τα εντεροβακτηριακά.

B.5. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Η ικανότητα των εντεροκόκκων να προξενούν λοίμωξη αμφισβητήθηκε πολύ στο παρελθόν και πολλοί τους χαρακτηρίζουν ακόμα ως χαμηλής λοιμογονικότητας (Morrison D., 2002).

Παραδόξως, λίγα είναι γνωστά για τους λοιμογόνους παράγοντες των εντεροκόκκων. Παρά την σημασία του *E.faecium* στις λοιμώξεις, οι περισσότερες διαθέσιμες πληροφορίες για τους παράγοντες λοιμογονικότητας των εντεροκόκκων αφορούν τον *E.faecalis*. Οι παράγοντες που έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι η ζελατινάση, οι κυτταρολυσίνες, η ουσία συσσώρευσης και οι προσκολλησίνες (Teixeira L.M. & Facklam R.R., 2005).

Οι επιβεβαιωμένοι καθώς και οι πιθανοί παράγοντες λοιμογονικότητας των εντεροκόκκων περιλαμβάνουν :

- κυτταρολυσίνες με δράση αιμολυσίνης και βακτηριοσίνης (bacteriocin)
- πρωτεολυτικά ένζυμα με δράση ζελατινάσης και πρωτεάσης σερίνης
- προσκολλησίνες (adhesins) ειδικές για κάθε στέλεχος, όπως η ουσία συσσώρευσης (aggregation substance), η πρωτεΐνη επιφανείας Esp, η Ace του *E.faecalis* (collagen



bindind adhesin) και η EfaA (*E.faecalis* antigen A)

- λιποτειχοϊκά οξέα

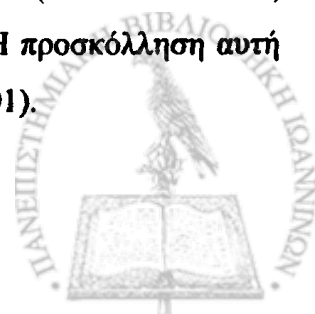
Πρόσφατα περιεγράφη το *fsr* locus, το οποίο συνδέεται με αυξημένη λοιμογονικότητα. Αποτελείται από 3 γονίδια και έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει την μεταγραφή τουλάχιστον δύο γονιδίων, της ζελατινάσης (*gelE*) και της πρωτεάσης της σερίνης (*sprE*). Η παραγωγή biofilm από τον *E.faecalis* επίσης ρυθμίζεται από το locus αυτό και ίσως παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην ικανότητα των στελεχών αυτών να αποικίζουν τις καρδιακές βαλβίδες καθώς και αγγειακούς και ουρολογικούς καθετήρες (Moellering R.C. Jr, 2005). Ο ακριβής ρόλος του *fsr* locus στην ρύθμιση άλλων παραγόντων λοιμογονικότητας δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί (Teixeira L.M. & Facklam R.R., 2005).

Επίσης, πρόσφατα απομονώθηκε και το γονίδιο *esp*, το οποίο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη επιφανείας *Esp* (extracellular surface protein). Η πρωτεΐνη αυτή ανιχνεύτηκε σε επιδημικά νοσοκομειακά στελέχη *E.faecalis* και *E.faecium* (Klare I. et al., 2001).

Το 40% περίπου των στελεχών *E.faecalis* που απομονώνονται από περιστατικά ενδοκαρδίτιδας φέρουν την *Esp*. Η *Esp* εξουδετερώνει τα αντισώματα χάρις στην ιδιότητά της να απομακρύνεται από την επιφάνεια του βακτηρίου (Winn W.C. et al., 2006).

Οι κυτταρολυσίνες είναι κυτταροτοξίνες οι οποίες εκφράζονται από ορισμένα στελέχη *E.faecalis*. Κωδικοποιούνται είτε από πλασμιδιακά γονίδια (pheromone responsive) είτε από γονιδιακές νησίδες (pathogenicity islands) εντός του χρωμοσώματος (Teixeira L.M. & Facklam R.R., 2005).

Η πλασμιδιακώς κωδικοποιούμενη ουσία συσσωρεύσεως (aggregation substance), προκαλεί την συσώρευση των εντεροκόκκων και την ανταλλαγή πλασμιδίων με σύζευξη (Winn W.C. et al., 2006). Τα πλασμίδια αυτά φέρουν γονίδια κυτταρολυσινών καθώς και γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά (Teixeira L.M. & Facklam R.R., 2005). Η ουσία αυτή διευκολύνει επίσης την προσκόλληση των βακτηρίων στα εντερικά και νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα και προάγει την ανάπτυξη καρδιακών εκβλαστήσεων σε πειραματικά μοντέλα ενδοκαρδίτιδας σε κουνέλια (Winn W.C. et al., 2006). Πιθανοί υποδοχείς θεωρούνται οι ιντεγκρίνες (integrins). Η προσκόλληση αυτή ενισχύει και την φαγοκυττάρωση του *E.faecalis* (Klare I. et al., 2001).



Η παραγωγή της ουσίας συσσώρευσης προάγεται από μία φερομόνη (Texeira L.M. & Facklam R.R., 2005). Οι φερομόνες είναι μικρά γραμμικά πεπτίδια με δράση πάνω στη λευκοταξία και την επαγωγή της παραγωγής H_2O_2 από τα ουδετερόφιλα. Τα λιποτειχοϊκά οξέα αποτελούν το αντιγόνο D κατά Lancefield και μπορούν να χαρακτηριστούν σαν παράγοντες λοιμογονικότητας καθώς επάγουν την παραγωγή TNF και ιντερφερόνης, τροποποιώντας έτσι την ανοσιακή απάντηση (Winn W.C. et al., 2006).

Τα περισσότερα στελέχη *E.faecalis*, και κάποια στελέχη *E.faecium* που απομονώνονται από περιστατικά βακτηριαιμίας παράγουν μεγάλες ποσότητες εξωκυττάριου H_2O_2 το οποίο μπορεί να ενισχύσει την λοιμογονικότητα των στελεχών αυτών (Winn W.C. et al., 2006).

Μεγάλη συμβολή στην παθογένεια των εντεροκόκκων, παρά την σχετικά χαμηλή τους λοιμογονικότητα, φαίνεται πως έχει και η «επιβιωσιμότητα» που χαρακτηρίζει το γένος. Ως αποτέλεσμα φυσικών και επίκτητων χαρακτηριστικών, μπορούν να επιβιώσουν και να κυριαρχήσουν σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, γεγονός που τους προσδίδει ένα σημαντικό πλεονέκτημα (Texeira L.M. & Facklam R.R., 2005). Στα χαρακτηριστικά αυτά εντάσσονται η ανάπτυξη σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας, περιεκτικότητας σε NaCl, PH, η αντοχή στην ξηρασία και στην ηλιακή ακτινοβολία, καθώς επίσης και η ενδογενής και η επίκτητη αντοχή τους σε πολλά αντιβιοτικά.

Η πολυαντοχή των εντεροκόκκων, αν και δεν είναι κλασσικός «λοιμογόνος παράγων», τους επιτρέπει να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται σε ασθενείς που λαμβάνουν χημειοθεραπεία με διάφορα ευρέως φάσματος αντιβιοτικά. Η πολυαντοχή τους ευθύνεται και για την ικανότητά τους να προξενούν δευτερογενείς λοιμώξεις (superinfections) στους ανωτέρω ασθενείς (Moellering R.C. Jr, 2005).

Τέλος, και οι πολλαπλοί μηχανισμοί ανταλλαγής γενετικού υλικού των εντεροκόκκων μπορούν να χαρακτηριστούν ως ένα σημαντικό στοιχείο της παθογένειας τους (Morrison D., 2002).

Όπως θα δούμε στην συνέχεια, κύριος μηχανισμός μεταφοράς γονιδίων στους εντεροκόκκους είναι η σύζευξη, είτε με πλασμίδια είτε με συζευκτικά τρανσποζόνια όπως πχ τα Tn1546 και Tn1547.

B.6. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Οι εντερόκοκκοι είναι οι πλέον συνήθεις αερόβιοι Gram θετικοί κόκκοι που απαντώνται στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου και άλλων θηλαστικών (Mascini E.M. & Holm S.E., 2004).

Μέχρι πρότινος χαρακτηρίζονταν ως απλοί αποικιστές λόγω της χαμηλής ενδογενούς λοιμογονικότητάς τους σε σχέση με άλλα γένη βακτηρίων. Όμως, παρά το γεγονός αυτό, η ενδογενής τους αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά τους επιτρέπει να επιζούν ακόμα και σε ασθενείς που λαμβάνουν αντιβιοτικά ευρέως φάσματος, καθιστώντας έτσι την θεραπευτική αντιμετώπιση των εντεροκοκκικών λοιμώξεων συχνά προβληματική. Σήμερα οι εντερόκοκκοι αποτελούν το δεύτερο σε συχνότητα νοσοκομειακό παθογόνο. Οι λόγοι για τους οποίους ένα ευκαιριακό παθογόνο χαμηλής σχετικά λοιμογονικότητας κατέστη ένα σημαντικό παθογόνο είναι πολλοί. Μεταξύ αυτών αναφέρουμε την ολοένα αυξανόμενη χρήση ενδαγγειακών συσκευών και προσθέσεων, την χημειοθεραπεία με κυτταροτοξικά και ανοσοκατασταλτικά φάρμακα και την πίεση επιλογής (selective pressure) που ασκούν τα αντιβιοτικά ευρέως φάσματος, ενώ σημαντική συμβολή προς την κατεύθυνση αυτή είχε και η πρόσκτηση νέων μηχανισμών αντοχής (Woodford N. et al., 1995).

Τα τελευταία χρόνια, γίνεται πολύς λόγος για το φαινόμενο της αντίστασης στον αποικισμό (colonization resistance). Πρόκειται για έναν λειτουργικό φραγμό ο οποίος συγκρατεί τον αριθμό των εντεροκόκκων στο παχύ έντερο σε σχετικά χαμηλά επίπεδα (κάτω από 1% του συνολικού βακτηριακού πληθυσμού του παχέος εντέρου). Πιστεύεται ότι η παραγωγή μεταβολικών προϊόντων όπως τα βραχέων αλύσεων λιπαρά οξέα (βουτυρικό) από τα υποχρεωτικώς αναερόβια βακτήρια δρά ανασταλτικά πάνω στα προαιρετικώς αναερόβια βακτήρια όπως οι εντερόκοκκοι.

Στην λειτουργικότητα του φραγμού συνεισφέρει και το όξινο pH του στομάχου. Έχει αποδειχθεί ότι η χορήγηση ανταγωνιστών των H²-υποδοχέων προάγει τον αποικισμό του λεπτού εντέρου αλλά και την αλλοθεσία (translocation) εντερικών βακτηρίων από τον αυλό του εντέρου σε εξωεντερικές εστίες (Hancock L.E. & Gilmore M.S., 2006).

Μια άλλη ιατρική παρέμβαση που καταργεί τον ανωτέρω φραγμό είναι και η χορήγηση αντιβιοτικών ευρέως φάσματος με μικρή ή καμία δραστηριότητα έναντι των εντεροκόκκων.



Μεταξύ των αντιβιοτικών αυτών ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει για τις κεφαλοσπορίνες, στις οποίες οι εντεροκόκκοι εμφανίζουν ενδογενή αντοχή. Η χορήγηση τέτοιων αντιβιοτικών ευνοεί τον αποικισμό του ασθενούς με εξωγενούς προέλευσης πολυανθεκτικά στελέχη εντεροκόκκων. Μια πιθανή ερμηνεία είναι ότι τα νοσοκομειακά-εξωγενή στελέχη φέρουν ιδιότητες οι οποίες τους επιτρέπουν να αποικίζουν φωλεές του εντέρου οι οποίες δεν ευνοούν την αποικισμό από τα στελέχη της χλωρίδας. Η προσφάτως περιγραφείσα γονιδιακή νησίδα (pathogenicity island) του *E.faecalis* κωδικοποιεί για μια υδρολάση των χολικών αλάτων η οποία επιτρέπει των αποικισμό κάποιων εστιών του εντέρου οι οποίες είναι αφιλόξενες για τα στελέχη της χλωρίδας. Πολλές εργασίες έχουν τεκμηριώσει τον αποικισμό που ακολουθεί μετά από την εισαγωγή ενός ασθενούς στο νοσοκομείο και έχουν αποδείξει ότι ο αποικισμός με πολυανθεκτικά στελέχη αποτελεί προδιαθεσικό παράγοντα για επακόλουθη λοίμωξη (Hancock L.E. & Gilmore M.S., 2006).

Στην συνέχεια παρατίθενται οι συνηθέστερες λοιμώξεις από εντεροκόκκους (Mascini E.M. & Holm S.E., 2004).

- Λοιμώξεις του ουροποιητικού
- Βακτηραιμία και ενδοκαρδίτις
- Λοιμώξεις χειρουργικών τραυμάτων
- Λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων
- Ενδοκοιλιακές και ενδοπυελικές λοιμώξεις
- Λοιμώξεις οστών και αρθρώσεων, ειδικά επί προσθέσεων.
- Λοιμώξεις του Κ.Ν.Σ σχετιζόμενες με shunts
- Ενδομητρίτις

B.6.1. Λοιμώξεις του ουροποιητικού

Αποτελούν την συχνότερη λοίμωξη από εντερόκοκκο.

Εκτός από μη επιπλεγμένη κυστίτιδα ή πυελονεφρίτιδα, γνωρίζουμε πλέον ότι οι εντερόκοκκοι μπορούν να προκαλέσουν προστατίτιδα και περινεφρικό απόστημα. Οι περισσότερες ουρολοιμώξεις από εντερόκοκκο είναι νοσοκομειακές και σχετίζονται με καθετηριασμό ή χειρουργικές επεμβάσεις στο ουροποιητικό.

Αντίθετα, είναι πολύ πιο σπάνιες στην κοινότητα (Moellering R.C. Jr, 2005).

B.6.2. Βακτηραιμία και Ενδοκαρδίτις

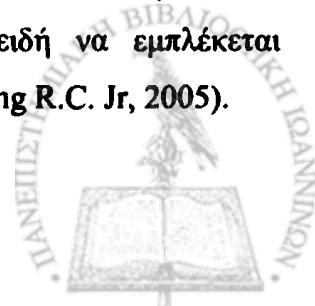
Στην πλειονότητά τους, οι βακτηραιμίες από εντερόκοκκο δεν συνδέονται με ενδοκαρδίτιδα. Πράγματι, μόνο μία στις πενήντα περιπτώσεις βακτηραιμίας από εντερόκοκκο επιπλέκεται με ενδοκαρδίτιδα (Moellering R.C. Jr, 2005).

Πύλες εισόδου για την εντεροκοκκική βακτηραιμία είναι, κατά σειρά συχνότητας, το ουροποιητικό, τα ενδοκοιλιακά και ενδοπυελικά αποστήματα, τα τραύματα, οι ενδαγγειακοί καθετήρες και τα χολαγγεία.

Υπάρχουν ολοένα και συχνότερες αναφορές περιστατικών «πρωτοπαθούς εντεροκοκκικής βακτηραιμίας» σε ασθενείς με σοβαρή υποκείμενη νόσο και ανοσοκαταστολή. Οι βακτηραιμίες αυτές είναι συνήθως μονομικροβιακές και θεωρείται ότι εστία τους είναι το γαστρεντερικό (Moellering R.C. Jr, 2005).

Η εντεροκοκκική βακτηραιμία είναι δυνατόν να επιπλέκεται με σηπτικό shock ή διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, όμως οι επιλοκές αυτές είναι σπάνιες στην αμιγώς εντεροκοκκική βακτηραιμία. Στις πολυμικροβιακές βακτηραιμίες στις οποίες συνυπάρχουν Gram αρνητικά βακτηρίδια, σηπτικό shock και Δ.Ε.Π εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα.

Οι εντερόκοκκοι ευθύνονται για το 5-15% των περιπτώσεων λοιμώδους ενδοκαρδίτιδας. Η ενδοκαρδίτις από εντερόκοκκο είναι βασικά νόσος των ηλικιωμένων και προσβάλλει τους άνδρες συχνότερα από τις γυναίκες. Παρατηρείται συχνότερα σε ασθενείς με βαλβιδοπάθεια ή φέροντες προσθετική βαλβίδα. Οι εντερόκοκκοι προκαλούν συνήθως αριστερή ενδοκαρδίτιδα, με την μιτροειδή να εμπλέκεται συχνότερα από την αορτική, ακόμη και επί τοξικομανών (Moellering R.C. Jr, 2005).



Η ενδοκαρδίτιδα από εντερόκοκκο συνήθως έχει κλινική πορεία υποξείας ενδοκαρδίτιδας και δεν διακρίνεται κλινικά από την ενδοκαρδίτιδα από πρασινίζοντες στρεπτοκόκκους ή από *Streptococcus bovis*.

B.7. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Για την προκαταρκτική ταυτοποίηση των εντεροκόκκων χρησιμοποιούμε κλασσικές μικροβιολογικές μεθόδους όπως η χρώση κατά Gram, η αντίδραση καταλάσης, η αντίδραση PYR, η δοκιμασία υδρόλυσης της εσουλίνης σε υλικό που περιέχει 40% χολή (BE test) και η ανάπτυξη σε ζωμό που περιέχει NaCl 6.5% (Winn W.C. et al., 2006). Στελέχη που δίνουν αρνητικές τις παραπάνω δοκιμασίες υπάρχουν, εν τούτοις είναι σπάνια.

Η οριστική ταυτοποίηση των εντεροκόκκων γίνεται με την χρήση βιοχημικών δοκιμασιών.

Λόγω της εμφάνισης των ανθεκτικών στα γλυκοπεπτίδια εντεροκόκκων, έχουμε πλέον στην διάθεσή μας πληθώρα μοριακών μεθόδων που συνδυάζουν την ανίχνευση των γονιδίων αντοχής και την ταυτοποίηση του στελέχους σε επίπεδο είδους (Winn W.C. et al., 2006).

B.8. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

B.8.1. Μηχανισμοί ανταλλαγής γενετικού υλικού

Οι εντερόκοκκοι είναι σε θέση να ανταλλάσσουν γενετικό υλικό μέσω μεταφοράς είτε πλασμιδίων είτε τρανσποζονίων. Στον *E.faecalis* η ανταλλαγή πλασμιδίων είναι μοναδική καθ'ότι εμπλέκεται η παραγωγή φερομονών του φύλου.

Στελέχη-υποδοχείς ελεύθερα πλαμιδίων παράγουν εξωκυττάριας φερομόνες. Η μεσολαβούμενη από φερομόνες σύζευξη έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μιας ουσίας πρωτεϊνικής κατά βάση σύστασης, η οποία εναποτίθεται την εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου-δότη και ονομάζεται ουσία συσσώρευσης.

Η ουσία αυτή αντιδρά στη συνέχεια με μια ουσία στην επιφάνεια του κυττάρου δέκτη (binding substance). Η συζευκτική μεταφορά λαμβάνει χώραν όταν τα κύτταρα έχουν σχηματίσει συσσωρεύματα. Αυτή η μεσολαβούμενη από φερομόνες συζευκτική μεταφορά αυξάνει την συχνότητα μεταφοράς των πλασμιδίων κατά 10^5 - 10^6 φορές.

Άλλα είδη εντεροκόκκων έχουν την ικανότητα να αποκτούν και να ανταλλάσσουν πλασμίδια αλλά ο μηχανισμός ανταλλαγής δεν μεσολαβείται από φερομόνες.

Το γενετικό υλικό που φέρουν τα πλασμίδια μπορεί να είναι κάποιο γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα σε αντιμικροβιακά φάρμακα ή γονίδιο κάποιου λοιμογόνου παράγοντα. Οι παράγοντες αυτοί θα συζητηθούν αναλυτικά στην συνέχεια.

Οι εντερόκοκκοι είναι επίσης σε θέση να ανταλλάσσουν γενετικό υλικό με συζευκτικά τρανσποζόνια. Η διεργασία αυτή προϋποθέτει την επαφή κυττάρου με κύτταρο και έχει ως τελικό αποτέλεσμα την εισχώρηση θραύσματος γενετικού υλικού στο χρωμόσωμα-στόχο. Τα τρανσποζόνια συχνά φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας για αντιμικροβιακά φάρμακα όπως τετρακυκλίνες, ερυθρομυκίνη, γενταμυκίνη, καναμυκίνη και άλλες αμινογλυκοσίδες.

Τα τρανσποζόνια έχουν ένα πολύ ευρύ φάσμα ξενισμού και ανευρίσκονται πολύ συχνά σε αρκετά είδη *Enterococcus* καθώς επίσης σε αρκετά είδη *Streptococcus*, *Lactococcus* και άλλων gram(+)βακτηρίων.

Η πλέον χαρακτηριστική ιδιότητα των εντεροκόκκων είναι η σχετική ή η απόλυτη αντοχή τους σε μια ποικιλία ευρέως χρησιμοποιούμενων αντιμικροβιακών παραγόντων.

Οι εντερόκοκκοι όχι μόνο είναι εγγενώς ανθεκτικοί σε έναν μεγάλο αριθμό αντιμικροβιακών παραγόντων, αλλά επιπλέον έχουν την αξιοσημείωτη ικανότητα να αποκτούν νέους μηχανισμούς αντοχής (Moellering R.C. Jr, 2005).

Εγγενής αντοχή

Στις αρχές της δεκαετίας του 1940, λίγο χρόνο μετά την εισαγωγή της πενικιλίνης, εμφανίστηκαν οι πρώτες αναφορές που έκαναν λόγο για χειρότερη θεραπευτική έκβαση της πενικιλινοθεραπείας στις ενδοκαρδίτιδες από εντερόκοκκο σε σχέση με τις στρεπτοκοκκικές ενδοκαρδίτιδες (Murray B.E., 2000). Τα ευρήματα αυτά ήταν απολύτως συμβατά με την μεταγενέστερη διαπίστωση ότι οι εντερόκοκκοι



εμφανίζουν υψηλότερη MIC στην πενικιλίνη σε σχέση με τους στρεπτοκόκκους.

Σήμερα γνωρίζουμε ότι οι εντερόκοκκοι, ακόμα και σε πληθυσμούς οι οποίοι δεν ήρθαν ποτέ σε επαφή με αντιβιοτικά, εμφανίζουν εγγενή αντοχή έναντι των β-λακταμικών αντιβιοτικών (Gold H.S., 2001). Η αντοχή αυτή είναι χαμηλού βαθμού για την πενικιλίνη και τις ημισυνθετικές πενικιλίνες και υψηλού βαθμού για τις κεφαλοσπορίνες.

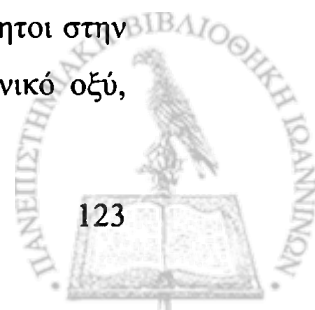
Η MIC του *E.faecalis* στην πενικιλίνη κυμαίνεται από 1 έως 8 µg/ml ενώ του *E.faecium* από 4 έως 32 µg/ml. Η MIC της αμπικιλίνης είναι συνήθως μία αραιώση χαμηλότερη από αυτήν της πενικιλίνης (Murphy B.E., 2000; Kucers A. et al., 1997). Συνήθως, η MBC (ελάχιστη μικροβιοκτόνος συγκέντρωση) των εντεροκόκκων στην πενικιλίνη είναι πολύ μεγαλύτερη από την MIC (ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση). Συχνά η MBC είναι πάνω από 100 µg/ml. Αυτή η πτωχή βακτηριοκτόνος δράση της πενικιλίνης ερμηνεύει την πτωχή αποτελεσματικότητα της μονοθεραπείας με πενικιλίνη σε ασθενείς με ενδοκαρδίτιδα από εντερόκοκκο.

Αξίζει να σημειωθεί εδώ, ότι στην διάρκεια της θεραπείας, ακόμα και στελέχη που αρχικά εμφανίζουν χαμηλή MBC, μπορούν να αναπτύξουν «ανοχή» (tolerance). Η εγγενής, χαμηλού βαθμού αντοχή των εντεροκόκκων στην πενικιλίνη και τις ημισυνθετικές πενικιλίνες οφείλεται στο γεγονός ότι κύριο ρόλο τρανσπεπτιδάσης στους εντεροκόκκους έχουν οι PBP-3.

Οι PBP-3 αναστέλλονται από τις β-λακτάμες και τις καρβαπενέμες αλλά όχι από τις κεφαλοσπορίνες (Rice L.B. & Bonomo R.A., 2005). Για τον λόγο αυτό η εγγενής αντοχή των εντεροκόκκων στις κεφαλοσπορίνες είναι απόλυτη, σε βαθμό που καμία κεφαλοσπορίνη δεν είναι δραστική έναντι αυτών (Gold H.S., 2001).

Η εγγενής αντοχή των εντεροκόκκων στις αμινογλυκοσίδες οφείλεται στην περιορισμένη ικανότητα των παραγόντων αυτών να διαπερνούν το κυτταρικό τοίχωμα των εντεροκόκκων. Το φαινόμενο αυτό αντιμετωπίζεται με την προσθήκη ενός δεύτερου αντιβιοτικού με δράση πάνω στο κυτταρικό τοίχωμα. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται συνεργική δράση των δύο αντιβιοτικών. Η συνδυασμένη αυτή θεραπεία αποτελεί την θεραπεία εκλογής σε εντεροκοκκικές λοιμώξεις όπως η ενδοκαρδίτις ή η μηνιγγίτις (Moellering R.C. Jr, 2005).

Παρ'όλο που οι εντερόκοκκοι μπορεί να εμφανίζονται *in vitro* ευαίσθητοι στην κωτριμοξαζόλη, εν τούτοις είναι σε θέση να χρησιμοποιούν εξωγενές φολινικό οξύ,



διϋδροφολικό και τετραϋδροφολικό οξύ, παρακάμπτοντας έτσι την αναστολή της σύνθεσης φυλλικού οξέος. Για τον λόγο αυτό, οι εντερόκοκκοι θεωρούνται ως *in vivo* ανθεκτικοί στην κοτριμοξαζόλη (Gold H.S., 2001).

Επίκτητη αντοχή

Πέραν της εγγενούς ανθεκτικότητας, οι εντερόκοκκοι έχουν αποκτήσει νέους μηχανισμούς αντοχής σε μια πληθώρα αντιμικροβιακών παραγόντων. Οι περισσότεροι από τους μηχανισμούς αυτούς μεσολαβούνται από γονίδια που εδράζονται στο βακτηριακό χρωμόσωμα, σε πλασμίδια ή τρανσποζόνια (Kucers A. et al., 1997).

Όπως θα δούμε στην συνέχεια, οι εντερόκοκκοι έχουν αναπτύξει μια σειρά άκρως αποτελεσματικών μεθόδων μεταφοράς γονιδίων αντοχής, τόσο στα πλαίσια του ίδιου γένους όσο και μεταξύ αυτών και βακτηρίων που ανήκουν σε άλλα γένη (Moellering R.C. Jr, 2005).

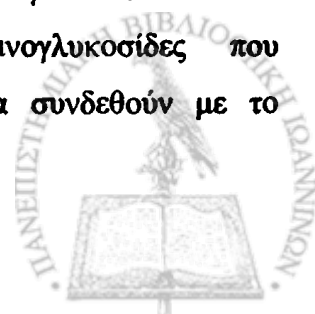
Ένας σημαντικός τύπος επίκτητης αντοχής που δεν φαίνεται να μεσολαβείται από πλασμίδια ή τρανσποζόνια είναι η «ανοχή» (tolerance) στα αντιβιοτικά που δρουν σε επίπεδο κυτταρικού τοιχώματος (β-λακτάμες και γλυκοπεπτιδία).

Το φαινόμενο της ανοχής (tolerance) είναι σύνηθες στους εντεροκόκκους. Συνίσταται στην ικανότητα του βακτηρίου να επιβιώνει σε στάθμες αντιβιοτικού οι οποίες υπερβαίνουν κατά πολύ την MIC (Gold H.S., 2001).

Αρχικά, πιστεύαμε ότι επρόκειτο περί εγγενούς αντοχής, μέχρι την στιγμή που βρέθηκαν στελέχη τα οποία δεν εμφάνιζαν το φαινόμενο αυτό. Απεδείχθη στην συνέχεια ότι τα στελέχη αυτά μπορούσαν να αποκτήσουν ανοχή κατόπιν επανειλημμένων βραχέων εκθέσεων στο αντιβιοτικό (Gold H.S., 2001).

Η υψηλού βαθμού αντοχή στις αμινογλυκοσίδες (MIC, > 500-2000 µg/ml) μπορεί να οφείλεται είτε σε ριβοσωμιακή μετάλλαξη στην υπομονάδα 30S (μόνο για την στρεπτομυκίνη), είτε σε παραγωγή πλαμιδιακώς μεσολαβούμενων ενζύμων τροποποιητικών των αμινογλυκοσιδών (aminoglycoside-modifying enzymes) (Kucers A. et al., 1997).

Τα ένζυμα αυτά, σε αντίθεση με τις β-λακταμάσες, δεν εκκρίνονται εξωκυτταρίως και ως εκ τούτου δρουν επί του φαρμάκου μόνο σε επίπεδο περιπλασματικού χώρου ή κυτταροπλάσματος. Οι αμινογλυκοσίδες που τροποποιούνται από τα ένζυμα αυτά δεν μπορούν πλέον να συνδεθούν με το



ριβοσωμάτιο (Kucers A. et al., 1997).

Η υψηλού βαθμού αντοχή στην στρεπτομυκίνη είναι πλέον αρκετά συχνή. Αντίθετα, η υψηλού βαθμού αντοχή στην γενταμυκίνη ενέσκηψε ως πρόβλημα την δεκαετία του 1980. Πρόκειται για πλασμιδιακώς μεσολαβούμενη αντοχή (Kucers A. et al., 1997). Το πλέον συχνό ένζυμο το οποίο μεσολαβεί για αυτήν την αντοχή είναι μια μεικτή AAC (6')-ακετυλοτρανσφεράση- APH (2'')-φωσφοτρανσφεράση. Το ένζυμο αυτό προσδίδει αντοχή σε όλες τις αμινογλυκοσίδες πλὴν της στρεπτομυκίνης. Η τελευταία τροποποιείται από μια 6-αδενυλτρανσφεράση.

Στελέχη τα οποία συνθέτουν αμφοτέρα τα ένζυμα είναι ανθεκτικά στην συνεργική δράση κάθε συνδυασμού β-λακτάμης με αμινογλυκοσίδη. Αυτό σημαίνει ότι, με σπάνιες εξαιρέσεις, δεν υπάρχει αξιόπιστο βακτηριοκτόνο σχήμα για τα στελέχη αυτά (Munpay B.E., 2000). Έχουν περιγραφεί και άλλες φωσφορυλάσες της γενταμυκίνης.

Μια εξ αυτών, η APH(2'')Id, προσδίδει υψηλού βαθμού αντοχή στην γενταμυκίνη ενώ μια άλλη, η APH(2'')Ic, προσδίδει ενδιάμεσα επίπεδα αντοχής τα οποία ενδέχεται να μην ανιχνευτούν με τις δοκιμασίες ρουτίνας που χρησιμοποιούν τα περισσότερα κλινικά εργαστήρια (Moellering R.C. Jr, 2005). Ευτυχώς, τα ένζυμα αυτά είναι σπάνια επί του παρόντος.

Όλα τα στελέχη *E.faecium* παράγουν μια χρωμοσωμικώς μεσολαβούμενη 6'-ακετυλοτρανσφεράση η οποία εξουδετερώνει τις τομπραμυκίνη, νετιλμυκίνη, καναμυκίνη και σισομυκίνη, χωρίς όμως να προσδίδει υψηλού βαθμού αντοχή στις ενώσεις αυτές. Ως εκ τούτου, στην περίπτωση του *E.faecium*, δεν έχει νόημα η συγχορήγηση των αμινογλυκοσιδών αυτών με αντιβιοτικά που δρουν σε επίπεδο κυτταρικού τοιχώματος.

Στελέχη *E.faecalis* και *E.faecium* με υψηλού βαθμού αντοχή σε όλες τις αμινογλυκοσίδες παρατηρούνται με ολοένα μεγαλύτερη συχνότητα. Οι θεραπευτικές αποτυχίες καθώς και οι υποτροπές κατόπιν θεραπείας, ειδικά σε περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας οφειλόμενης σε τέτοια στελέχη, περιγράφονται πλέον αρκετά συχνά. Όλοι οι εντερόκοκκοι που απομονώνονται από ασθενείς με ενδοκαρδίτιδα ή μηνιγγίτιδα θα πρέπει να ελέγχονται για υψηλού βαθμού αντοχή στις αμινογλυκοσίδες. Μόνο οι δοκιμασίες time-kill για in vitro συνέργεια θα αποκαλύψουν την παρουσία εκείνων των σπάνιων στελεχών που παράγουν APH(2'')Ic (Moellering R.C. Jr, 2005).

Στις αρχές της δεκαετίας του 1980, περιεγράφη στις ΗΠΑ το πρώτο στελέχος *E.faecalis* το οποίο παρήγαγε β-λακταμάση. Τα στελέχη αυτά παραμένουν σπάνια (Murray B.E., 2000).

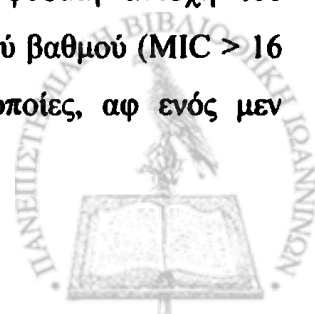
Το δομικό γονίδιο για την β-λακταμάση (blaZ) στους εντεροκόκκους είναι ίδιο με το blaZ τύπου A των σταφυλοκόκκων με την διαφορά ότι στους εντεροκόκκους η παραγωγή του ενζύμου δεν είναι επαγωγίμη. Η διαφορά αυτή οφείλεται στο ότι τα γονίδια που ελέγχουν την επαγωγίμη παραγωγή β-λακταμάσης στον *S.aureus* δεν μεταφέρθηκαν στους εντεροκόκκους en block μαζί με τα γονίδια που κωδικοποιούν για την β-λακταμάση (Moellering R.C. Jr, 2005).

Πράγματι, η ανάλυση των αλληλουχιών στην περιοχή του blaR1 έδειξε ότι οι δύο αλληλουχίες ήταν ταυτόσημες για τα πρώτα 893 νουκλεοτίδια όμως η blaR1 των εντεροκόκκων δεν έφερε επίτοπο σύνδεσης με β-λακτάμες, γεγονός που εξηγεί την μη επαγωγιμότητα στην παραγωγή β-λακταμάσης (Dyke K. & Gregory P., 1997).

Οι β-λακταμάση θετικοί εντερόκοκκοι εμφανίζουν ένα εκσεσημασμένο φαινόμενο ενοφθαλμισμού και όταν ελέγχονται κάτω από τις συνήθειες συνθήκες δεν εμφανίζουν MIC σημαντικά υψηλότερες από τα λακταμάση-αρνητικά στελέχη. Για τον λόγο αυτό είναι αναγκαία η χρήση δοκιμασιών παραγωγής β-λακταμάσης όπως η δοκιμασία νιτροσεφίνης προκειμένου να ανιχνεύονται αποτελεσματικά τέτοια στελέχη. Με μια μόνο γνωστή εξαίρεση, τα στελέχη *E.faecium* δεν παράγουν β-λακταμάση (Murray B.E., 2000).

Η υψηλού βαθμού αντοχή του *E.faecium* στις πενικιλίνες (MIC > 16 μg/ml) σχετίζεται με την τροποποίηση των PBP-5. Οι PBP-5 αποτελούν μια εκ των 6 πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών που απαντώνται σε όλα τα στελέχη *E.faecium* και εμφανίζουν χαμηλή χημική συγγένεια προς τα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Η μόνιμη έκφρασή τους προϋποθέτει την εμφάνιση μεταλλάξεων στην ρυμιστική περιοχή του γονιδίου τους (Rice L.B. & Bonomo R.A., 2005). Υπ'αυτές τις συνθήκες, οι PBP-5 αναλαμβάνουν τον ρόλο της κύριας τρανσπεπτιδάσης του βακτηρίου, υποκαθιστώντας τις λοιπές PBPs, όταν αυτές οι τελευταίες αναστέλλονται από τις β-λακτάμες (Ligozzi M. et al., 1996).

Σύμφωνα με νεώτερα δεδομένα, η χαμηλού βαθμού, φυσική αντοχή του *E.faecium* στις πενικιλίνες μπορεί να εξελιχθεί σε αντοχή υψηλού βαθμού (MIC > 16 μg/ml) μέσω ενός συνδυασμού πολλαπλών μεταλλάξεων οι οποίες, αφ ενός μεν



οδηγούν σε αυξημένη σύνθεση PBP-5, αφ ετέρου δε ελαττώνουν περαιτέρω την χημική της συγγένεια προς τις πενικιλίνες (Rybkin T. et al., 1998).

B.8.2. ANTOXH ΣΤΙΣ ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ

Για την αντοχή των εντεροκόκκων στις κινολόνες ισχύουν σε γενικές γραμμές όσα αναφέραμε για τους σταφυλοκόκκους. Οι πλέον συνήθεις μεταλλάξεις στα γονίδια GyrA και ParC παρατίθενται στον πίνακα 12. Όσον αφορά στα συστήματα απέκκρισης των κινολονών, στον *E.faecalis* έχει περιγραφεί το γονίδιο *emeA*, ανάλογο του *poxA* (Poole K., 2005). Εκτός από τους MF μεταφορείς, στον *E.faecalis* έχει περιγραφεί και ένας περιορισμένος αριθμός μεταφορέων της οικογένειας ABC (ATP-binding cassette family), όπως ο EfrAB (Poole K., 2005).

Πίνακας 12. Οι συνηθέστερες μεταλλάξεις στα γονίδια GyrA και ParC

E.faecium

GyrA	ParC
	Ser80 → Ile
Glu87 → Lys	Ser80 → Ile
Ser83 → Ile	Ser80 → Arg
Ser83 → Leu	Glu84 → Thr
Glu87 → Gly	Glu84 → Lys

E.faecalis

GyrA	ParC
	Ser80 → Arg
Ser83 → Arg	Ser80 → Ile
Glu87 → Gly	Ser80 → Ile
Ser83 → Ile	Ser80 → Ile

F.-J. Schmitz, P.G. Higgins, S. Mayer, A.C. Fluit, A. Dalhoff: Activity of quinolones against Gram-positive cocci: Mechanisms of drug action and bacterial resistance

European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (2002) 21: 647-659



B.8.3. ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΑ

Οι εντερόκοκκοι ήταν τα πρώτα βακτήρια τα οποία εμφάνισαν επίκτητη αντοχή στα γλυκοπεπτιδία. Για πολλούς ειδικούς των λοιμώξεων αυτή η πρόσκτηση αντοχής θεωρείτο πρακτικώς αδύνατη. Η πεποίθηση αυτή στηριζόταν σε δύο κυρίως λόγους :

Ο πρώτος λόγος ήταν ότι παρά την μακροχρόνια χρήση της βανκομυκίνης, δεν είχε εμφανιστεί αντοχή.

Ο δεύτερος λόγος ήταν ο ίδιος ο μηχανισμός δράσης της βανκομυκίνης .

Όπως θα δούμε στη συνέχεια, ο μηχανισμός δράσης της βανκομυκίνης είναι τέτοιος που αποκλείει το ενδεχόμενο ανάπτυξης αντοχής λόγω τροποποίησης των PBP's (Arthur M. & Courvalin P., 1993; Moellering R.C. Jr, 1998). Αλλά και η «αδρανοποίηση» της βανκομυκίνης από το βακτήριο φαινόταν την εποχή εκείνη ένα απίθανο ενδεχόμενο (Moellering R.C. Jr, 1998).

Έτσι, η εμφάνιση του πρώτου βανκομυκίνη-ανθεκτικού στελέχους εντεροκόκκου (1986), αποτέλεσε μια μεγάλη έκπληξη και παράλληλα σήμανε έναν παγκόσμιο συναγερμό, μιάς και τα γλυκοπεπτιδία αποτελούσαν ουσιαστικά την τελευταία γραμμή άμυνας έναντι των λοιμώξεων από εντερόκοκκο.

Παρά το γεγονός ότι η βανκομυκίνη εισήχθη στην θεραπευτική το 1956, η πρώτη αναφορά εντεροκόκκου ανθεκτικού στην βανκομυκίνη (VRE) δημοσιεύτηκε μόλις το 1988 (New England Journal of Medicine & Lancet). Την εποχή εκείνη η χρήση της ήταν ήδη ευρέως διαδεδομένη κυρίως λόγω της ραγδαία αυξανόμενης επίπτωσης των μεθικιλίνη-ανθεκτικών σταφυλοκόκκων. Επίσης, η *per os* χορήγησή της ήταν η θεραπεία εκλογής της ψευδομεμβρανώδους κολίτιδας από *Clostridium difficile*.

Είναι άκρως ενδιαφέρον το γεγονός ότι την εποχή εκείνη η μεγάλη κατανάλωση γλυκοπεπτιδίων αφορούσε έναν εντελώς διαφορετικό πληθυσμό : το γλυκοπεπτιδίο Avoparcin, το οποίο επιδεικνύει διασταυρούμενη ανθεκτικότητα με την βανκομυκίνη, χρησιμοποιήθηκε ευρέως στην ζωική παραγωγή ως προαγωγέας ανάπτυξης (growth promoter) μέχρι το 1995, οπότε και απαγορεύτηκε η χρήση του.

Είναι σήμερα τεκμηριωμένο από πληθώρα εργασιών ότι η χρήση του γλυκοπεπτιδίου αυτού σε υποθεραπευτικές δόσεις συνέβαλε σημαντικά στην ανάπτυξη αντοχής στην βανκομυκίνη (Woodford N. et al., 1995).



Κανείς δεν μπορεί να πεί με βεβαιότητα γιατί οι εντερόκοκκοι ήταν τα πρώτα βακτήρια τα οποία ανέπτυξαν αντοχή στα γλυκοπεπτίδια, ούτε γνωρίζουμε την ακριβή προέλευση των γονιδίων αντοχής στα γλυκοπεπτίδια. Η πιθανότερη εκδοχή είναι να μεταφέρθηκαν τα γονίδια αυτά στους εντεροκόκκους με οριζόντια μεταφορά. Γένη βακτηρίων με ενδογενή αντοχή στην βανκομυκίνη, όπως *Lactobacillus* spp, *Leuconostoc* spp, *Pediococcus* spp, *Erysipelothrix*, *Lactococcus* spp, *Arcanobacteria* κλπ, δεν θεωρούνται πηγές των γονιδίων υψηλής αντοχής, αφενός μεν διότι εμφανίζουν σημαντικές διαφορές σε G+C περιεχόμενο, και αφετέρου διότι δεν είναι εφικτή η οριζόντια μεταφορά γονιδίων από τα είδη αυτά στους εντεροκόκκους.

Αντίθετα, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι μικροοργανισμοί που παράγουν γλυκοπεπτίδια ίσως είναι οι πηγές προέλευσης των γονιδίων αντοχής, πιθανώς μέσω οριζόντιας μεταφοράς και μέσω ενός ή περισσοτέρων ενδιάμεσων ξενιστών. Τέτοιοι μικροοργανισμοί είναι οι *Amycolatopsis orientalis*, *Streptomyces toyocaensis* και κάποια είδη του γένους *Paenibacillus* spp (*popilliae*, *thiaminolyticus*, *apiarius*) (Boten M.J.M. et al., 2001).

Κάποιες πρόσφατες εργασίες περιγράφουν την παρουσία συζευκτικών τρانشποζονίων τύπου Tn5382/Tn1549 στο χρωμόσωμα αναερόβιων βακτηρίων τα οποία περιέχουν vanB οπερόνιο. Τα αναερόβια αυτά βακτήρια του πεπτικού σωλήνα θα μπορούσαν να είναι η πηγή των vanB εντεροκόκκων (Boten M.J.M. et al., 2001; Zirakzadeh A. & Patel R., 2005).

Πρέπει να σημειωθεί ότι εντερόκοκκοι με ενδογενή αντοχή στην βανκομυκίνη ήταν γνωστοί στους Μικροβιολόγους πολύ πριν το 1988: αναφερόμαστε στους κινητούς εντεροκόκκους *E.gallinarum* και *E.casseliflavus* και *E.flavescens* οι οποίοι χαρακτηρίζονται από μια χαμηλού βαθμού αντοχή (MIC έως 32 μg/ml). Τα είδη αυτά εξακολουθούν ακόμα και σήμερα να αποτελούν ασυνήθη αίτια λοίμωξης στον άνθρωπο.

Η αντοχή των εντεροκόκκων στα γλυκοπεπτίδια είναι γονοτυπικά και φαινοτυπικά ετερογενής. Έχουν περιγραφεί 5 τύποι επίκτητης αντοχής :

1. VanA φαινότυπος

Χαρακτηρίζεται από υψηλού βαθμού επαγωγίμη αντοχή στην βανκομυκίνη και στην τεϊκοπλανίνη. Μεσολαβείται από το τρανσποζόνιο Tn1546.

2. VanB φαινότυπος

Ο φαινότυπος αυτός εμφανίζει διάφορα επίπεδα επαγωγίμης αντοχής μόνο στην βανκομυκίνη.

3. VanC1/VanC2/VanC3 φαινότυπος

Πρόκειται για μια εγγενή ιδιότητα των ειδών *E.gallinarum*, *E.casseliflavus* και *E.flavescens*. Τα είδη αυτά εμφανίζουν χαμηλού βαθμού αντοχή στην βανκομυκίνη.

4. VanD φαινότυπος

Τα στελέχη με τον φαινότυπο αυτό είναι ανθεκτικά σε διάφορα επίπεδα βανκομυκίνης και τεϊκοπλανίνης.

5. VanE και VanG φαινότυπος

Περιεγραφή προσφάτως στον *E.faecalis* και χαρακτηρίζεται από χαμηλού βαθμού αντοχή στην βανκομυκίνη και ευαισθησία στην τεϊκοπλανίνη.

VanA φαινότυπος αντοχής

Ο VanA φαινότυπος αντοχής είναι ο πρώτος που εμφανίστηκε. Προκύπτει από την εισχώρηση του τρανσποζονίου Tn1546 στο βακτηριακό χρωμόσωμα. Το τρανσποζόνιο αρχικά εδράζεται σε πλασμίδιο το οποίο μεταδίδεται στα ευαίσθητα στελέχη με συζευκτική μεταφορά και σε ένα δεύτερο χρόνο ενσωματώνεται στο βακτηριακό χρωμόσωμα. Έχει αποδειχθεί ότι όλα τα απαραίτητα γονίδια για την έκφραση των φαινοτύπων αντοχής στα γλυκοπεπτίδια φέρονται στο τρανσποζόνιο αυτό.

Το Tn1546 φέρει 9 γονίδια εκ των οποίων άλλα σχετίζονται με την ενσωμάτωση του τρανσποζονίου (τρανσποζάση ORF1, ρεσολβάση ORF2), άλλα είναι ρυθμιστικά (vanR, vanS), άλλα κωδικοποιούν για βοηθητικές πρωτεΐνες (vanY, vanZ), ενώ τα άμεσα σχετιζόμενα με την αντοχή είναι τα vanA, vanH και vanX.

Το vanH κωδικοποιεί για μια δεϋδρογενάση η οποία καταλύει την αναγωγή του πυρουβικού σε D-γαλακτικό οξύ.



Το προϊόν του *vanA*, η VanA λιγάση, χρησιμοποιεί το παραπάνω μόριο ως υπόστρωμα για να συνθέσει το διπεπτίδιο D-Ala-D-Lac που ενσωματώνεται στην πρόδρομη μορφή της πεπτιδογλυκάνης υποκαθιστώντας το D-Ala-D-Ala. Η υποκατάσταση αυτή καταργεί έναν δεσμό υδρογόνου ανάμεσα σε μια αμινομάδα της τελικής D-Ala και στο μόριο της βανκομυκίνης, γεγονός που ελαττώνει σημαντικά την σταθερότητα του συμπλέγματος και επιτρέπει τον «πολυμερισμό» της πεπτιδογλυκάνης ακόμα και παρουσία του αντιβιοτικού (Arthur M. & Courvalin P., 1993).

Το γονίδιο *vanX* κωδικοποιεί για μια D,D-διπεπτιδάση η οποία υδρολύει τα διπεπτίδια D-Ala-D-Ala. Δεν υδρολύει διπεπτίδια D-Ala-D-Lac ούτε πενταπεπτίδια (Woodford N. et al., 1995).

Η VanY D,D-καρβοξυπεπτιδάση απομακρύνει τα C-τελικά D-Ala τα οποία διέφυγαν την υδρόλυση από την VanX (Courvalin P., 2002; Depardieu F. et al., 2004).

Στους εντεροκόκκους, οι πενταπεπτιδικές πλευρικές γέφυρες εκπορεύονται από τα μόρια του N-ακετυλομουραμικού οξέος και έχουν την σύσταση: L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala (Arthur M. & Courvalin P., 1993). Οι VanX και VanY, δρώντας διαδοχικά, παρεμποδίζουν την συσσώρευση «φυσιολογικών» πενταπεπτιδίων στο κυτταρόπλασμα των ανθεκτικών στελεχών, ευνοώντας έτσι την αντικατάστασή τους από πενταπεπτίδια L-Ala-D-Glu-L-Lys- D-Ala-D-Lac (Courvalin P., 2002). Η VanZ προσδίδει χαμηλού βαθμού αντοχή στην τείκοπλανίνη μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού (Courvalin P., 2002).

Η ρύθμιση του *VanA* οπερόνιου επιτυγχάνεται με τα ρυθμιστικά γονίδια *vanR* και *vanS*. Η ανάλυση των αλληλουχιών των αμινοξέων των δύο αυτών πεπτιδίων κατέδειξε ότι ανήκουν στην OmpR-PhoB τάξη των λεγόμενων ρυθμιστικών συστημάτων μεταγωγής σήματος (signal transducing regulatory systems) (Baptista M. et al., 1997). Τα συστήματα αυτά συνήθως αποτελούνται από 2 συστατικά : μία πρωτεϊνοκινάση της κυτταρικής μεμβράνης (HPK) και έναν ρυθμιστή απάντησης (RR /response regulator).

Η HPK περιέχει ένα ειδικό υπόλειμμα ιστιδίνης το οποίο φωσφορυλιώνεται ως απάντηση σε ειδικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Στην συνέχεια, αυτή η φωσφορική ομάδα μεταφέρεται σε ένα υπόλειμμα ασπαρτικού οξέος στον RR. Από την στιγμή που θα φωσφορυλιωθεί, ο RR δρά ως προαγωγέας (promoter) και ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων του οπερόνιου στο οποίο ανήκει.

Στην περίπτωση του VanA οπερόνιου η VanS λειτουργεί ως HPK και η VanR λειτουργεί ως RR. Πρόκειται για έναν επαγωγίμο (inducible) τύπο ανοχής : Η παρουσία βανκομυκίνης ή τεϊκοπλανίνης στο περιβάλλον του βακτηρίου προκαλεί εμμέσως την αυτοφωσφορυλίωση της VanS. Στη συνέχεια η φωσφορική ομάδα μεταφέρεται ταχέως στην VanR. Το φωσφορυλιωμένο VanR πεπτιδίο δρά πάνω σε έναν προαγωγέα ο οποίος βρίσκεται ανάμεσα στα γονίδια vanS και vanH. Ο προαγωγέας αυτός ενεργοποιεί την μεταγραφή των vanH, vanA και vanX, επιτρέποντας έτσι την έκφραση της ανοχής στα γλυκοπεπτιδία (Arthur M. & Courvalin P., 1993; Woodford N. et al., 1995). Προκειμένου να εκφραστεί η ανοχή στους vanA εντεροκόκκους απαιτείται ένα διάστημα 30-60 λεπτών (περίοδος επαγωγής) (Dutta I. & Reynolds P.E., 2002).

Φαινότυπος VanB

Αρχικά περιελάμβανε στελέχη τα οποία εμφάνιζαν επαγωγίμη, χαμηλού βαθμού ανοχή στην βανκομυκίνη, αλλά ήταν ευαίσθητα στην τεϊκοπλανίνη. Σύντομα όμως, έγινε αντιληπτό ότι οι εντερόκοκκοι που φέρουν το vanB γονίδιο εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα MIC στην βανκομυκίνη, με τιμές που ξεπερνούν ενίοτε και τα 1024 µg/ml (υψηλού βαθμού ανοχή).

Επιπροσθέτως, έχει περιγραφεί η ύπαρξη μεταλλακτών ανθεκτικών στην τεϊκοπλανίνη. Οι μεταλλάκτες αυτοί είναι αδύνατο να διακριθούν από τους VanA εντεροκόκκους με φαινοτυπικές μεθόδους.

Σήμερα γνωρίζουμε ότι τόσο η οργάνωση όσο και η ρύθμιση του vanB οπερόνιου είναι βασικά ίδιες με αυτές του vanA οπερόνιου.

Η ευαισθησία των vanB στελεχών στην τεϊκοπλανίνη απλά αντικατοπτρίζει το γεγονός ότι η τεϊκοπλανίνη είναι πτωχός επαγωγέας των ενζύμων VanR_B και VanS_B (Courvalin P., 2002; Baptista M. et al., 1997).

Μεταλλάξεις εντός των γονιδίων που κωδικοποιούν για την D-Ala-D-Ala λιγκάση (ddl) και εντός του VanS_B, μόνες ή σε συνδυασμό, έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφόρων φαινοτύπων όπως εξάρτηση από την βανκομυκίνη (V^{mD}), εξάρτηση από βανκομυκίνη και τεϊκοπλανίνη (V^{mD} Te^D), ετερογενή ανοχή σε βανκομυκίνη και τεϊκοπλανίνη (V^{m^{Het}} Te^{Het}), και τέλος επαγωγίμη ή σταθερή ομοιογενή ανοχή στα αντιβιοτικά αυτά (V^{m^R} Te^R) (Baptista M. et al., 1997).



Παρόμοιοι φαινότυποι αντοχής είχαν παρατηρηθεί *in vivo*, στην διάρκεια θεραπείας με γλυκοπεπτίδια και μπορούν να οδηγήσουν σε θεραπευτικές αποτυχίες (Bartista M. et al., 1997).

Το πρώτο *vanB* τρανσποζόνιο το οποίο περιεγράφη ήταν το Tn1547. Το τρανσποζόνιο αυτό βρέθηκε στο στέλεχος *E.faecalis* V583. Πρόσφατα περιεγράφη το Tn5382 σε στελέχη *E.faecium* με αντοχή τύπου *vanB*. Οι τελικές περιοχές του στοιχείου αυτού εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα με το συζευκτικό τρανσποζόνιο Tn916. Το Tn5382 είναι σε θέση να μεταφέρεται και ως μέρος ενός μεγαλύτερου γενετικού στοιχείου το οποίο περιλαμβάνει και ένα γονίδιο για την PBP5 του *E.faecium*. Το γονίδιο αυτό προσδίδει υψηλού βαθμού αντοχή στην αμπικιλίνη, ευθυνόμενο πιθανώς για την ταυτόχρονη εμφάνιση υψηλού βαθμού αντοχής στην αμπικιλίνη και στην βανκομυκίνη σε πολλά στελέχη *E.faecium* (Hancock L.E. & Gilmore M.S., 2006).

Φαινότυπος VanD

Η οργάνωση του VanD οπερόνιου είναι βασικά η ίδια με αυτήν των VanA και VanB. Τα γονίδια VanZ και VanW απουσιάζουν στο συγκεκριμένο οπερόνιο (Depardieu F. et al., 2004).

Ο φαινότυπος αυτός εμφανίζει κάποιες ιδιομορφίες.

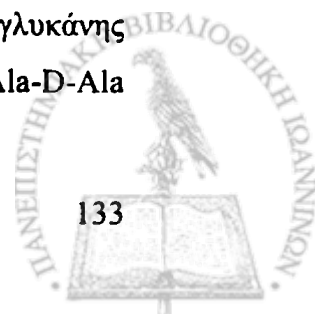
Πρώτον, σε αντίθεση με τους VanA και VanB, η αντοχή των VanD στελεχών στα γλυκοπεπτίδια είναι σταθερή.

Δεύτερον, ενώ τα VanA και VanB οπερόνια μπορούν να εδράζονται είτε σε πλασμίδια είτε στο χρωμόσωμα, το VanD οπερόνιο εδράζεται αποκλειστικά στο χρωμόσωμα, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η συζευκτική μεταφορά του.

Μέχρι πρότινος, ο VanD φαινότυπος παρατηρείτο μόνο σε στελέχη *E.faecium*. Τα στελέχη αυτά χαρακτηρίζονταν από μετρίου βαθμού αντοχή στην βανκομυκίνη (MIC από 16-256 µg/ml) και στην τεϊκοπλανίνη (MIC από 4-64 µg/ml).

Σήμερα έχουν περιγραφεί και στελέχη *E.faecalis* που φέρουν το VanD οπερόνιο. Τα πρώτα στελέχη VanD *E.faecalis* που περιεγράφησαν ήταν τα BM 4539 και BM4540. Τα στελέχη αυτά χαρακτηρίζονται από χαμηλού βαθμού αντοχή στην βανκομυκίνη (MIC 16 µg/ml) και ευαισθησία στην τεϊκοπλανίνη (Depardieu F. et al., 2004).

Όλα τα VanD στελέχη συνθέτουν μια τροποποιημένη λιγάση. Αποτέλεσμα της τροποποίησης αυτής είναι η ελλειπής σύνθεση πρόδρομων μορφών πεπτιδογλυκάνης των οποίων οι πλευρικές πενταπεπτιδικές αλυσίδες τερματίζουν σε D-Ala-D-Ala



(Depardieu F. et al., 2004). Η σύνθεση αυτής της τροποποιημένης λιγάσης είναι απότοκος είτε μεταλλάξεων είτε εισχωρήσεων (insertions) μικρών αλληλουχιών στην περιοχή του ddl γονιδίου. Έτσι, στην περίπτωση του στελέχους A902 έχουμε μια μετάλλαξη E13G, στην περίπτωση του BM4538 έχουμε μια μετάλλαξη S319 στην σερίνη που εμπλέκεται στην σύνδεση του ATP, ενώ στα BM4539 και BM4540 έχουμε την εισχώρηση μιας αλληλουχίας 7 bp (Depardieu F. et al., 2004).

Για την σταθερή έκφραση της αντοχής στον VanD φαινότυπο ευθύνονται εξαλείψεις (deletions), μεταλλάξεις ή εισχωρήσεις. Αναλυτικά, στο στέλεχος A902 έχουμε μια εξάλειψη 1 bp στο VanS, στο BM4538 έχουμε μια μετάλλαξη G140 στο VanR, ενώ στα BM4539 και BM4540 ευθύνονται οι ίδιες εισχωρήσεις που ευθύνονται και για την σύνθεση της τροποποιημένης λιγάσης (Depardieu F. et al., 2004).

Φαινότυπος VanC

Ανευρίσκεται στα είδη της λεγόμενης ομάδας II των εντεροκόκκων.

Αναλυτικά, στο είδος *E.gallinarum* ανευρίσκεται ο VanC1 φαινότυπος, στο είδος *E.casseliflavus* ο VanC2 και στο είδος *E.flavescens* ο VanC3 (Arias C.A. et al., 2000).

Εκπροσωπούνται από τα πρότυπα στελέχη :

- *E.gallinarum* ATCC 49573
- *E.casseliflavus* ATCC 25788
- *E.flavescens* CCM-439

Τα στελέχη αυτά επιδεικνύουν χαμηλού βαθμού αντοχή στην βανκομυκίνη ενώ είναι ευαίσθητα στην τεϊκοπλανίνη.

Η αντοχή στην βανκομυκίνη οφείλεται στην αντικατάσταση της D-Ala στην C-τελική θέση του UDP-MurNAC-πενταπεπτιδίου από μια D-Ser. Με άλλα λόγια, οι φυσιολογικές πλευρικές πενταπεπτιδικές αλυσίδες L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala που φέρουν τα μόρια του N-ακετυλο-μουραμικού οξέος υποκαθίστανται από τα πενταπεπτίδια L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ser (Arias C.A. et al., 2000; Dutta I. & Reynolds P.E., 2002).

Το VanC οπερόνιο αποτελείται από 5 γονίδια :

- vanC γονίδιο (vanC-1, vanC-2, vanC-3)

κωδικοποιεί για μια λιγάση η οποία συνθέτει το τελικό διπεπτίδιο D-Ala-D-Ser.



- vanXYc γονίδιο

κωδικοποιεί για ένα ένζυμο με διττή δράση D,D-διπεπτιδάσης και D,D-καρβοξυπεπτιδάσης. Η D,D-διπεπτιδάση υδρολύει το τελικό διπεπτίδιο D-Ala-D-Ala ενώ η D,D-καρβοξυπεπτιδάση απομακρύνει όσα C-τελικά D-Ala διέφυγαν την υδρόλυση από την D,D-διπεπτιδάση (Courvalin P., 2002; Depardieu F. et al., 2004; Arias C.A. et al., 2000).

- vanT γονίδιο

κωδικοποιεί για μια ρακεμάση σερίνης η οποία είναι συνδεδεμένη στην μεμβράνη και η οποία είναι υπεύθυνη για την σύνθεση της D-Ser (Arias C.A. et al., 2000).

- vanRc και vanSc γονίδια

πρόκειται για τα ρυθμιστικά γονίδια του VanC οπερόνιου. Τα γονίδια αυτά εμφανίζουν σημαντικές ομοιότητες με τα αντίστοιχα του VanA οπερόνιου.

Η οργάνωση του VanC οπερόνιου διαφέρει από την οργάνωση των VanA, VanB και VanD οπερόνιων κατά το ότι τα ρυθμιστικά γονίδια vanRc και vanSc έπονται των γονιδίων αντοχής, μεταγράφονται δηλαδή μετά από αυτά (Arias C.A. et al., 2000; Dutta I. & Reynolds P.E., 2002).

Η έκφραση της αντοχής είναι σταθερή στην περίπτωση του *E.gallinarum* BM 4174 και επαγωγή στην περίπτωση των *E.casseliflavus* ATCC 25788 και *E.flavescens* CCM 439 (Dutta I. & Reynolds P.E., 2002). Στην περίπτωση του *E.casseliflavus* ATCC 25788 η επαγωγή είναι βραδεία : πρόδρομες μορφές πεπτιδογλυκάνης που καταλήγουν σε D-Ser εμφανίζονται 225 λεπτά μετά την προσθήκη βανκομυκίνης (Dutta I. & Reynolds P.E., 2002).

Τα VanC1, VanC2 και VanC3 οπερόνια εμφανίζουν σημαντικές ομοιότητες. Έτσι, οι αλληλουχίες των αμινοξέων που κωδικοποιούν συμπίπτουν σε μεγάλο βαθμό: 71-91 % ομολογία (homology) μεταξύ των vanC1 και vanC2 και 65-91 % ομολογία μεταξύ των vanC1 και vanC3 (Dutta I. & Reynolds P.E., 2002; Dutta I. & Reynolds P.E., 2003).

Η ομολογία μεταξύ vanC2 και vanC3 είναι πολύ υψηλή: 97% μεταξύ vanT_{C-2} και vanT_{C-3} και 100% μεταξύ VanR_{C-2} και VanR_{C-3}. Αποτέλεσμα είναι να προκύπτουν προβλήματα διάκρισης των δύο αυτών ειδών, ακόμα και με μοριακές μεθόδους (Clark N.C. et al., 1998).

Φαινότυπος VanE

Ο φαινότυπος αυτός εμφανίζει σημαντικές ομοιότητες με τον VanC φαινότυπο. Εκπρόσωπος του φαινότυπου αυτού είναι το στέλεχος *E.faecalis* BM4405.

Και εδώ η αντοχή στην βανκομυκίνη είναι χαμηλού βαθμού (MIC = 16 µg/ml) και οφείλεται στην επαγωγίμη σύνθεση προδρόμων μορφών πεπτιδογλυκάνης των οποίων οι πλευρικές πενταπεπτιδικές αλυσίδες τερματίζουν σε D-Ala-D-Ser (Fines M. et al., 1999; Patiño L.A. et al., 2002). Τα στελέχη αυτά είναι ευαίσθητα στην τεϊκοπλανίνη (MIC = 0.5 µg/ml).

Το VanE οπερόνιο περιλαμβάνει 5 γονίδια των οποίων η σειρά μεταγραφής είναι : vanE → vanXY_E → vanT_E → vanR_E → vanS_E

Και τα 5 γονίδια φέρουν έναν κοινό προαγωγέα (Patiño L.A. et al., 2002).

Τα κωδικόνια έναρξης των vanXY_E και vanT_E επικαλύπτονται με τα κωδικόνια τερματισμού των vanE και vanXY_E αντίστοιχα, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα γονίδια vanE, vanXY_E και vanT_E μεταγράφονται ως ένα σύνολο (Patiño L.A. et al., 2002). Τα γονίδια αυτά αντιστοιχούν απολύτως με τα γονίδια του VanC οπερόνιου.

Η ομολογία των VanE, VanXY_E και VanT_E με τα αντίστοιχα γονίδια του VanC οπερόνιου κυμαίνεται από 43-53% ενώ η ομολογία των VanR_E και VanS_E με τα VanR_C και VanS_C είναι 60 και 44 % αντίστοιχα.

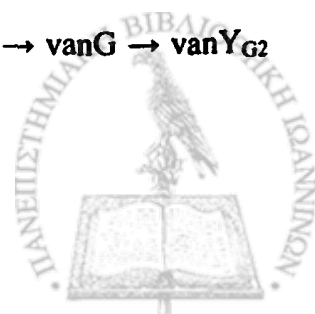
Λόγω της ύπαρξης ενός stop codon στη θέση 78, το VanS_E είναι πιθανώς μη λειτουργικό. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι το κωδικόνιο έναρξης του VanS_E επικαλύπτεται με το κωδικόνιο τερματισμού του VanR_E, συνηγορούν υπέρ της ύπαρξης ενός δεύτερου ρυθμιστικού συστήματος (Patiño L.A. et al., 2002).

Φαινότυπος VanG

Τα στελέχη με αυτόν τον φαινότυπο εμφανίζουν χαμηλού βαθμού αντοχή στην βανκομυκίνη (MIC = 12 -16 µg/ml) ενώ είναι ευαίσθητα στην τεϊκοπλανίνη (MIC = 0.5 µg/ml). Πρόκειται για έναν φαινότυπο που ομοιάζει με τους VanB και VanE.

Το πρώτο στέλεχος που μελετήθηκε ήταν το *E.faecalis* WCH9 (McKessar S.J. et al., 2002). Το VanG οπερόνιο περιέχει 7 ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια τα οποία έχουν διαφορετική οργάνωση σε σχέση με όλα τα άλλα van οπερόνια.

Τα 7 αυτά γονίδια είναι : vanR_G → vanS_G → vanY_{G1} → vanW_G → vanG → vanY_{G2} → vanT_G (5' → 3')



Το vanS_G ακολουθείται από μια αγκύλη, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα 2 ρυθμιστικά γονίδια ίσως μεταγράφονται ξεχωριστά από τα υπόλοιπα γονίδια του locus, τα οποία κωδικοποιούν για δύο D,D- πεπτιδάσες (vanY_{G1} και vanY_{G2}), μια λιγάση (vanG), μια ρακεμάση (vanT_G) και για μία πρωτεΐνη με άγνωστη λειτουργία (vanW_G) (McKessar S.J. et al., 2002).

Ενδιαφέροντα είναι η παρατήρηση ότι δεν βρέθηκε καμία περιοχή προαγωγή πριν από το vanY_{G1} , ενώ η μόνη περιοχή με αλληλουχίες που προσομοιάζουν με προαγωγή βρέθηκε κοντά στο 3' άκρο του vanW_G . Ως εκ τούτου, τα ORFs των vanY_{G1} και vanW_G ίσως να μην μεταγράφονται.

Ο βαθμός ταύτισης των αλληλουχιών αμινοξέων (ομολογία) ανάμεσα στην VanG -λιγάση και στις άλλες λιγάσες κυμαίνεται από 39-47 %. Η ομολογία αυτή δεν είναι μεγαλύτερη από αυτήν που παρατηρείται μεταξύ των υπολοίπων λιγασών (38-76%). Για τον λόγο αυτό, πιστεύεται ότι η VanG δεν είναι μια ελάσσων παραλλαγή κάποιας άλλης λιγάσης αλλά αποτελεί μια ξεχωριστή τάξη (McKessar S.J. et al., 2002).

Γλυκοπεπτίδια-εξηρητημένοι εντερόκοκκοι

Ένα ενδιαφέρον και εξαιρετικά σημαντικό από κλινική σκοπιά φαινόμενο έχει αναπτυχθεί σε ορισμένα στελέχη φαινότυπου VanA ή VanB . Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται εξάρτηση από τα γλυκοπεπτίδια (glycopeptide dependence). Τα στελέχη αυτά δεν είναι απλώς ανθεκτικά στην βανκομυκίνη ή σε βανκομυκίνη και τεϊκοπλανίνη, αλλά χρειάζονται την παρουσία των γλυκοπεπτιδίων προκειμένου να αναπτυχθούν (Courvalin P., 2006; Mupray B.E., 1997).

Βανκομυκίνη-εξηρητημένοι εντερόκοκκοι έχουν απομονωθεί *in vitro*, από πειραματόζωα καθώς και από ασθενείς οι οποίοι ελάμβαναν μακροχρόνιες θεραπείες με βανκομυκίνη (Courvalin P., 2006). Έχουν επίσης απομονωθεί από φαινομενικά στείρα κλινικά δείγματα τα οποία καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν βανκομυκίνη, όπως πχ τα εκλεκτικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του *Campylobacter spp* ή της *Neisseria gonorrhoeae*.

Γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι τα στελέχη αυτά απαιτούν ειδικές καλλιεργητικές συνθήκες που συχνά ξεφεύγουν από τις δοκιμασίες ρουτίνας ενός κλινικού εργαστηρίου. Για τον λόγο αυτό, ο επιπολασμός τους ίσως έχει υποεκτιμηθεί (Courvalin P., 2006).



Μια από τις πρώτες δημοσιεύσεις περιέγραφε έναν ασθενή ο οποίος είχε λάβει προσφάτως βανκομυκίνη για θεραπεία μιας λοίμωξης από VRE και του οποίου οι αιμοκαλλιέργειες θετικοποιήθηκαν εκ νέου. Στις ανακαλλιέργειες των ζωμών σε αιματούχο άγαρ δεν παρατηρήθηκε καμία ανάπτυξη παρά μόνο γύρω από ένα δισκίο βανκομυκίνης το οποίο τοποθετήθηκε στα πλαίσια ενός προκαταρκτικού test ευαισθησίας. Η ερμηνεία που δόθηκε ήταν ότι στο αίμα του ασθενούς υπήρχε ικανή συγκέντρωση βανκομυκίνης ώστε να επιτρέψει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού εντός της φιάλης της αιμοκαλλιέργειας (Murray B.E., 1997).

Οι εντερόκοκκοι αυτοί, λόγω μεταλλάξεων στο *ddl* γονίδιο, δεν είναι σε θέση να συνθέτουν φυσιολογικά τελικά διπεπτίδια D-Ala-D-Ala. Κατά συνέπεια μπορούν να αναπτυχθούν μόνο αν είναι σε θέση να συνθέσουν ένα εναλλακτικό διπεπτίδιο. Στην περίπτωση των περισσότερων VanA και VanB στελεχών αυτή η σύνθεση του υποκατάστατου διπεπτιδίου συμβαίνει μόνο παρουσία βανκομυκίνης. Η βανκομυκίνη επάγει την σύνθεση της D-Ala-D-Lac λιγάσης (*vanA* ή *vanB*) καθώς και την σύνθεση της δεϋδρογενάσης (*vanH*), γεγονός που επιτρέπει την ανάπτυξη των βακτηρίων χάρη στην παραγωγή εναλλακτικών διπεπτιδίων D-Ala-D-Lac (Courvalin P., 2006; Murray B.E., 1997). Όταν απομακρυνθεί η βανκομυκίνη, τότε παύει η σύνθεση και του εναλλακτικού διπεπετιδίου, οπότε τα βακτήρια αυτά δεν είναι πλέον σε θέση να αναπτύσσονται ή να πολλαπλασιάζονται (Murray B.E., 1997).

Κλείνοντας την παράγραφο, αναφέρουμε ότι είναι δυνατόν τα στελέχη αυτά να καταστούν βανκομυκίνη-ανεξάρτητα (*vancomycin-independent*). Αυτή η μετατροπή είναι αποτέλεσμα είτε μιας μετάλλαξης στο *VanS* η οποία οδηγεί στην σταθερή παραγωγή D-Ala-D-Lac, είτε μιας μετάλλαξης στο *ddl* η οποία αποκαθιστά την σύνθεση D-Ala-D-Ala (Huysck M.M. et al., 1998).



Επιδημιολογία των βανκομυκίνη-ανθεκτικών εντεροκόκκων

Η πρώτη αναφορά βανκομυκίνη-ανθεκτικού εντεροκόκκου (VRE) έγινε το 1988 στην Αγγλία, λίγες ημέρες μετά από την συγχορήγηση βανκομυκίνης και κεφταζιντίμης ως εμπειρικής θεραπείας ασθενούς με σήψη. Σύντομα ακολούθησε η αναφορά δύο στελεχών που απομονώθηκαν στην Γαλλία από τα κόπρανα ασθενών με οξεία λευχαιμία, οι οποίοι είχαν λάβει *per os* καναμυκίνη, σισομυκίνη, νιτροφουράνια και κολιστίνη για 5 ημέρες πριν υποβληθούν σε μεταμόσχευση μυελού (Murray B.E., 1997). Έκτοτε παρατηρείται μια δραματική αύξηση στην συχνότητα απομόνωσης των VRE.

Σήμερα, σε μονάδες αιμοκάθαρσης σε ΗΠΑ, Βραζιλία, Ιρλανδία και αλλού, γίνεται λόγος για ποσοστά αποικισμού της τάξεως του 10-15% (Zirakzadeh A. & Patel R., 2005).

Τα ποσοστά αποικισμού με VRE είναι ακόμα μεγαλύτερα στις μονάδες εντατικής θεραπείας. Από ένα νοσοκομείο του Sao Paulo υπήρξαν αναφορές για ποσοστά αποικισμού της τάξεως του 33%, ενώ το 40 % των ασθενών της ΜΕΘ ενός πανεπιστημιακού νοσοκομείου του St. Louis είτε ήταν αποικισμένοι είτε είχαν λοίμωξη από VRE. Το πλέον ανησυχητικό γεγονός ήταν ότι ένα 10% των ασθενών αυτών ήταν ταυτόχρονα αποικισμένοι και με MRSA (Zirakzadeh A. & Patel R., 2005).

Σήμερα, υπάρχουν σοβαρές ανησυχίες για το ενδεχόμενο η εξάπλωση των VRE στα νοσοκομεία να δημιουργήσει ένα *reservoir* κινητών γονιδίων αντοχής προς ένα άλλο, περισσότερο λοιμογόνο νοσοκομειακό παθογόνο, όπως οι MRSA (Deshpande L.M. et al., 2007).

Η πρόσφατη ανακάλυψη ενός κλώνου *E.faecium* με παγκόσμια κατανομή, απόλυτα προσαρμοσμένου στο νοσοκομειακό περιβάλλον (CC-17), μας δίνει μια πειστική ερμηνεία για την γρήγορη εξάπλωση των VRE εντός του νοσοκομειακού περιβάλλοντος. Ο CC-17 είναι ένας ιδιαίτερα λοιμογόνος κλώνος ο οποίος προέκυψε ως το αποτέλεσμα μιας συσσωρευτικής εξελικτικής διεργασίας.

Η πρόσκτηση αντοχής στην αμπικιλίνη θεωρείται ως το αρχικό βήμα προσαρμογής, το γεγονός δηλαδή το οποίο προσέδωσε στο είδος *E.faecium* ένα πλεονέκτημα επιλογής (*selective advantage*) εντός του νοσοκομειακού περιβάλλοντος. Η δευτερογενής πρόσκτηση ενός κινητού μεταθετού στοιχείου με το χαρακτηριστικό γονίδιο *esp* διευκόλυνε έτι περαιτέρω την εξάπλωση (Deshpande L.M. et al., 2007).

Στελέχη με αυτά τα χαρακτηριστικά απαντώνται ολοένα και συχνότερα σε νοσοκομειακές επιδημίες.

Τα ευρήματα του παγκόσμιου προγράμματος επιτήρησης SENTRY κατέδειξαν σημαντικές διαφορές στην επιδημιολογία των VRE μεταξύ Ευρώπης και Αμερικής. Στη συνέχεια θα περιγράψουμε τις σημαντικότερες πτυχές των διαφορών αυτών.

Κλινική επιδημιολογία των VRE στην Βόρεια Αμερική

Σύμφωνα με τις αναφορές του προγράμματος επιτήρησης NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance) του CDC, το ποσοστό των VRE επί του συνόλου των εντεροκόκκων που απομονώνονται από αιμοκαλλιέργειες στις ΗΠΑ ανήλθε από 0% το 1989 σε 25.9% το 1999 (Deshpande L.M. et al., 2007). Φαίνεται πως στις ΗΠΑ, οι VRE εξαπλώθηκαν από Βορειοανατολικά προς τις μεσοδυτικές πολιτείες και στη συνέχεια προς την δυτική ακτή.

Αρχικά, είχαμε αναφορές για νοσοκομειακές επιδημίες που αφορούσαν μικρούς αριθμούς ασθενών και οι οποίες μπορούσαν να τεθούν υπό έλεγχο με κάποια ενισχυμένα μέτρα. Όμως, καθώς ολοένα και περισσότεροι ασθενείς αποικίζονταν με VRE, δεν άργησαν να εμφανιστούν οι πρώτες περιπτώσεις ενδημικότητας (1994). Ο αποικισμός ήταν συχνότερος μεταξύ βαρέως πασχόντων και ανοσοκατεσταλμένων, καθώς και σε πτέρυγες όπου η χρήση αντιβιοτικών ήταν μεγαλύτερη. Η διασταυρούμενη μετάδοση επιβεβαιώθηκε ως μια σημαντική οδός εξάπλωσης, γεγονός που υποδηλώνει σοβαρά κενά στην εφαρμογή των ορθών πρακτικών ελέγχου των λοιμώξεων (Deshpande L.M. et al., 2007).



Μια σειρά μελετών κατέδειξε ότι η επιδημιολογία των VRE στα νοσοκομεία επηρεάζεται από μια σειρά αλληλοεξαρτώμενων παραγόντων. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την νοσοκομειακή εξάπλωση των VRE είναι οι ακόλουθοι :

Αποικισμός του ασθενούς

Παρόλο που οι εντερόκοκκοι αποτελούν φυσιολογικούς αποικιστές του εντερικού σωλήνα του ανθρώπου, εν τούτοις ο εποίκισμός με VRE στους νοσοκομειακούς ασθενείς δεν περιορίζεται στο έντερο. Πράγματι, έχουν απομονωθεί VRE από το ανέπαφο δέρμα των άκρων, τον στοματοφάρυγγα, τις γαστρικές εκκρίσεις καθώς και τις εκκρίσεις της τραχείας. Ο αποικισμός των εστιών αυτών είναι εμμένων (persistent) και η επιμόλυνση του άμεσου περιβάλλοντος του ασθενούς (κλινოსκεπάσματα, τροχήλατα) είναι συχνή. Φαίνεται πως οι VRE συνδυάζουν χαρακτηριστικά πολλών νοσοκομειακών παθογόνων όπως ο εμμένων εποίκισμός του εντέρου (όπως τα εντεροβακτηριακά), ο εποίκισμός του δέρματος (όπως ο *S.aureus*) και η επιμόλυνση του περιβάλλοντος (όπως το *C.difficile*).

Τα μεγάλα reservoirs των VRE, ειδικά το άμεσο περιβάλλον και το δέρμα του ασθενούς, τα οποία έρχονται σε επαφή με τα χέρια του ιατρικού και νοσηλευτικού προσωπικού, έχουν συμβάλει σημαντικά στην ταχεία εξάπλωση των VRE στα νοσοκομεία (Boten M.J.M. et al., 2001).

Μολυσμένο περιβάλλον

Οι VRE μεταδίδονται με άμεση επαφή. Τα χέρια του ιατρικού και νοσηλευτικού προσωπικού και ο μολυσμένος εξοπλισμός αποτελούν τις κύριες πηγές μετάδοσης.

Στον μολυσμένο εξοπλισμό περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων στηθοσκόπια, θερμόμετρα, πιεσόμετρα, monitors και τροχήλατα. Ο εποίκισμός των ασθενών ύστερα από επιμόλυνση τέτοιων συσκευών είναι πλέον αποδεδειγμένος από μια πληθώρα εργασιών. Οι περισσότερες μελέτες αφορούν μονοκλωνικές επιδημίες από VRE, ενώ πολύ λιγότερες έχουν γίνει σχετικά με την επίδραση της επιμόλυνσης στην επιδημιολογία των VRE όταν επικρατούν συνθήκες ενδημικότητας (endemicity) (Bonten M.J.M. et al., 1996).

Σε μια τέτοια μελέτη, διερευνήθηκε η επιμόλυνση του άμεσου περιβάλλοντος και ο αποικισμός των ασθενών της ΜΕΘ ενός μεγάλου νοσοκομείου. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η επιμόλυνση του περιβάλλοντος του ασθενούς είναι συνήθως παροδική και ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των βακτηρίων στις μολυσμένες επιφάνειες είναι χαμηλός.



Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι στην περίπτωση του διασταυρούμενου αποικισμού, το περιβάλλον είναι λιγότερο σημαντικό από την παρουσία αποικισμένων ασθενών (Bonten M.J.M. et al., 2001). Ένας αποικισμός χαρακτηρίζεται ως διασταυρούμενος (cross-colonisation), όταν το ταυτοποιούμενο στέλεχος είναι πανομοιότυπο με ένα στέλεχος το οποίο είχε προηγουμένως καλλιεργηθεί από κάποια επιφάνεια του περιβάλλοντος του ασθενούς ή από κάποιον άλλο ασθενή ο οποίος βρίσκεται ακόμα στην ΜΕΘ. Αντιθέτως, η συμβολή της επιμόλυνσης του περιβάλλοντος του ασθενούς στην επιδημιολογία των VRE ίσως είναι μεγαλύτερη σε καταστάσεις ενδημικότητας (Bonten M.J.M. et al., 2001).

Σε μια μεγάλη προοπτική μελέτη, βρέθηκε ότι ο υψηλής πυκνότητας (high density) αποικισμός του εντέρου με VRE συνδέεται ισχυρά με την πιθανότητα απομόνωσης VRE από δείγματα του περιβάλλοντος του ασθενούς.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η επαφή του νοσηλευτικού προσωπικού με το άμεσο περιβάλλον του ασθενούς ευνοεί την επιμόλυνση των χεριών και επακολούθως την μεταφορά βακτηρίων σε άλλους, μη αποικισμένους ασθενείς (Donskey C.J. et al., 2000).

Πίεση αποικισμού

Από την στιγμή που οι νοσηλευόμενοι ασθενείς αποτελούν τα σημαντικότερα reservoirs VRE αλλά και πηγές επιμόλυνσης για το άμεσο περιβάλλον, είναι αναμενόμενο το ποσοστό των αποικισμένων ασθενών (πίεση αποικισμού / colonisation pressure) να επηρεάζει την εξάπλωση των VRE (Bonten M.J.M. et al., 2001).

Πράγματι, βρέθηκε πως η πίεση αποικισμού αποτελεί την σημαντικότερη παράμετρο για την εξάπλωση των VRE. Η επίδραση άλλων παραμέτρων, όπως η εντερική σίτιση ή η χρήση κεφαλοσπορινών 3^{ης} γενεάς καθίστατο στατιστικώς σημαντική μόνο όταν η πίεση αποικισμού ήταν κάτω από 50% (Bonten M.J.M. et al., 1998).

Πίεση επιλογής

Η πίεση επιλογής (selective pressure) των αντιβιοτικών είναι άλλη μία σημαντική μεταβλητή στην επιδημιολογία των VRE. Κλασικό παράδειγμα αντιβιοτικών τα οποία ασκούν τέτοια πίεση επιλογής είναι τα γλυκοπεπτιδία. Η εμφάνιση των VRE στα νοσοκομεία των ΗΠΑ συνδέθηκε με την πολύ μεγαλύτερη χρήση βανκομυκίνης σε σχέση με την Ευρώπη.



Μια σύγκριση των ΗΠΑ με 5 Ευρωπαϊκές χώρες έδειξε ότι η ετήσια κατανάλωση βανκομυκίνης στις ΗΠΑ ήταν πενταπλάσια έως δεκαπλάσια σε σχέση με την Ευρώπη (Bonten M.J.M. et al., 2001). Ο ρόλος της χρήσης βανκομυκίνης στον αποικισμό με VRE είναι αντιφατικός.

Κάποιες μελέτες έδειξαν ότι η προηγούμενη χρήση βανκομυκίνης δεν συνδέεται με αποικισμό (Zirakzadeh A. & Patel R., 2005; Carmeli Y. et al., 1999). Η θέση αυτή φαίνεται πειστική από βιολογική σκοπιά, καθώς η βανκομυκίνη απεκκρίνεται από τους νεφρούς και επομένως η εντερική χλωρίδα δεν έρχεται σε επαφή με το αντιβιοτικό, όταν αυτό χορηγείται ενδοφλεβίως.

Υπάρχει όμως και μια σειρά επιδημιολογικών ερευνών, σύμφωνα με τις οποίες η ενδοφλέβια χορήγηση βανκομυκίνης προάγει τον αποικισμό και την λοίμωξη με VRE (Donskey C.J. et al., 2000; Zirakzadeh A. & Patel R., 2005). Σε μια από τις εργασίες αυτές βρέθηκε ότι η Ε.Φ χορήγηση 1 g βανκομυκίνης ανά 12ωρο και για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 5 ημερών, είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση βανκομυκίνης στα 26 δείγματα κοπράνων εκ των 28 συνολικά. Τα επίπεδα βανκομυκίνης που ανιχνεύτηκαν κυμάνθηκαν από 2-95 µg / ml, επίπεδα τα οποία είναι επαρκή για την εκλεκτική επιλογή των VRE (Zirakzadeh A. & Patel R., 2005; Currie B.P. & Lemos-Filho L., 2004). Η σημασία των ευρημάτων αυτών είναι θεωρητικά μεγαλύτερη για ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια. Η *per os* χορηγούμενη βανκομυκίνη επιφέρει μια εκσεσημασμένη αναστολή των *Bacteroides* spp, γεγονός που εξηγεί την δράση της στην κατεύθυνση της πίεσης επιλογής (Donskey C.J. et al., 2000).

Σήμερα γνωρίζουμε ότι, εκτός από την βανκομυκίνη υπάρχει και μια πληθώρα αντιβιοτικών των οποίων η χορήγηση συνδέεται με λοίμωξη ή αποικισμό από VRE. Τα αντιβιοτικά αυτά είναι οι κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενιάς, τα αντιβιοτικά με δράση έναντι των αναεροβίων βακτηρίων, η σιπροφλοξασίνη και οι αμινογλυκοσίδες.

Στα αντιβιοτικά με δράση έναντι των αναεροβίων βακτηρίων περιλαμβάνονται μεταξύ των άλλων, η κεφοξιτίνη, η κεφτριαξόνη, οι συνδυασμοί πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης, αμπικιλίνης-σουλβακτάμης, αμοξυκιλλίνης-κλαβουλανικού οξέος, ιμιπενέμης-σιλαστατίνης, η μεροπενέμη, η μετρονιδαζόλη και η κλινδαμυκίνη.

Η βάση της συσχέτισης ανάμεσα στην έκθεση στα αντιβιοτικά αυτά και στον αποικισμό ή την λοίμωξη από VRE δεν είναι ξεκάθαρη. Η κρατούσα άποψη είναι ότι ορισμένα αντιβιοτικά προάγουν την ανάπτυξη των VRE στον εντερικό σωλήνα κυρίως



μέσω της αναστολής των αναεροβίων βακτηρίων, τα οποία ανταγωνίζονται τους VRE για χώρο και θρεπτικά συστατικά (Donskey C.J. et al., 2000).

Η ποσότητα του ενεργού αντιβιοτικού στον εντερικό σωλήνα εξαρτάται από τον βαθμό της χολικής ή εντερικής απέκκρισης καθώς και από τον βαθμό αδρανοποίησης του αντιβιοτικού (Donskey C.J. et al., 2000). Για παράδειγμα, η συγκέντρωση κεφτριαξόνης στην χολή μπορεί να φτάσει τα 5000 µg/ml, ενώ η MIC των *Enterococcus spp* στην κεφτριαξόνη είναι 10000 µg/ml.

Γίνεται έτσι αντιληπτό, ότι η χορήγηση μιας κεφαλοσπορίνης είναι σε θέση να εκριζώσει όλη την χλωρίδα του εντέρου πλήν των VRE. Αντίθετα, οι εφικτές στάθμες πιπερακιλλίνης στην χολή (1000-2000 µg/ml) υπερβαίνουν την MIC των περισσότερων στελεχών *Enterococcus spp* (256-1024 µg/ml) (Bonten M.J.M. et al., 2001).

Άκρως ενδιαφέροντα υπήρξαν τα ευρήματα μιας επτάμηνης μελέτης κοορτών. Σύμφωνα με την μελέτη αυτή, η χορήγηση αντιβιοτικών με δράση έναντι των αναεροβίων σε ασθενείς ήδη αποικισμένους με VRE, παρέτεινε τον υψηλής πυκνότητας αποικισμό με τα στελέχη αυτά, γεγονός που επηρεάζει την επιδημιολογία των VRE και προς την κατεύθυνση της αυξημένης διασποράς βακτηρίων προς το άμεσο περιβάλλον του ασθενούς (Donskey C.J. et al., 2000).

Κλινική επιδημιολογία των VRE στην Ευρώπη

Οι VRE δεν αποτελούν, μέχρι στιγμής τουλάχιστον, σημαντικά νοσοκομειακά παθογόνα για την Ευρώπη. Τα αναφερόμενα ποσοστά των VRE επί του συνόλου των νοσοκομειακών εντεροκοκκικών λοιμώξεων δεν υπερβαίνουν το 3%.

Παρόλα αυτά, τα κρούσματα VRE στα Ευρωπαϊκά νοσοκομεία ανήλθαν σημαντικά. Οι περισσότερες αναφορές κάνουν λόγο για σποραδικά κρούσματα, εν τούτοις έχουν περιγραφεί και κάποιες νοσοκομειακές επιδημίες, κυρίως σε αιματολογικές κλινικές, μονάδες τεχνητού νεφρού, εντατικής θεραπείας και μεταμόσχευσης ήπατος.

Αν και έχουν περιγραφεί πολυκλωνικές επιδημίες οφειλόμενες στην οριζόντια εξάπλωση ενός τρανσποζονίου, οι επιδημίες αυτές είναι στην μεγάλη τους πλειοψηφία μονοκλωνικές (Bonten M.J.M. et al., 2001).



Όπως και στις ΗΠΑ, οι περισσότερες επιδημίες προκλήθηκαν από κλώνους *VR-E.faecium* οι οποίοι ήταν ανθεκτικοί στην αμικικιλίνη (Suppola J.P. et al., 1999).

Αν και ασυνήθης ως αίτιο νοσοκομειακών λοιμώξεων, ο αποικισμός με VRE υγιών ατόμων και εκτρεφόμενων ζώων φαίνεται πως είναι συνήθης στην Ευρώπη. Η ύπαρξη αυτού του μεγάλου *reservoir* της κοινότητας συνδέθηκε με την ευρεία χρήση *ανορασίν* στην ζωϊκή παραγωγή. Η *ανορασίν* είναι ένα γλυκοπεπτίδιο το οποίο χρησιμοποιήθηκε από την δεκαετία του '70 ως προαγωγέας ανάπτυξης.

Σε πολλές χώρες, η χρήση *ανορασίν* στην ζωϊκή παραγωγή υπερέβη κατά πολύ την χρήση βανκομυκίνης στα νοσοκομεία. Για παράδειγμα, στην Δανία, κατά το έτος 1994 χρησιμοποιήθηκαν 24 kg βανκομυκίνης και 24000 kg *ανορασίν*. Η *ανορασίν* προσδίδει διασταυρούμενη αντοχή στην βανκομυκίνη και η χρήση της συνδέθηκε με υψηλά ποσοστά απομόνωσης VRE στα κόπρανα των ζώων καθώς και σε κρέατα. Έπακολούθως, οι VRE μπορούσαν να αποικίσουν υγιή άτομα μέσω της τροφικής αλυσίδας, είτε με άμεση επαφή είτε τρώγοντας μολυσμένα τρόφιμα.

Λαμβάνοντας υπόψη την εμπειρία των ΗΠΑ, Δανία και Νορβηγία απαγόρευσαν την χρήση *ανορασίν* τον Μάιο του 1995. Ακολούθησε η Γερμανία (Ιανουάριος 1996), και στη συνέχεια τα λοιπά κράτη της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Απρίλιος 1997).

Η αιτιολογική σχέση μεταξύ ζωϊκού *reservoir* και αποικισμού σε ανθρώπους δεν έχει αποδειχθεί οριστικά. Παρ'όλα αυτά, οι ενδείξεις υπέρ της ύπαρξης μίας τέτοιας σχέσης είναι πολλές. Μία από τις ενδείξεις που συνηγορούν υπέρ της συσχέτισης του ζωϊκού *reservoir* VRE με τον αποικισμό σε ανθρώπους είναι και η πτώση των ποσοστών αποικισμού με VRE μετά την διακοπή της χρήσης *ανορασίν*.

Αυτή η πτώση στον επιπολασμό του αποικισμού με VRE παρατηρήθηκε σε μελέτες που έγιναν στην Δανία, στην Γερμανία και στην Ολλανδία και αφορούσε τόσο εκτρεφόμενα ζώα όσο και υγιείς εθελοντές.

Αξίζει εδώ να αναφερθεί το παράδοξο της Νορβηγίας, όπου, τρία χρόνια μετά την διακοπή της χρήσης *ανορασίν*, εξακολουθούσαν να απομονώνονται VRE από το 99% των πτηνοτροφείων που χρησιμοποιούσαν *ανορασίν* και από το 11% εκείνων που δεν χρησιμοποιούσαν. Η επιδημιολογική αυτή διαφορά μεταξύ Νορβηγίας και των λοιπών Ευρωπαϊκών χωρών παραμένει ανεξήγητη (Bonten M.J.M. et al., 2001).

Μια δεύτερη ένδειξη υπέρ της ανωτέρω συσχέτισης προέκυψε από την ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού στελεχών VRE που προέρχονταν από ζώα, υγιή άτομα και

νοσοκομειακούς ασθενείς. Η ανάλυση έγινε με την χρήση AFLP (amplified fragment length polymorphism) και τα στελέχη ταξινομήθηκαν σε 4 ομάδες (genogroups) οι οποίες ονομάστηκαν αυθαίρετα A, B, C και D.

Η ομάδα A περιείχε όλα τα στελέχη που προέρχονταν από χοίρους καθώς και το 76% των στελεχών που προέρχονταν από υγιείς. Η ομάδα B περιείχε το 95% των στελεχών που προέρχονταν από πουλερικά καθώς και το 50% των στελεχών που προέρχονταν από πτηνοτρόφους.

Στον αντίποδα των ανωτέρω ευρημάτων ήταν ότι ο γονότυπος C, ο οποίος περιελάμβανε το 84% των νοσοκομειακών στελεχών, ήταν διαφορετικός τόσο από τα στελέχη τους κοινότητας όσο και από τα στελέχη των ζώων.

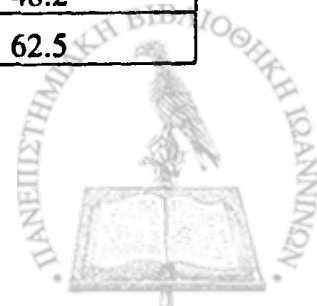
Μεταγενέστερες αναλύσεις κατέδειξαν ότι τα στελέχη που συνδέονταν με νοσοκομειακές επιδημίες χαρακτηρίζονταν από την παρουσία του γονιδίου *esp* και μιας ειδικής αλληλουχίας του γονιδίου *rugK*, τα οποία δεν ανευρίσκονταν σε στελέχη προερχόμενα από υγιείς ή ζώα. Τα ευρήματα αυτά θέτουν υπό αμφισβήτηση την άμεση σχέση μεταξύ των VRE του ζωϊκού *reservoir* και των VRE που προκαλούν νοσοκομειακές λοιμώξεις και επιδημίες.

Η τρίτη ισχυρή ένδειξη υπέρ τους αιτιολογικής σχέσης ζωϊκού *reservoir* και αποικισμού υγιών ατόμων προέκυψε από την ανεύρεση ταυτόσημων τραπεζοζονίων Tn1546 σε στελέχη προερχόμενα από εκτρεφόμενα ζώα και ανθρώπους, γεγονός που καταδεικνύει την ύπαρξη τους κοινού ανθρώπινου και ζωϊκού *reservoir* για τους VanA εντεροκόκκους (Bonten M.J.M. et al., 2001).

Πίνακας 13. Αντοχή των VRE σε Ευρώπη και Αμερική

E. faecalis

αντιβιοτικό	ΕΥΡΩΠΗ	Β. ΑΜΕΡΙΚΗ
Αμπικιλίνη	0.0	0.0
Χλωραμφαινικόλη	7.1	28.6
Σιπροφλοξασίνη	85.7	100
Λινεζολίδη	0.0	1.8
Quinupristin-dalfopristin	100	98.2
Τεϊκοπλανίνη	85.7	48.2
Γενταμυκίνη (HL)	85.7	62.5



E. faecium

αντιβιοτικό	ΕΥΡΩΠΗ	Β. ΑΜΕΡΙΚΗ
Αμπικιλίνη	97.5	98.7
Χλωραμφαινικόλη	15.0	0.5
Σιπροφλοξασίνη	87.5	99.5
Λινεζολίδα	0.0	0.8
Quinupristin-dalfopristin	10.0	0.6
Τεϊκοπλανίνη	67.5	78.5
Γενταμυκίνη (HL)	42.5	37.0

Στοιχεία του SENTRY antimicrobial surveillance program (Deshpande L.M. et al., 2007)

Β.9. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ *Enterococcus spp*

Η πενικιλίνη και η αμπικιλίνη παραμένουν τα αντιβιοτικά εκλογής σε εντεροκοκκικές λοιμώξεις όπως λοιμώξεις ουροποιητικού, περιτονίτιδες και λοιμώξεις τραυμάτων, όπου δεν απαιτείται βακτηριοκτόνος θεραπεία (Moellering R.C. Jr, 2005).

Τα γλυκοπεπίδια είναι οι εναλλακτικοί θεραπευτικοί παράγοντες σε ασθενείς οι οποίοι είναι αλλεργικοί στην πενικιλίνη καθώς και για στελέχη με υψηλού βαθμού αντοχή στην πενικιλίνη. Η νιτροφουραντοΐνη εξακολουθεί να χρησιμοποιείται επιτυχώς στην θεραπεία των ουρολοιμώξεων (UTI's) από εντερόκοκκο καθώς τα περισσότερα στελέχη παραμένουν ευαίσθητα στον παράγοντα αυτό.

Οι κινολόνες, όπως η σιπροφλοξασίνη και η οφλοξασίνη επιδεικνύουν *in vitro* δραστηριότητα έναντι των εντεροκόκκων και μπορούν να είναι χρήσιμες για την θεραπεία κάποιων UTI's, όμως η αποτελεσματικότητά τους στις συστηματικές εντεροκοκκικές λοιμώξεις γενικά αμφισβητείται, εκτός εάν συνδυαστούν με άλλο αντιβιοτικό. Επιπλέον, τα ολοένα αυξανόμενα ποσοστά αντοχής τις καθιστούν ακόμα λιγότερο ελκυστικές (Kauffman C.A., 2003).

Οι νεώτερες κινολόνες (levofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin) είναι μεν περισσότερο δραστικές *in vitro*, όμως εμφανίζουν μειωμένη δραστηριότητα έναντι των ανθεκτικών στην σιπροφλοξασίνη στελεχών, πράγμα που σημαίνει ότι η χρησιμότητά τους για την θεραπεία λοιμώξεων από πολυανθεκτικά στελέχη είναι στην καλύτερη περίπτωση περιορισμένη (Moellering R.C. Jr, 2005).

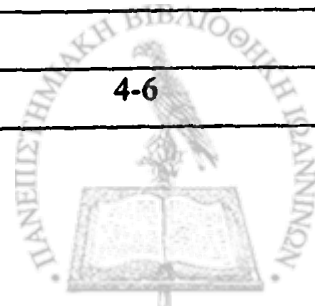
Τετρακυκλίνες και χλωραμφαινικόλη έχουν μόνο βακτηριοστατική δράση έναντι των εντεροκόκκων, με αποτέλεσμα να καταγράφονται πολλές θεραπευτικές αποτυχίες με τους παράγοντες αυτούς (Kauffman C.A., 2003).

Η συνδυασμένη θεραπεία είναι επιβεβλημένη στην περίπτωση της ενδοκαρδίτιδας από εντερόκοκκο και πιθανώς και στην περίπτωση της μηνιγγίτιδας. Στις περιπτώσεις εντεροκοκκικής βακτηριαιμίας χωρίς ενδοκαρδίτιδα δεν υπάρχει ομοφωνία σχετικά με το αν είναι απαραίτητη η συνδυασμένη θεραπεία. Ο συνδυασμός αντιβιοτικού με δράση έναντι του κυτταρικού τοιχώματος (πενικιλίνη, αμπικιλίνη ή βανκομυκίνη) με αμινογλυκοσίδη (στρεπτομυκίνη ή γενταμυκίνη) αποτελεί το standard στην θεραπεία της εντεροκοκκικής ενδοκαρδίτιδας ήδη από την εποχή της πρώτης απόδειξης της συνέργειας πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης, το 1947.

Ένα τρέχον θεραπευτικό σχήμα εντεροκοκκικής ενδοκαρδίτιδας παρατίθεται στον πίνακα 14 (Moellering R.C. Jr, 2005). Παρόμοια σχήματα χρησιμοποιούνται και για την θεραπεία της εντεροκοκκικής μηνιγγίτιδας. Στις περιπτώσεις αυτές όμως δεν υπάρχει επαρκής εμπειρία όσον αφορά την άριστη διάρκεια θεραπείας.

Πίνακας 14. θεραπευτικό σχήμα εντεροκοκκικής ενδοκαρδίτιδας

Απουσία υψηλού βαθμού αντοχής στις αμινογλυκοσίδες			
Αντιβιοτικό	Δοσολογία	Οδός	Διάρκεια (εβδομάδες)
Πενικιλίνη G	20-30 εκατομύρια U/ H	IV	4-6
ή			
Αμπικιλίνη	12-16 g / H	IV	4-6
συν			
Στρεπτομυκίνη	15 mg/kg ΒΣ/ Η *	IM	4-6
ή			
Γενταμυκίνη	3-5 mg/kg ΒΣ/ Η	IM ή IV	4-6
Πενικιλίνη G	20-30 εκατομύρια U/H	IV	4-6
ή			
Αμπικιλίνη	12-16 g / H	IV	4-6
συν			
Γενταμυκίνη	3-5 mg/kg ΒΣ/ Η	IM ή IV	4-6



Ασθενής αλλεργικός στη πενικιλίνη			
Βανκομυκίνη	30 mg/kg ΒΣ/ Η *	IV	4-6
συν			
Στρεπτομυκίνη	ως ανωτέρω	IM	4-6
ή Γενταμυκίνη	ως ανωτέρω	IM ή IV	
υψηλού βαθμού αντοχή στην στρεπτομυκίνη και στην γενταμυκίνη			
Αμπικιλίνη	12-16 g / Η ⁽¹⁾	IV	8-12

* Μέγιστη ημερήσια δόση 2 g

⁽¹⁾ Δεν υπάρχουν ακόμα επαρκή δεδομένα για την αποτελεσματικότητα αυτής της θεραπευτικής προσέγγισης και για τον λόγο αυτό πρέπει να θεωρείται πειραματική.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, 4 εβδομάδες συνδυασμένης θεραπείας φαίνεται πως αρκούν. Τα θεραπευτικά σχήματα των 6 εβδομάδων αφορούν ασθενείς οι οποίοι εμφάνιζαν συμπτώματα 3 μήνες πριν από την έναρξη της θεραπείας, ασθενείς με προσθετικές βαλβίδες ή ασθενείς οι οποίοι υποτροπίασαν ύστερα από προηγούμενα, βραχύτερης διάρκειας σχήματα.

Η εμφάνιση των πολυανθεκτικών στελεχών *Enterococcus* spp και ειδικά των VRE περιπλέκει σε μεγάλο βαθμό τις θεραπευτικές επιλογές μας.

Πριν από την έλευση των νέων αντιβιοτικών η θεραπεία των λοιμώξεων από VRE βασιζόταν σε μια σειρά σχημάτων αμφίβολης αποτελεσματικότητας όπως χορήγηση αμπικιλίνης σε υψηλές δόσεις (18-30 g ημερησίως) ή συγχορήγηση αμπικιλίνης, βανκομυκίνης και γενταμυκίνης (Murray B.E., 2000).

Σήμερα, έχουμε στην διάθεσή μας φάρμακα όπως η κινουπριστίνη-νταλφοπριστίνη, η λινεζολίδα και η δαπτομυκίνη. Η κινουπριστίνη-νταλφοπριστίνη είναι χρήσιμη μόνο σε λοιμώξεις από *E.faecium*, καθώς το είδος *E.faecalis* είναι εγγενώς ανθεκτικό. Λόγω της πιθανότητας ανάπτυξης αντοχής στην διάρκεια της θεραπείας, κάποιοι προτείνουν την προσθήκη δοξυκυκλίνης σε βαρείες λοιμώξεις όπως η βακτηριαιμία και η ενδοκαρδίτις, όμως δεν έχουμε ακόμα στην διάθεσή μας επαρκείς κλινικές δοκιμές (DeLisle S. & Perl T.M., 2003).

Η λινεζολίδα είναι δραστική in vitro τόσο έναντι του *E.faecium* όσο και έναντι του *E.faecalis*. Έχει αποδειχθεί χρήσιμη για την θεραπεία μιας μεγάλης ποικιλίας λοιμώξεων από VRE, συμπεριλαμβανομένων και κάποιων περιπτώσεων όπου απέτυχε

Παρά το γεγονός ότι εμφανίζει *in vitro* δραστικότητα έναντι των MRSA, δεν είναι εγκεκριμένη από την FDA για την θεραπεία λοιμώξεων από MRSA στελέχη (Drees M. & Boucher H., 2006).

Ενώ έχει βρεθεί αποτελεσματική σε διάφορα πειραματικά μοντέλα ενδοκαρδίτιδας, σε μια από τις πρώτες μελέτες επι ανθρώπων οι ασθενείς εμφάνιζαν χαμηλότερους δείκτες ίασης ή βελτίωσης σε σχέση με άλλες λοιμώξεις από MRSA (Drees M. & Boucher H., 2006; Drew R.H. et al., 2000).

Το φάρμακο εμφανίζει σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες οι οποίες περιορίζουν την χρήση του. Κυριότερες εξ αυτών είναι η έντονη αντίδραση στο σημείο έγχυσης και ένα σύνδρομο αρθραλγίας /μυαλγίας.

Λινεζολίδη(zynoxid©)

Κυκλοφόρησε το 2000 και είναι το πρώτο αντιβιοτικό της τάξεως των οξαζολιδινονών. Η FDA έχει εγκρίνει τις παρακάτω ενδείξεις χορήγησης της:

- νοσοκομειακή πνευμονία από MSSA, MRSA, πενικιλίνη-ευαίσθητο *S.pneumoniae*.
- πνευμονία της κοινότητας από MSSA μόνο και πενικιλίνη-ευαίσθητο *S.pneumoniae*.
- επιπεπλεγμένες και μη λοιμώξεις δέρματος και εξαρτημάτων του από MSSA, MRSA, *S.pyogenes* και *S.agalactiae*.
- λοιμώξεις από VREF, συμπεριλαμβανομένης της βακτηριαιμίας.

Σε αντίθεση με τους περισσότερους αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης, οι οποίοι δρουν σε επίπεδο επιμήκυνσης της πεπτιδικής αλυσίδας, η λινεζολίδη δρά σε επίπεδο έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Αναλυτικότερα, συνδέεται με το 23SrRNA της υπομονάδας 50S του ριβοσωματίου, παρεμποδίζοντας έτσι την σύνδεση με την υπομονάδα 30 S και τον σχηματισμό του συμπλέγματος έναρξης (initiation complex) (Akins R.L. & Haase K.K., 2005; Hancock R.E.W., 2005).

Έχει βακτηριοστατική δράση τόσο έναντι των σταφυλοκόκκων όσο και έναντι των εντεροκόκκων. Σε μια συγκεντρωτική (pooled) ανάλυση 5 προοπτικών μελετών ασθενών με βακτηριαιμία από *S.aureus*, η λινεζολίδη αποδεικνύεται εξίσου αποτελεσματική με την βανκομυκίνη, καθώς επιδεικνύει παρόμοια ποσοστά κλινικής ίασης (cure rates), εκρίζωσης της βακτηριαιμίας (microbiological success) και επιβίωσης (Short A.F. et al., 2005).



Δαπτομυκίνη(Cubicin®)

Είναι ο πρώτος εκπρόσωπος της τάξεως των λιποπεπτιδικών αντιβιοτικών τα οποία προέρχονται από την ζύμωση του *Streptomyces roseosporus*. Το 2003 έλαβε έγκριση από την FDA.

Οι ενδείξεις χορήγησής του είναι οι επιπελεγμένες λοιμώξεις δέρματος και εξαρτημάτων του από MSSA, MRSA, *S.pyogenes*, *S.agalactiae* και *E.faecalis* (μόνο τα βανκομυκίνη-ευαίσθητα στελέχη). Δεν συνιστάται για την θεραπεία πνευμονίας καθώς αδρανοποιείται από τον επιφανειοδραστικό παράγοντα. Στις ενδείξεις του φαρμάκου προσετέθη προσφάτως (2006) και η θεραπεία της βακτηριαιμίας καθώς και της δεξιάς ενδοκαρδίτιδας από *S.aureus*. Η έγκριση αυτή από την FDA βασίστηκε σε μεγάλο βαθμό στα αποτελέσματα μιας πολυκεντρικής μελέτης ασθενών με βακτηριαιμία από *S.aureus*, με ή χωρίς ενδοκαρδίτιδα (Drees M. & Boucher H., 2006). Σύμφωνα με την μελέτη αυτή η δαπτομυκίνη πληροί τα κριτήρια της «μη κατωτερότητας» (endpoints of noninferiority) καθώς απεδείχθη εξίσου αποτελεσματική με την standard θεραπεία, τόσο έναντι των MSSA όσο και έναντι των MRSA (Fowler V.G. et al., 2006).

Ο μηχανισμός δράσης της δαπτομυκίνης περιλαμβάνει την Ca^{++} -εξαρτώμενη εισχώρηση του μορίου του φαρμάκου εντός της βακτηριακής κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Η σύνδεση των ιόντων Ca^{++} με 2 υπολείματα ασπαρτικού οξέος επι του μορίου της δαπτομυκίνης ελαττώνει το συνολικό αρνητικό φορτίο του μορίου και αυξάνει το μέγεθος της υδρόφοβης επιφάνειάς του, επιτρέποντας του έτσι να αλληλεπιδρά καλύτερα με τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες. Επιπλέον, τα ιόντα Ca^{++} , συνδεδεμένα με τα αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα του μορίου της δαπτομυκίνης και με τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια της μεμβράνης, προάγουν την βαθύτερη εισχώρηση του φαρμάκου εντός αυτής (Hancock R.E.W., 2005).

Λόγω της στενής συσχέτισης της δραστηριότητας της δαπτομυκίνης με την συγκέντρωση των ιόντων Ca^{++} , οι μέθοδοι προσδιορισμού της ευαισθησίας στην δαπτομυκίνη σε άγαρ εμφανίζουν προβλήματα (Rice L.B. & Bonomo R.A., 2005).

Δεν γνωρίζουμε επακριβώς την αλληλουχία των γεγονότων που ακολουθούν μετά την εισχώρηση του φαρμάκου εντός της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης και οδηγούν στον θάνατο του βακτηρίου (Hancock R.E.W., 2005).



Κάποιοι ερευνητές πάντως αποδίδουν την βακτηριοκτόνο δράση του φαρμάκου στην κατάργηση της διαφοράς δυναμικού εκατέρωθεν της μεμβράνης (depolarization) λόγω μαζικής εκροής ιόντων K^+ (Silverman J.A. et al., 2003).

Τιγκεκυκλίνη (Tygacil®)

Είναι ημισυνθετικό παράγωγο των τετρακυκλινών και αποτελεί τον πρώτο εκπρόσωπο μιας νέας τάξης αντιβιοτικών που ονομάζονται γλυκυλκυκλίνες (glycylcyclines). Εγκρίθηκε από την FDA το 2005.

Οι εγκεκριμένες ενδείξεις χορήγησής της είναι :

- Επιπεπλεγμένες λοιμώξεις δέρματος και εξαρτημάτων του από MSSA, MRSA, *E.faecalis* (μόνο τα βανκομυκίνη-ευαίσθητα στελέχη), *S.pyogenes*, *S.agalactiae*, *S.anginosus* group, *E.coli*. και *B.fragilis*.
- Επιπεπλεγμένες λοιμώξεις κοιλίας από *E.faecalis* (μόνο τα βανκομυκίνη-ευαίσθητα στελέχη), *S.aureus* (μόνο τα MSSA στελέχη), *S.anginosus* group, *E.coli*, *C.freundii*, *E.cloacae*, *K.oxytoca*, *K.pneumoniae* και *B.fragilis* group.

Δεν είναι δραστική έναντι του *Proteus* spp και της *Pseudomonas* spp.

Η τιγκεκυκλίνη αναστέλλει την πρωτεϊνική μετάφραση καθώς συνδέεται με την υπομονάδα 30S του βακτηριακού ριβοσώματος, μη επιτρέποντας έτσι την είσοδο των μορίων αμινο-ακυλ-t-RNA στην θέση A του ριβοσώματος. Με τον τρόπο αυτό αναστέλλεται η ενσωμάτωση αμινοξέων στην επιμηκυνόμενη πεπτιδική αλυσίδα (Hancock R.E.W., 2005).

Στην βιβλιογραφία υπάρχει πληθώρα αναφορών που κάνουν λόγο για εμφάνιση αντοχής σε όλα τα λεγόμενα αντιβιοτικά εφεδρείας (ή δεύτερης γραμμής). Η πρώτη αναφορά στελέχους *E.faecium* ανθεκτικού στην λινεζολίδη έγινε το 1999 ενώ η πρώτη αναφορά ανθεκτικού στελέχους *S.aureus* έγινε το 2001. Η αντοχή είναι αποτέλεσμα μιας μετάλλαξης στο DNA το οποίο κωδικοποιεί για την κεντρική αγκύλη του πεδίου V του 23SrRNA (Gonzales R.D. et al., 2001; Tsiodras S. et al., 2001)

Ο πλέον συνήθης μηχανισμός αντοχής του *S.aureus* στις στρεπτογραμίνες B προκύπτει από την μεθυλίωση του 23S rRNA. Ο μηχανισμός αυτός μεσολαβείται από μια μεθυλάση κωδικοποιούμενη από ένα γονίδιο της τάξεως *erm* και προσδίδει αντοχή σε μακρολίδες, λινκοσαμίδες και στρεπτογραμίνες B (MLS_B φαινότυπος). Ένας 2^{ος} μηχανισμός αντοχής στις στρεπτογραμίνες B είναι η υδρόλυση του φαρμάκου από μια



λακτονάση κωδικοποιούμενη από τα γονίδια *vgbA* και *vgbB*.

Δύο είναι και οι μηχανισμοί αντοχής του *S.aureus* στις στρεπτογραμίνες A : η αδρανοποίηση του φαρμάκου με ακετυλίωση και η ενεργητική απέκκρισή του.

Έχουν περιγραφεί 3 γονίδια ακετυλοτρασφερασών (*vatA*, *vatB*, *vatC*) και 2 γονίδια αντλιών ενεργητικής απέκκρισης (ABC porters)(*vgaA*,*vgaB*) (Werner G. et al., 2001). Τα γονίδια αυτά συχνά ανευρίσκονται στο ίδιο πλασμίδιο και συνήθως συνυπάρχουν με κάποιο γονίδιο τάξεως *erm*.

Η αντοχή του *E.faecium* στην κινουπριστίνη-δαλφοπριστίνη μεσολαβείται από τους ίδιους ακριβώς μηχανισμούς αντοχής, με μόνη διαφορά ότι έχουν περιγραφεί 2 ακετυλοτρασφεράσες, οι *vat(D)(satA)* και *vat(E)(satG)* (Soltani M. et al., 2000).

Η πρώτη αναφορά *in vivo* ανάπτυξης αντοχής του *S.aureus* στην δαπτομυκίνη έγινε το 2005 (Hayden M.K. et al., 2005; Mangili A. et al., 2005). Οι μηχανισμοί αντοχής δεν έχουν διευκρινιστεί απολύτως (Montero C.I. et al., 2008). Κάποιες αναφορές συνδέουν την αύξηση της MIC της βανκομυκίνης με αύξηση της MIC της δαπτομυκίνης, κάνοντας μάλιστα λόγο για διασταυρούμενη αντοχή. Οι ίδιοι ερευνητές προτείνουν ότι η επαγόμενη (induced) από την βανκομυκίνη πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος διαταράσσει την εισχώρηση της δαπτομυκίνης εντός της βακτηριακής μεμβράνης (Cui L. et al., 2006; Patel J.B. et al., 2006).

Πρόσφατα εντοπίστηκαν κάποιες γενετικές τροποποιήσεις που σχετίζονται με την ανάπτυξη αντοχής του *S.aureus* στην δαπτομυκίνη. Οι τροποποιήσεις αυτές εδράζονται σε 4 ανοικτά αναγνωστικά πλαίσια τα οποία αντιπροσωπεύουν 3 ξεχωριστές πρωτεΐνες: την MprF(συνθετάση της λυσυλφωσφατιδυλγλυκερόλης), την YycG (μια κινάση της ιστιδίνης) και τις RpoB και RpoC, τις β και β' υπομονάδες της RNA πολυμεράσης. Πρόκειται για μονοσημειακές μεταλλάξεις στην περίπτωση των MprF, RpoB, RpoC και για εισχωρήσεις νουκλεοτιδίου στην περίπτωση της YycG (Friedman L. et al., 2006). Δεδομένου όμως ότι οι μεταλλάξεις αυτές δεν ανευρίσκονται σε όλα τα δαπτομυκίνη-ανθεκτικά στελέχη, δεν είμαστε ακόμα σε θέση να γνωρίζουμε τον ακριβή μηχανισμό με τον οποίο οι μεταλλάξεις αυτές, καθώς και κάποιες άγνωστες ακόμη, οδηγούν στην ανάπτυξη αντοχής (Montero C.I. et al., 2008; Boucher H.W. & Sakoulas G., 2007).

Η πρώτη αναφορά ανάπτυξης αντοχής σε VRE στέλεχος στην διάρκεια της θεραπείας με δαπτομυκίνη έγινε επίσης το 2005 (Lewis J.S. et al., 2005).



Δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές πάνω στους μηχανισμούς αντοχής του γένους *Enterococcus* spp στην δαπτομυκίνη. Σύμφωνα πάντως με μια πρόσφατη εργασία, ο μηχανισμός αντοχής των στελεχών *E.faecium* που μελετήθηκαν δεν σχετίζεται με μεταλλάξεις, όπως στην περίπτωση του *S.aureus*, ούτε με ενζυμική αδρανοποίηση του φαρμάκου (Montero C.I. et al., 2008).

In vitro επιλογή μεταλλακτών *S.aureus* με ελαττωμένη ευαισθησία στην τιγκεκυκλίνη επιτυγχάνεται με διαδοχικές ανακαλλιέργειες των στελεχών σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού. Το μεταγραφικό profiling των μεταλλακτών αυτών αποκάλυψε μια υπερέκφραση (X100) του γονιδίου *merA*. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για μια αντλία απέκκρισης (efflux pump) της οικογένειας MATE. Το sequencing του locus στο οποίο ανήκει το *merA* εντόπισε την ύπαρξη μεταλλάξεων οι οποίες αδρανοποιούσαν τον καταστολέα του *merA* (*merR*). Πάντως, μόνη η υπερέκφραση του *merA* δεν αρκεί για να προσδώσει υψηλού βαθμού αντοχή στην τιγκεκυκλίνη (McAleese F. et al., 2005).

Υπάρχουν επι του παρόντος ελάχιστες βιβλιογραφικές αναφορές για ανάπτυξη αντοχής στην τιγκεκυκλίνη. Σε μια εξ αυτών περιγράφεται ένα ανθεκτικό στέλεχος *E.faecalis* το οποίο απομονώθηκε σε έναν ασθενή ΜΕΘ στην Γερμανία (Werner G. et al., 2008).

Όλοι συμφωνούν ότι η εμφάνιση υψηλών ποσοστών αντοχής στα αντιβιοτικά εφεδρείας είναι απλά θέμα χρόνου (Lohner K. & Staudegger E., 2001). Επομένως, είναι απαραίτητο να ληφθούν κάποια επείγοντα μέτρα για τον περιορισμό της αντοχής.

Η στρατηγική μας πρέπει να έχει πολλούς άξονες :

- α. ελαχιστοποίηση του περιβαλλοντικού αντίκτυπου (impact) των αντιβιοτικών
- β. ανάπτυξη νέων τάξεων αντιβιοτικών
- γ. ανάπτυξη αποτελεσματικών μέσων ενεργητικής και παθητικής ανοσοποίησης
- δ. εντατική μελέτη των δυνατοτήτων που μας παρέχουν οι βακτηριοφάγοι
- ε. εξέλιξη του γενετικού εμβολιασμού

α. ελαχιστοποίηση του περιβαλλοντικού αντίκτυπου των αντιβιοτικών

Σύμφωνα με εκτιμήσεις του CDC, πάνω από το 40% της συνολικής παραγωγής αντιβιοτικών στις ΗΠΑ χρησιμοποιείται στην ζωϊκή παραγωγή. Εξ αυτών, το 80% χορηγείται σε υποθεραπευτικές δόσεις ως προαγωγείς ανάπτυξης. Πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι πολυανθεκτικά βακτηριακά στελέχη έχουν απομονωθεί και σε φυτά. Εξαιρετική σημασία έχει το γεγονός ότι από τις 19 τάξεις αντιβιοτικών που είναι εγκεκριμένες για χρήση ως προαγωγείς ανάπτυξης οι 6 χρησιμοποιούνται και στην Ιατρική (Levy S.B., 1998). Κάποια μικρά βήματα προόδου προς την κατεύθυνση του περιορισμού των προαγωγέων ανάπτυξης έχουν ήδη γίνει. Όμως, ενώ η WHO, η EU και το CDC προτείνουν την άμεση διακοπή της χρήσης των προαγωγέων εκείνων που χρησιμοποιούνται στην Ιατρική, το Υπουργείο Γεωργίας και το Animal Health Institute των ΗΠΑ προτείνουν περαιτέρω έρευνες πριν προχωρήσουν σε διακοπή (Lohner K. & Staudegger E., 2001)

Μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική στρατηγική για τον περιορισμό της βακτηριακής αντοχής είναι η κυκλική χρήση των αντιβιοτικών και μάλιστα, όπως προτείνουν κάποιοι, υπό τις οδηγίες της WHO ή των UN. Υπολογίζεται ότι όταν ένα αντιβιοτικό απομακρύνεται από το μικροβιακό περιβάλλον, αίρεται η πίεση επιλογής για την διατήρηση της αντοχής στο εν λόγω αντιβιοτικό. Αυτό θα μας επιτρέψει να επαναφέρουμε το αντιβιοτικό σε χρήση ύστερα από κάποιο χρονικό διάστημα.

Κάποιες μελέτες που έγιναν σε Ουγγαρία και Φινλανδία στήριξαν την παραπάνω υπόθεση. Κάποιες άλλες όμως δείχνουν ότι τα βακτήρια τα οποία κτετέστησαν ανθεκτικά σε κάποιο αντιβιοτικό λόγω υπέρμετρης χρήσης του δεν θα εμφανίσουν ανάστροφη εξέλιξη αν απομακρυνθεί το αντιβιοτικό. Κάποια μάλιστα εμφανίζουν επιπρόσθετες μεταλλάξεις μετά την απομάκρυνση του αντιβιοτικού, αντισταθμίζοντας έτσι την «απώλεια ικανότητας» (fitness loss) λόγω της απουσίας του αντιβιοτικού (Morell V., 1997).

Ο περιορισμός της αντοχής απαιτεί μια παγκόσμια επιτήρηση. Πρώτη προϋπόθεση είναι η εγκατάσταση εθνικών και παγκόσμιων δικτύων επιτήρησης. Η καταγραφή της χρήσης των αντιβιοτικών πρέπει να είναι συστηματική ενώ ένας από τους κύριους στόχους των δικτύων αυτών πρέπει να είναι η ανίχνευση των ανθεκτικών στελεχών.



Για κάποιους, η εφαρμογή της μοριακής εκδοχής των αξιωμάτων του Koch αποτελεί μια πολύ σημαντική μελλοντική πρόκληση καθώς η διαθέσιμη τεχνολογία δεν μπορεί ακόμα να εφαρμοστεί σε ευρεία κλίμακα (Lohner K. & Staudegger E., 2001).

Σήμερα παρατηρείται μια σημαντική ποικιλομορφία στις εργαστηριακές μεθολογίες που χρησιμοποιούνται για τα tests ευαισθησίας. Ακόμα και αν υπάρξει μελλοντικά μια σύγκλιση των μεθοδολογιών αυτών, εξακολουθούμε να έχουμε σημαντικές διαφορές στην ερμηνεία, στην ανάλυση και στην σύγκριση των στατιστικών δεδομένων της αντοχής μεταξύ διαφορετικών κρατών (Rosamund J.W. & Heymann D.L., 1998).

Για τον λόγο αυτό, ένας άλλος σημαντικός στόχος για ένα αποτελεσματικό δίκτυο επιτήρησης πρέπει να είναι η ανάπτυξη εναρμονισμένων, απλών και γρήγορων διαγνωστικών δοκιμασιών.

Η απάντηση του ιατρικού κόσμου στο πρόβλημα της αντοχής κατευθύνθηκε προς μία πιο ορθολογική συνταγογράφηση των αντιβιοτικών. Αναπτύχθηκαν κατευθυντήριες γραμμές σε εθνικό επίπεδο, ισχυροποιήθηκαν τα διαγνωστικά κριτήρια, όπως επίσης υπάρχει και μια κίνηση προς την κατεύθυνση του περιορισμού της διάρκειας της θεραπείας.

Κλείνοντας την παράγραφο αυτή, κάνουμε μια απλή αναφορά στην σημαντική συμβολή της αυστηρής εφαρμογής των κανόνων υγιεινής, τόσο στον χώρο του νοσοκομείου όσο και της οικιακής.

β. Έρευνα και ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών

Σήμερα, η ιατρική κοινότητα διαπιστώνει έκπληκτη ότι το οπλοστάσιο των αντιβιοτικών είναι σχεδόν άδειο. Η IDSA (Infectious Diseases Society) έχει επισημάνει έγκαιρα το πρόβλημα, αναφέροντας ότι από τα 506 μόρια που βρίσκονταν υπό ανάπτυξη το 2002 μόνο τα 6 ήταν αντιβιοτικά (Bradley J.S. et al., 2007). Συνέστησε μάλιστα και μια ομάδα εργασίας προκειμένου να διερευνήσει αυτά τα ανησυχητικά δεδομένα. Εντοπίστηκαν αρκετά εμπόδια στην ανάπτυξη των αντιβιοτικών.

Οι περιορισμοί στην συνταγογράφηση των αντιβιοτικών, σε συνδυασμό με το συσσωρευόμενο πρόβλημα της αντοχής, δημιούργησαν ένα ιδιαίτερα αρνητικό περιβάλλον για τις φαρμακοβιομηχανίες, οι οποίες επέδειξαν ταχύτατα αντανakλαστικά (Wise R., 2006). Πολλές εξ αυτών έστρεψαν την έρευνά τους προς άλλες κατευθύνσεις, όπως για παράδειγμα στην ανάπτυξη φαρμάκων για χρόνιες παθήσεις.



Άλλες πάλι δίσταζαν να αναπτύξουν εντελώς νέες τάξεις αντιβιοτικών και προτιμούσαν να κάνουν τροποποιήσεις σε ήδη υπάρχουσες τάξεις, εγκεκριμένες από την FDA. Με το κόστος ανάπτυξης ενός φαρμάκου να ανέρχεται σε 1 δις \$ κατά μέσο όρο, και με μόλις 1 στις 5 πιθανότητα να γίνει δεκτή η αίτηση έγκρισης από την FDA, το περιβάλλον ανάπτυξης ενός νέου αντιβιοτικού κάθε άλλο παρά ελκυστικό είναι.

Το 2004, η IDSA υπέβαλε προτάσεις προς το NIH, την FDA και το CDC προκειμένου να δημιουργηθεί ένα νέο, περισσότερο ελκυστικό για τις φαρμακευτικές εταιρείες χρηματοδοτικό, ερευνητικό και νομοθετικό περιβάλλον. Χαρακτηριστικά μπορούμε να αναφέρουμε εδώ τις προτάσεις της IDSA για ριζική αναθεώρηση του τρόπου διεξαγωγής των κλινικών δοκιμών. Δύο χρόνια μετά, λίγα πράγματα είχαν αλλάξει.

Σε μια προσφάτως αναθεωρημένη μελέτη της, η IDSA δημοσιεύει τα 6 πολυανθεκτικά βακτήρια τα οποία συνιστούν μείζονα απειλή για την δημόσια υγεία και για τα οποία δεν υπάρχουν ή υπάρχουν ελάχιστα φάρμακα στο τελευταίο στάδιο ανάπτυξης.

Με δεδομένα ότι μπορεί να χρειαστούν μέχρι και 10 χρόνια προκειμένου να κυκλοφορήσει ένα νέο αντιβιοτικό και ότι η χρησιμότητά του μένει να επιβεβαιωθεί, χρειαζόμαστε άμεσα λύσεις (Bradley J.S. et al., 2007). Ίσως οι λύσεις να προέλθουν από την ανάπτυξη αποτελεσματικών μέσων ανοσοποίησης.

γ. ανάπτυξη μέσω ανοσοποίησης

Η επίτευξη προστατευτικής ανοσίας έναντι του *S.aureus* απέτέλεσε έναν πολύ σημαντικό στόχο ήδη από την εποχή της ανακάλυψης του βακτηρίου αυτού (Stranger-Jones Y.K. et al., 2006).

Τα εμβόλια που παρασκευάστηκαν από ζώντα ή εξασθενημένα βακτήρια απέτυχαν να προκαλέσουν προστατευτική ανοσιακή απάντηση. Έτσι, για πολλά χρόνια επικράτησε το «αξίωμα» ότι δεν υπάρχει ανοσία έναντι του *S.aureus* (Robbins J.B. et al., 2004).

Σήμερα, η γενετική μηχανική μας παρέχει την δυνατότητα να επιλέξουμε έναν μεγάλο αριθμό επιτόπων ως πιθανών στόχων για ενεργητική ή παθητική ανοσοποίηση. Η βιβλιογραφία είναι πολύ πλούσια.



Μεταξύ των πολλών εμβολίων που έχουν ήδη αναπτυχθεί είναι και τα ακόλουθα:

- πολυσακχαρίτες ελύτρου τύπων 5 και 8 συζευγμένοι με ανασυνδυασμένη εξωπρωτεΐνη A, μια μη τοξική παραλλαγή της εξωτοξίνης A της *P. aeruginosa* (StaphVAX, Nabi, Rockville, Md.) (Shinefield H. et al., 2002)
- πολυσακχαρίτης επιφανείας πολυ-N-ακετυλ-β-(1-6)-γλυκοζαμίνη (Maira-Litràn T. et al., 2005)
- παράγων συσσωρεύσεως A (clumping factor A / clfA) (Josefson E. et al., 2001)
- παράγων συσσωρεύσεως B (clfB) (Schaffer A.C. et al., 2006)
- πρωτεΐνη IsdB (Iron-regulated surface determinant B) (Kuklin N.A. et al., 2006)
- πρωτεΐνη A συνδέουσα την φμπρονεκτίνη (FnBPA) (Arrecubieta C. et al., 2008)
- συνδυασμός των πρωτεϊνών Cna και FnBP (Xiong Z.H. et al., 2006)

Βλέπει κανείς ότι τα περισσότερα εμβόλια έχουν ως βάση κάποια προσκολλητική επιφανείας (MSCRAMM). Όλα τα παραπάνω εμβόλια παρέχουν σε πειραματόζωα μερική προστασία έναντι του *S.aureus*. Όμως, προκειμένου ένα εμβόλιο να χαρακτηριστεί ως επιτυχές, πρέπει οι γενετικοί καθοριστές για συγκεκριμένα αντιγόνα να είναι απαραίτητοι για την έκφραση λοιμογονικότητας, πράγμα το οποίο δεν παρατηρήθηκε σε μεταλλάκτες (mutants) στερούμενους αντιγονικών καθοριστών για τους πολυσακχαρίτες του ελύτρου ή για μεμονωμένες MSCRAMMs (Rivas J.M. et al., 2004).

Οι Mazmanian et al βρήκαν ότι οι μεταλλάκτες σορτάσης A (srtA) αδυνατούν να συνδέσουν τις MSCRAMMs στο τοίχωμα της πεπτιδογλυκάνης, ενώ εμφανίζουν και μειωμένη λοιμογονικότητα, καταδεικνύοντας έτσι ότι και οι 23 πρωτεΐνες επιφανείας είναι απαραίτητες για την πλήρη έκφραση της λοιμογονικότητας (Stranger-Jones Y.K. et al., 2006; Mazmanian S.K. et al., 2000). Έτσι, οι έρευνες στρέφονται πλέον προς την κατεύθυνση της παρασκευής συνδυασμένων (combined) εμβολίων όπως για παράδειγμα το εμβόλιο που περιέχει IsdA, IsdB, SdrD και SdrE (Stranger-Jones Y.K. et al., 2006). Τα αποτελέσματα αναμένονται ενθαρρυντικά, καθώς οι ερευνητές έχουν στην διάθεσή τους τεχνολογίες in vitro επιλογής πρωτεϊνών οι οποίες παρακάμπτουν τις χρονοβόρες τεχνικές κλωνοποίησης γονιδίων (Weichhart T. et al., 2003). Λόγω της περιορισμένης χρησιμότητας των εμβολίων στους ανοσοκατεσταλμένους, η παθητική ανοσοποίηση αποτελεί μια πολύ χρήσιμη εναλλακτική λύση.

Σήμερα έχουμε στη διάθεσή μας τόσο σκευάσματα υπεράνοσων γ-σφαιρινών όσο και μονοκλωνικών αντισωμάτων :

- SA-IGIV (*S.aureus* IGIV)

Πρόκειται για σκεύασμα πολυκλωνικών ανοσοσφαιρινών προερχόμενο από δότες πλάσματος με αυξημένους τίτλους αντι-CIfA αντισωμάτων (X4-X5 σε σχέση με την κοινή IGIV).

Ο συνδυασμός SA-IGIV και βανκομυκίνης στην πρώιμη ενδοκαρδίτιδα (12h μετά την λοίμωξη) εξασφάλισε την αποστείρωση του 100% των βαλβιδικών εκβλαστήσεων, έναντι 43% στην ομάδα ελέγχου (Rivas J.M. et al., 2004).

- Veronate[®] (INH-A21/ Inhibitex Inc)

Περιέχει συγκεκριμένο τίτλο IgG έναντι της CIfA.

Αναπτύχθηκε για την πρόληψη των λοιμώξεων από *S.aureus* στα VLBW νεογνά (Chandy C.J. & Schreiber J.R., 2006; Rivas J.M. et al., 2004). Το 2006 απέτυχε να εκπληρώσει τους στόχους μιας κλινικής δοκιμής φάσεως III (πολυκεντρική, διπλή τυφλή μελέτη επί 2017 νεογνών σε 95 MENN των ΗΠΑ).

- Aurexis[®] (mAb 12-9/ Inhibitex Inc)

Σκεύασμα μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της CIfA.

Το 2005 συμπλήρωσε τις κλινικές δοκιμές φάσεως II (διπλή τυφλή μελέτη επί 60 ασθενών με επιβεβαιωμένη βακτηριαμία από *S.aureus*) (Rivas J.M. et al., 2004).

Όσον αφορά την εξέλιξη της ανοσοποίησης έναντι των εντεροκόκκων, το τοπίο είναι αρκετά θολό, καθώς δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς ούτε οι πολυσακχαρίτες του ελύτρου ούτε οι πρωτεΐνες επιφανείας. Ο μόνος πολυσακχαρίτης με γνωστή δομή είναι, μέχρι στιγμής, το τειχοϊκό οξύ. Η ουσία αυτή είναι υπό μελέτη (Koch S. et al., 2004).

Πρόσφατα (2006) καθορίστηκε η δομή άλλων 2 τάξεων πολυσακχαριτών, της πολυγλυκάνης (δεξτράνης) και της ετερογλυκάνης, ενώσεως ειδικής για κάθε στέλεχος, αποτελούμενης από ραμνόζη, γλυκόζη, γαλακτόζη, μαννοζαμίνη και γλυκοζαμίνη (Hsu C.T. et al., 2006). Μεταξύ των πρωτεϊνών επιφανείας που θα μπορούσαν να είναι στόχοι ενός εμβολίου ή μιας υπεράνοσης γ-σφαιρίνης είναι το σύμπλεγμα μεταφοράς ABC (ATP-binding cassette), η FimA, όπως επίσης και κάποιες PBPs (Koch S. et al., 2004).



δ. αξιοποίηση των δυνατοτήτων που μας παρέχουν οι βακτηριοφάγοι

Οι βακτηριοφάγοι έχουν περιγραφεί ήδη από τις αρχές του 19^{ου} αιώνα και έχουν μια μακρά ιστορία ως θεραπευτικοί παράγοντες στην ανατολική Ευρώπη και στην πρώην Σοβιετική Ένωση. Ένας συνδυασμός παραγόντων συνετέλεσε ώστε να εγκαταλειφθούν οι θεραπείες με φάγους στην δυτική Ευρώπη. Μεταξύ των παραγόντων αυτών διακρίνει κανείς την έλλειψη βιβλιογραφίας στα αγγλικά, την αποτυχία πολλών μελετών να ικανοποιήσουν τα αυστηρά standards των κλινικών δοκιμών, τεχνικές δυσκολίες, κυρίως όμως την εμφάνιση των αντιβιοτικών στη δεκαετία του 1940 (Koch S. et al., 2004; Bradbury J., 2004). Η απεγνωσμένη ανάγκη μας για εναλλακτικές θεραπείες αντί των αντιβιοτικών επανέφερε στο προσκήνιο τις θεραπείες με φάγους.

Οι θεραπείες με φάγους έχουν, θεωρητικά, κάποια πλεονεκτήματα: εμφανίζουν απόλυτη ειδικότητα έναντι ενός συγκεκριμένου στόχου, με αποτέλεσμα να μην διαταράσσεται η φυσιολογική χλωρίδα, μπορούν να πολλαπλασιαστούν στην εστία της λοίμωξης, και επιδεικνύουν κινητική συμπεριφορά παράλληλη με αυτήν του στόχου τους, απαιτώντας κατ' αυτόν τον τρόπο λιγότερο συχνή χορήγηση και εξαλείφοντας τον κίνδυνο της ανεπαρκούς διείδυσης στους ιστούς (Koch S. et al., 2004).

Δεν πρέπει βεβαίως να υποτιμηθούν και κάποια πιθανά μειονεκτήματα όπως την ανάγκη να ταυτοποιήσουμε τον αιτιολογικό παράγοντα της λοίμωξης πριν από την έναρξη της θεραπείας, την εμφάνιση αναφυλακτικών αντιδράσεων λόγω της πρόσμιξης του παρασκευάσματος με βακτηριακές τοξίνες, την ταχεία απομάκρυνσή τους από το Δ.Ε.Σ και το πολύ στενό φάσμα τους (Koch S. et al., 2004; Merril C.R. et al., 1996).

Από τεχνική σκοπιά είμαστε σε θέση να παρασκευάσουμε φάγους με λυτική δράση έναντι ενός συγκεκριμένου βακτηριακού στελέχους.

Η έρευνα έχει ξεκινήσει εντατικά και τα πρώτα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά. Υπάρχει ήδη μια κάποια περιορισμένη βιβλιογραφία για την θεραπεία λοιμώξεων από *S.aureus* καθώς και εντεροκοκκικών. Πολύ ενδιαφέρουσα ήταν η αναφορά ερευνητών του Ινστιτούτου Eliava στο Tbilisi της Γεωργίας οι οποίοι κάνουν λόγο για επιτυχή θεραπεία λοιμώξεως από VRE σε πειραματόζωα (Wills Q.F. et al., 2005; Bradbury J., 2004).

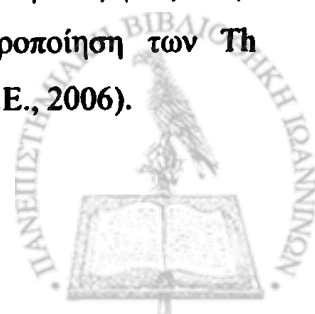
ε. Εξέλιξη του γενετικού εμβολιασμού και της γονιδιακής θεραπείας

Η ιδέα της μεταφοράς όχι πλέον του αντιγόνου αλλά της ίδιας της γενετικής πληροφορίας στα δραστικά κύτταρα του λεμφικού συστήματος, συνεπήρε τους ερευνητές όλου του κόσμου, καθώς θα προσέδιδε τεράστιες δυνατότητες όχι μόνο για την εξέλιξη της προφυλακτικής ανοσοποίησης αλλά και για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου, των αυτοάνοσων νοσημάτων και των αλλεργιών (Weiss S. & Chakraborty T., 2001).

Η ιστορία αυτής της νέα τεχνολογίας αρχίζει με τα πρωτοποριακά πειράματα των J. Wolff και P. Felgner. Οι ερευνητές αυτοί διαπίστωσαν ότι αρνητικά φορτισμένο DNA συνδεδεμένο με κατιοντικά λιπίδια μπορεί να προσκολληθεί στην αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια ζώντων κυττάρων και στη συνέχεια να εισέλθει εντός αυτών. Προς μεγάλη τους έκπληξη διαπίστωσαν επίσης ότι στην ομάδα ελέγχου, όπου ενέθηκε «γυμνό» DNA, παρατηρήθηκε ακόμα μεγαλύτερη πρόσληψη και ακόμα μεγαλύτερη έκφραση της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης (Delves P.J. et al., 2006).

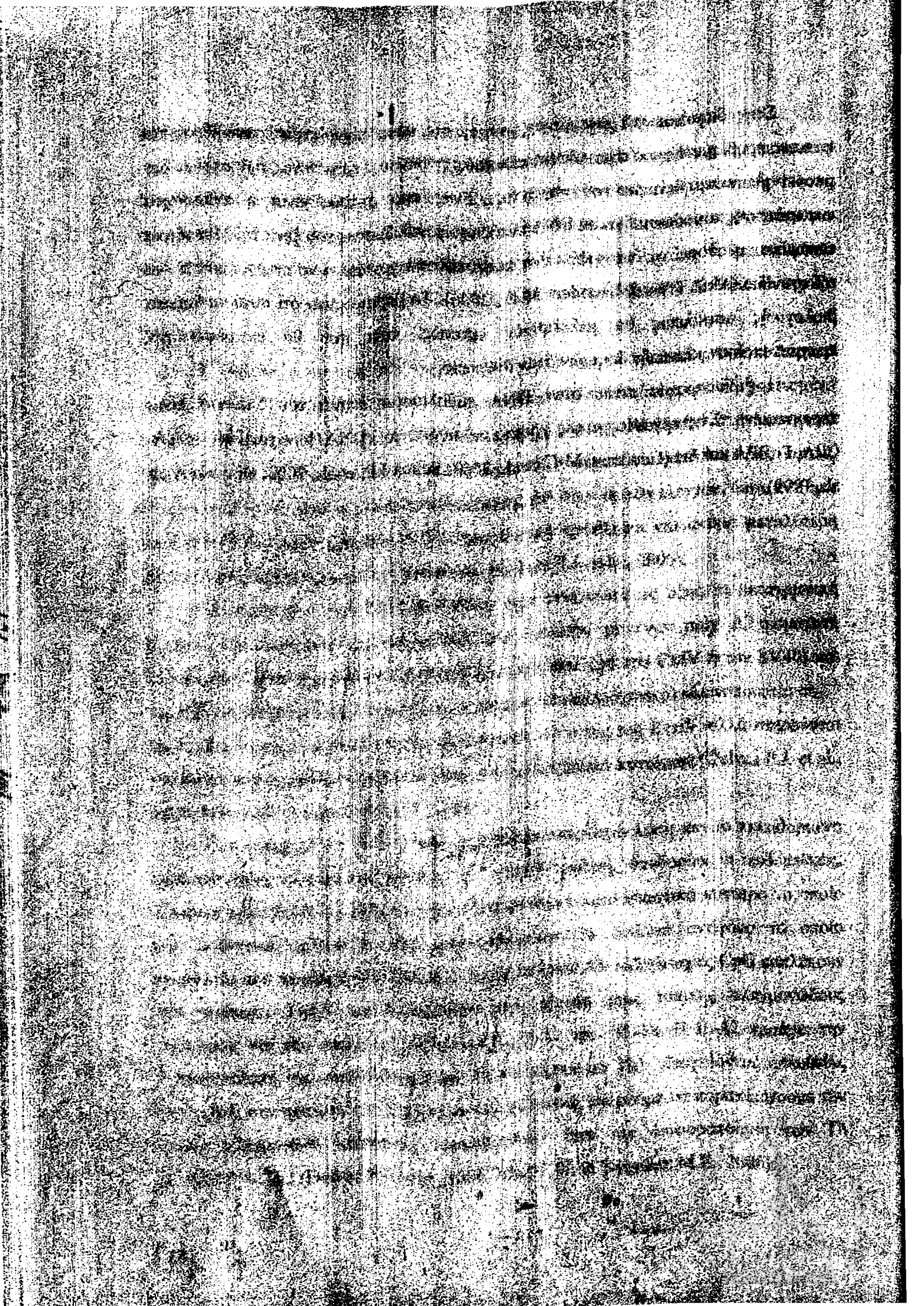
Η παρασκευή των DNA εμβολίων έχει συνοπτικά ως εξής: η μεταγραφική μονάδα, αποτελούμενη από το cDNA του γονιδίου με έναν poly A τερματητή (terminator), έναν προαγωγέα (συνήθως προερχόμενο από τον CMV ή τον SV40) και μια CpG ρυθμιστική αλληλουχία (δρά ως ισχυρό ανοσοενισχυτικό) κλωνοποιείται σε πλασμίδια τα οποία μπορούν να αναδιπλασιαστούν εντός της *E.coli* αλλά στερούνται της δυνατότητας αναδιπλασιασμού εντός των ανθρωπίνων κυττάρων (Delves P.J. et al., 2006; Mak T.W. & Saunders M.E., 2006).

Στη συνέχεια, το βακτηριακό εναιώρημα υφίσταται λύση και το κεκαθαρισμένο παρασκεύασμα πλασμιδίων ενίεται, με ειδική τεχνική, υποδορίως ή ενδομυϊκώς. Κομβικό ρόλο διαδραματίζει το δενδριτικό αντιγονοπαραρυσιαστικό κύτταρο το οποίο είτε μολύνεται απ'ευθείας είτε φαγοκυτταρώνει το διαλυτό αντιγόνο το οποίο εκκρίνεται από τα μυϊκά κύτταρα στον διάμεσο χώρο. Οι αλληλουχίες CpG εμπλέκουν τον υποδοχέα TLR9, με αποτέλεσμα την γένεση μιας τοπικής φλεγμονώδους απάντησης και την παραγωγή IFN α και β , IL-12 και IL-18. Η IL-12 προάγει την διαφοροποίηση των ενεργοποιημένων Th κυττάρων σε Th1. Στοχεύοντας απευθείας στα μυϊκά, στα ηπατικά ή στα κύτταρα του δέρματος μπορούμε να παρακάμψουμε την τοπική φλεγμονώδη απάντηση, «εκτρέποντας» έτσι την διαφοροποίηση των Th κυττάρων σε Th2 (Delves P.J. et al., 2006; Mak T.W. & Saunders M.E., 2006).



Στην διάρκεια της εφαρμογής αυτής της νέας τεχνολογίας γεννήθηκε και κάποιος προβληματισμός σχετικός με πιθανούς κινδύνους, το μέγεθος των οποίων δεν μπορεί να εκτιμηθεί επί του παρόντος. Ένας από αυτούς είναι η πιθανότητα ενσωμάτωσης του πλασμιδιακού DNA εντός του γονιδιώματος του ξενιστή. Μια τέτοια ενσωμάτωση μπορεί να διαταράξει ένα κατασταλτικό γονίδιο ή να ενεργοποιήσει ένα ογκογονίδιο (Mak T.W. & Saunders M.E., 2006). Το βέβαιο είναι ότι αυτά τα θέματα βιολογικής ασφάλειας θα μελετηθούν εκτενώς, κάτι που θα επιτρέψει την πραγματοποίηση κλινικών δοκιμών στον άνθρωπο.

Η βιβλιογραφία πάνω στον DNA εμβολιασμό έναντι του *S.aureus* είναι περιορισμένη. Στις εργασίες αυτές χρησιμοποιήθηκε το cDNA των γονιδίων *mecA*, *CifA*, *FnBPA* και *Srt* (Gaudreau M-C et al., 2007; Senna J.P. et al., 2003; Ohwada A. et al., 1999).



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της αντοχής κλινικών στελεχών *Staphylococcus aureus* και *Enterococcus spp* στα αντιβιοτικά.

Αρχικά, μελετήθηκε η αντοχή σε διάφορα αντιβιοτικά με την χρήση κλασσικών μικροβιολογικών μεθόδων και ειδικότερα με τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (minimal inhibiting concentration-MIC).

Επιπλέον, για την ανίχνευση του *mecA* γονιδίου, του υπεύθυνου για την αντοχή του *S. aureus* στα β-λακταμικά αντιβιοτικά, και των *van* γονιδίων, υπεύθυνων για την αντοχή των *Enterococcus spp* στα γλυκοπεπίδια, εφαρμόστηκαν δύο μοριακές τεχνικές: μια multiplex PCR και ένας συνδυασμός PCR-ανάστροφου υβριδισμού.

2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΥΛΙΚΟ

Μελετήθηκε η αντοχή στα αντιβιοτικά στελεχών *Staphylococcus aureus* και *Enterococcus spp.*, τα οποία απομονώθηκαν από καλλιέργειες διαφόρων κλινικών δειγμάτων ασθενών οι οποίοι νοσηλεύτηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων (Π.Ν.Ι.) κατά την χρονική περίοδο 2000-2008. Όλα τα στελέχη αξιολογήθηκαν ως αίτια λοίμωξης. Αναλυτικότερα μελετήθηκαν :

A. 2771 στελέχη *S.aureus*.

Τα στελέχη αυτά απομονώθηκαν από καλλιέργειες αίματος, αποστημάτων/πυωδών συλλογών, τραυματικού υλικού και υλικού βρογχοσκόπησης ή βρογχοκυψελιδικής έκπλυσης.

B. 3172 στελέχη *Enterococcus spp.*

Τα στελέχη αυτά απομονώθηκαν από καλλιέργειες αίματος, αποστημάτων/πυωδών συλλογών, τραυματικού υλικού, κεντρικών καθετήρων, υγρών παρακεντήσεων και ούρων.

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

S.aureus

Μελετήθηκαν συνολικά 2771 στελέχη *S.aureus*. Σε όλα τα στελέχη, τόσο για την ταυτοποίησή τους όσο και για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα VITEK II.

- Η αντοχή τους στην μεθικιλίνη ελέγχθηκε παράλληλα με την χρήση δισκίων κεφοξιτίνης των 30μg.
- Όσα στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως μεθικιλίνη-ανθεκτικά με τις ανωτέρω μεθόδους ελέγχθηκαν στην συνέχεια με δύο μοριακές μεθόδους, μια house PCR και μια εμπορική μέθοδο η οποία συνδυάζει PCR και ανάστροφο υβριδισμό.

2.2.A.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ MIC

Ο προσδιορισμός της ευαισθησίας όλων των στελεχών *S.aureus* έγινε με την χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος VITEK II (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France).

Πρόκειται για ένα αυτοματοποιημένο σύστημα ταυτοποίησης και ελέγχου ευαισθησίας (susceptibility testing) το οποίο επιτυγχάνει τον γρήγορο προσδιορισμό της MIC ενός βακτηρίου μέσω της ανάλυσης των κινητικών ανάπτυξης (growth kinetics). Το λογισμικό του συστήματος (AES/advanced expert system) χρησιμοποιεί μια ευρεία βάση δεδομένων και αναλύει profiles ευαισθησίας για ομάδες αντιβιοτικών και όχι ευαισθησίες μεμονωμένων αντιβιοτικών. Με την προσέγγιση αυτή αναγνωρίζεται, σε πολύ υψηλά ποσοστά, και ο υποκείμενος μηχανισμός αντοχής.

Με το σύστημα αυτό ελέγχθηκε η ευαισθησία των στελεχών στα αντιβιοτικά του πίνακα 15, σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI.

Πίνακας 15. MIC του *S.aureus* σύμφωνα με το CLSI

ANTIBIOTIKO	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	R	I	S
Penicillin	≥ 0.25	-	≤ 0.12
Oxacillin	≥ 4	-	≤ 2
Cefoxitin ⁽¹⁾	≥ 8	-	≤ 4
Teicoplanin	≥ 32	8-16	≤ 8
Ciprofloxacin	≥ 4	2	≤ 1
Quinupristin /dalfopristin	≥ 4	2	≤ 1
Tetracycline	≥ 16	8	≤ 4
Clindamycin	≥ 4	1-2	≤ 0.5
Gentamicin	≥ 16	8	≤ 4
Tobramycin	≥ 16	8	≤ 4
TMP/SMX*	$\geq 4/76$	-	$\leq 2/38$
Rifampin	≥ 4	2	≤ 1
Vancomycin	≥ 16	4-8	≤ 2
Linezolid	-	-	≤ 4
Fusidic acid	≥ 32	4-16	≤ 2

*TMP/SMX: Trimethoprim-sulfamethoxazole

⁽¹⁾ Με την κεφοξιτίνη μπορούμε να προβλέψουμε την παρουσία *mecA*- μεσολαβούμενης αντοχής. Στελέχη με MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ χαρακτηρίζονται ως μεθικιλίνη-ανθεκτικά ενώ στελέχη με MIC ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ χαρακτηρίζονται ως μεθικιλίνη-ευαίσθητα.

2.2.A.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ

Όλα τα στελέχη ελέγχθηκαν με την δοκιμασία των δισκίων κεφοξιτίνης, σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI. Η δοκιμασία αυτή συνίσταται στα ακόλουθα : σε άγαρ Mueller-Hinton (MHA) ενοφθαλμίζεται βακτηριακό εναιώρημα πυκνότητας 0.5 κλίμακας McFarland. Στην συνέχεια τοποθετούνται δισκία κεφοξιτίνης των 30 μg και τα τρυβλία επωάζονται στους $35 \pm 2^\circ \text{C}$ για 16-20 ώρες. Στελέχη με διάμετρο αναστολής ≥ 22 mm χαρακτηρίζονται ως μεθικιλίνη- ευαίσθητα ενώ τα στελέχη με διάμετρο αναστολής ≤ 21 mm χαρακτηρίζονται ως μεθικιλίνη-ανθεκτικά.



2.2.A.3. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την ανίχνευση του γονιδίου *mecA* χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι :

α. Μια multiplex PCR που χρησιμοποιεί primers για :

- το *mecA*
- την υπομονάδα 16S του r-RNA (control)
- το *nuc* γονίδιο / κωδικοποιεί μια θερμοανθεκτική νουκλεάση ειδική για τον *S.aureus*.

β. Μία εμπορική μέθοδος η οποία συνδυάζει PCR και ανάστροφο υβριδισμό (reverse hybridization) και η οποία ανιχνεύει το γονίδιο *mecA* (GenoType MRSA, HAIN-Lifescience, Germany)

α. MULTIPLEX PCR

Το πρωτόκολο αυτής της house PCR βασίστηκε στην εργασία των Skov, Pallesen, Poulsen και Espersen του Statens Serum Institut της Δανίας (Skov R.L. et al., 1999).

Απομόνωση DNA

Χρησιμοποιήθηκε το QIAGEN QIAamp DNA MINI KIT (Qiagen, Valencia, CA), ελαφρά τροποποιημένο με την προσθήκη λυσοσταφίνης

- TE buffer 10:1 + lysostaphin, θέρμανση σε heating block στους 37⁰ C για 30 min

- Παρασκευή εναιωρήματος του βακτηρίου εντός ρυθμιστικού διαλύματος (ATL buffer)

- Προσθήκη 20 μl πρωτεΐνάσης K σε 180 μl εναιωρήματος, θέρμανση σε heating block στους 56⁰ C για 1-3 h

- Προσθήκη 200 μl δεύτερου ρυθμιστικού διαλύματος (AL), vortexing και επώαση στους 70⁰ C για 10 min

Ακολουθούσε προσθήκη αιθανόλης και μεταφορά του δείγματος στην ειδική στήλη πυριτίου (silica column). Μετά τη φυγοκέντρηση για την συγκράτηση του DNA στον πυθμένα της στήλης, γινόταν πλύσεις με ρυθμιστικά διαλύματα για την απομάκρυνση τυχόν επιμολύνσεων.

Το καθαρό DNA, μετά την έκλουσή του από τη στήλη πυριτίου, φυλασσόταν στους -80⁰C έως το στάδιο του πολλαπλασιασμού.

Αλληλουχίες των primers (5'-3')

MecA 1: GGG ATC ATA GCG TCA TTA TTC

MecA 2: AAC GAT TGT GAC ACG ATA GCC

Nuc 1: TCA GCA AAT GCA TCA CAA ACA G

Nuc 2: CGT AAA TGC ACT TGC TTC AGG

16S 1: GTG CCA GCA GCC GCG GTA A

16S 2: AGA CCC GGG AAC GTA TTC AC

Πίνακας 16. Συνθήκες της αντίδρασης

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση ανά αντίδραση
10 X PCR buffer	5 μl ανά αντίδραση
MgCl ₂	3.75 μM
dNTPmix	200 μM από το καθένα
MecA 1 primer	1 μM
MecA 2 primer	1 μM
Nuc 1 primer	1 μM
Nuc 2 primer	1 μM
16S 1 primer	1 μM
16S 2 primer	1 μM
Taq-polymerase	1.25 U
DNA	5 μl ανά αντίδραση
Απεσταγμένο H ₂ O	
Συνολικός όγκος	45 μl

Πίνακας 17. Κύκλοι της PCR

1 ΚΥΚΛΟΣ	30 ΚΥΚΛΟΙ	1 ΚΥΚΛΟΣ	
94 ⁰ C για 5 min	94 ⁰ C για 30sec	72 ⁰ C για 2 min	4 ⁰ C
	55 ⁰ C για 30sec		
	72 ⁰ C για 30sec		

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αгарόζης 2%
(SEAKEM GTG Agarose και NUSIEVE GTG agarose σε αναλογία 1:1)
(BMA products, Rockland, ME USA)



β. GENOTYPE[®] MRSA KIT VER 2.0 (HAIN Lifescience, Germany)

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην τεχνολογία DNA-Strip[®] και συνδυάζει την PCR με τον ανάστροφο (reverse) υβριδισμό. Μας δίνει την δυνατότητα της ταυτοποίησης των ειδών *S.aureus* και *S.epidermidis* ενώ παράλληλα ανιχνεύει το γονίδιο *mecA*.

Η PCR ανιχνεύει ένα αμπλικόνιο το οποίο περιλαμβάνει το τμήμα του SCC_{mec} το οποίο βρίσκεται μετά το γονίδιο *mecA* καθώς και ένα τμήμα του γειτονικού γονιδίου *orfX* (ειδικό για τον *S.aureus*).

Απομόνωση DNA

Χρησιμοποιήθηκε το QIAGEN QIAamp DNA MINI KIT ελαφρά τροποποιημένο με την προσθήκη λυσοσταφίνης (TE buffer 10:1 + lysostaphin, θέρμανση σε heating block στους 37⁰ για 30 min).

Πίνακας 18. Συνθήκες της αντίδρασης

αντιδραστήριο	Συγκέντρωση ανά αντίδραση
PNM (d-NTP- mix + primers)	35 μl ανά αντίδραση
10 X PCR buffer	5 μl ανά αντίδραση
MgCl ₂	1.5-2.5 mM ανά αντίδραση
DNA template	5 μl ανά αντίδραση
DNA πολυμεράση	1-2 μονάδες
Απεσταγμένο νερό	
Συνολικός όγκος ανά αντίδραση	50 μl

Πίνακας 19. Κύκλοι της PCR

1 κύκλος	22 κύκλοι	
95° C / 5 min	95° C / 20 sec	4° C
	60° C / 30 sec	

Υβριδισμός

Ο υβριδισμός περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- Χημική μετουσίωση των προϊόντων της PCR
- Υβριδισμός των μονόκλωνων, βιοτινυλιωμένων αμπλικονίων σε probes φερόμενους επί μεμβρανών (strips).
- Επώαση σε ανακινούμενο υδατόλουτρο
- Έκπλυση με stringent wash solution
- Προσθήκη συζεύγματος στρεπταβιδίνης/αλκαλικής φωσφατάσης και επώαση για 30 min
- Έκπλυση
- Προσθήκη υποστρώματος

Συνολική διάρκεια εκτέλεσης της μεθόδου : 4 ώρες

Ποιοτικός έλεγχος

Ως μάρτυρες και για τις δύο μοριακές μεθόδους χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα 4 πρότυπα στελέχη της American Type Culture Collection (ATCC) :

Staphylococcus aureus ATCC 33591 (MRSA)

Staphylococcus aureus ATCC 6538 (MSSA)

Staphylococcus epidermidis ATCC 51625 (MRSE)

Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 (MSSE)

Staphylococcus aureus ATCC 43300 (MRSA)

2.2.A.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων μας έγινε με την χρήση του λογισμικού Statistica Version 8.0.

Οι διαφορές ποσοστών αντοχής ελέγχθηκαν με την δοκιμασία χ^2 (chi-square analysis).



Enterococcus spp

Μελετήθηκαν συνολικά 2317 στελέχη *Enterococcus* spp. Σε όλα τα στελέχη, τόσο για την ταυτοποίησή τους όσο και για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα VITEK II.

Όσα στελέχη εμφάνιζαν σχετική ή απόλυτη ανοχή στα γλυκοπεπτίδια σύμφωνα με το σύστημα VITEK II ελέγχθηκαν με δύο μοριακές μεθόδους, μια house PCR και μια εμπορική μέθοδο η οποία συνδυάζει PCR και ανάστροφο υβριδισμό.

2.2.B.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ MIC

Ο προσδιορισμός της ευαισθησίας όλων των στελεχών *Enterococcus* spp. έγινε με την χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος VITEK II (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France).

Με το σύστημα αυτό ελέγχθηκαν οι MIC όλων των αντιβιοτικών του πίνακα 20, σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI.

Πίνακας 20. MIC του γένους *Enterococcus* spp (CLSI)

ANTIBIOTIKO	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	R	I	S
Penicillin / Ampicillin	≥ 16	-	≤ 8
Vancomycin	≥ 32	8-16	≤ 4
Teicoplanin	≥ 32	16	≤ 8
Ciprofloxacin	≥ 4	2	≤ 1
Quinupristin /dalfopristin	≥ 4	2	≤ 1
Linezolid	≥ 8	4	≤ 2
HL Gentamicin ⁽¹⁾	> 500	-	≤ 500
HL Streptomycin	> 2000	-	≤ 1000

⁽¹⁾ High level aminoglycoside resistance (HLAR)

2.2.B.2. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Με τις μοριακές μεθόδους ελέγχθηκαν 84 στελέχη *Enterococcus* spp τα οποία εμφάνιζαν σχετική ή απόλυτη αντοχή στα γλυκοπεπτίδια σύμφωνα με το σύστημα VITEK II. Τα στελέχη αυτά απομονώθηκαν από καλλιέργειες αίματος (14), πυωδών συλλογών /τραυματικού υλικού (21), κεντρικών καθετήρων (4) και ούρων (24).

Για την ανίχνευση των γονιδίων αντοχής των εντεροκόκκων στα γλυκοπεπτίδια χρησιμοποιήθηκαν :

α. Μια multiplex PCR που χρησιμοποιεί primers για:

- τα γονίδια VanA, VanB, VanC1, VanC₂ / C₃
- το 16S r RNA (control)

β. Μια εμπορική μέθοδος η οποία συνδυάζει PCR και ανάστροφο υβριδισμό και η οποία ταυτοποιεί τους εντεροκόκκους των ειδών *E.faecalis*, *E.faecium*, *E.gallinarum* και *E.casseliflavus*, ενώ παράλληλα ανιχνεύει τα γονίδια VanA, VanB, VanC1, VanC₂ / C₃ (GenoType VRE, HAIN-Lifescience, Germany)

α. MULTIPLEX PCR

Το πρωτόκολλο αυτής της house PCR βασίστηκε στην εργασία των Rikke Lykke Poulsen, Lars V. Pallesen, Niels Frimodt-Møller και Frank Espersen του Statens Serum Institut της Δανίας (Poulsen R.L. et al., 1999).

Απομόνωση DNA

Πραγματοποιείται μια 18-ωρη καλλιέργεια του βακτηρίου σε Columbia άγαρ + 5% αίμα προβάτου. Με την χρήση ενός κρικοφόρου στυλεού μεταφέρονται αποικίες από το τρυβλίο σε 300 μl απεσταγμένου νερού. Ακολουθεί vortexing για 30 sec, θέρμανση του εναιωρήματος σε heating block στους 100⁰ C για 10 min και τέλος, φυγοκέντρηση στις 20000 g για 5 min. Το υπερκείμενο αποτελεί το εκχυλισμένο DNA, μέρος του οποίου (5 μl) χρησιμοποιείται στη φάση της αντίδρασης του πολλαπλασιασμού.



Αλληλουχίες των primers (5' - 3')

VanA PCR1: GGA AAA CGA CAA TTG CTA TT

VanA PCR2: GTA CAA TGC GGC CGT TA

VanB PCR1: ACT GGC CTA CAT TCT TACA

VanB PCR2: AGC GTT TAG TTC TTC CGT

VanC1 PCR1: TCT CCA GAA TAC TCA GTG T

VanC1 PCR2: ACA TGG CAA CCA ACA TAA G

VanC2 / C3 PCR1: CCT CAA AAG GGA TCA CTA A

VanC2 / C3 PCR2: TCT TGA TAG GAT AAG CCG A

16S PCR1: GGA ATC TTC GGC AAT GGA

16S PCR2: CAA CCT TGC GGT CGT AC

Πίνακας 21. Συνθήκες της αντίδρασης

αντιδραστήριο	Συγκέντρωση ανά αντίδραση
10 X PCR buffer	5 μl ανά αντίδραση
d-NTP- mix	200Μμ από το καθένα
MgCl ₂	1.5 mM
VanA primers	1.2 mM από τον καθένα
VanB primers	1.0 mM από τον καθένα
VanC1 primers	0.8 mM από τον καθένα
VanC2 / C3 primers	1.2 mM από τον καθένα
16S primers	0.4 mM από τον καθένα
AmpliTaq DNA πολυμεράση	1.25 μονάδες
DNA	5 μl ανά αντίδραση
Απεσταγμένο νερό	
Συνολικός όγκος ανά αντίδραση	50 μl

Πίνακας 22. Κύκλοι της PCR

	10 κύκλοι	25 κύκλοι		
94° C / 5 min	94° C / 15 sec	92° C / 15 sec	72° C / 7 min	4° C
	55° C / 30 sec	55° C / 30 sec		
	72° C / 30 sec	72° C / 30 sec		

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης 2%
(SEAKEM GTG Agarose και NUSIEVE GTG agarose σε αναλογία 1:1)
(BMA products, Rockland, ME USA)

β. GENOTYPE ENTEROCOCCUS KIT (HAIN Lifescience, Germany)

Η μέθοδος αυτή μας δίνει την δυνατότητα της συνδυασμένης ταυτοποίησης των ειδών *E.faecalis*, *E.faecium*, *E.gallinarum* και *E.casseliflavus* ενώ παράλληλα ανιχνεύει τα γονίδια VanA, VanB, VanC₁, VanC₂ / C₃.

Απομόνωση DNA

Ακολουθείται το ίδιο πρωτόκολλο με αυτό της house PCR

Πίνακας 23. Συνθήκες της αντίδρασης

αντιδραστήριο	Συγκέντρωση ανά αντίδραση
PNM (d-NTP- mix + primers)	35 μl ανά αντίδραση
10 X PCR buffer	5 μl ανά αντίδραση
MgCl ₂	1.5-2.5 mM ανά αντίδραση
DNA template	5 μl ανά αντίδραση
DNA πολυμεράση	1-2 μονάδες
Απεσταγμένο νερό	
Συνολικός όγκος ανά αντίδραση	50 μl

Πίνακας 24. Κύκλοι της PCR

1 κύκλος	10 κύκλοι	20 κύκλοι	1 κύκλος	
95° C / 5 min	95° C / 30 sec	95° C / 25 sec	70° C / 8 min	4° C
	58° C / 2 min	53° C / 40 sec		
	72° C / 30 sec	70° C / 40 sec		



Υβριδισμός

Ο υβριδισμός περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- Χημική μετουσίωση των προϊόντων της PCR
- Υβριδισμός των μονόκλωνων, βιοτινυλιωμένων αμπλικονίων σε probes φερόμενους επί μεμβρανών (strips).
- Επώαση σε ανακινούμενο υδατόλουτρο
- Έκπλυση με stringent wash solution
- Προσθήκη συζεύγματος στρεπταβιδίνη/αλκαλικής φωσφατάσης και επώαση
- Έκπλυση
- Προσθήκη υποστρώματος

Ποιοτικός έλεγχος

Ως μάρτυρες και για τις δύο μοριακές μεθόδους χρησιμοποιήθηκαν 6 πρότυπα στελέχη διαφόρου προελεύσεως :

E.faecalis ATCC 29212 (ευαίσθητο στα γλυκοπεπίδια)

E.faecium BM4147 (VanA, Pasteur Institute / Paris)

E.faecalis V583 (VanB, CDC /Atlanta)

E.faecium strain 3363-1 (VanA + VanB, Mayo Clinic)

E.gallinarum ATCC 49573 (VanC1)

E.casseliflavus ATCC 12755 (VanC2 / C3)

Τα στελέχη BM414, V583 και 3363-1 μας παραχωρήθηκαν από το Statens Serum Institut της Δανίας.

2.3. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Τα αποτελέσματα των μοριακών μεθόδων συγκρίθηκαν με αυτά των κλασσικών τεχνικών : του συστήματος Vitek 2 και του ελέγχου ευαισθησίας στην κεφοξιτίνη για τον *S.aureus* και του συστήματος Vitek 2 για τους εντεροκόκκους.

Ορίστηκαν ως MRSA (methicillin-resistant *S.aureus*) τα στελέχη αυτά στα οποία ανιχνεύτηκε το γονίδιο *mecA*, ενώ ως GRE στελέχη (glycopeptide-resistant Enterococci), αυτά στα οποία ανιχνεύτηκε γονίδιο αντοχής στα γλυκοπεπίδια.

Υπολογίστηκε, με βάση τα παραπάνω κριτήρια, η ευαισθησία και η ειδικότητα των μεθόδων.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

S.aureus

3.A.1. Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας στην μεθικιλίνη

Συνολικά απομονώθηκαν 2771 στελέχη *S.aureus*.

α. Εξ αυτών, τα 1033 χαρακτηρίστηκαν από το σύστημα Vitek II ως μεθικιλίνη-ανθεκτικά (MRSA) και τα υπόλοιπα 1738 ως μεθικιλίνη-ευαίσθητα (MSSA).

β. Με την δοκιμασία των δισκίων κεφοξιτίνης βρέθηκαν :

i. 1044 στελέχη με διάμετρο αναστολής ≤ 21 mm.

Τα στελέχη αυτά χαρακτηρίστηκαν ως μεθικιλίνη-ανθεκτικά (MRSA)

ii. 4 στελέχη με ζώνες αναστολής μεταξύ 20 και 23 mm.

Τα στελέχη αυτά χαρακτηρίστηκαν ως «αμφίβολα».

3.A.2. Αποτελέσματα των μοριακών μεθόδων

Ελέγχθηκαν με μοριακές μεθόδους 1048 κλινικά στελέχη *S.aureus*.

Στον αριθμό αυτό περιελήφθησαν :

- 1033 στελέχη τα οποία χαρακτηρίστηκαν από το σύστημα Vitek II ως μεθικιλίνη-ανθεκτικά (MRSA)
- 11 επιπλέον στελέχη τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως μεθικιλίνη-ανθεκτικά με την μέθοδο των δίσκων κεφοξιτίνης (διάμετρος αναστολής ≤ 21 mm)
- 4 στελέχη με ζώνες αναστολής μεταξύ 20 και 23 mm.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, με τις δύο μοριακές μεθόδους ανιχνεύτηκε το γονίδιο *mecA* σε όλα τα ανωτέρω στελέχη.

Συνολικά, 1048 στελέχη χαρακτηρίστηκαν με την μέθοδο αναφοράς ως μεθικιλίνη-ανθεκτικά (MRSA). Επιπλέον, διαπιστώθηκε απόλυτη συμφωνία ανάμεσα στις δύο μοριακές μεθόδους.

Αναλυτικά, τα αποτελέσματά μας εμφανίζονται στον πίνακα 25

Πίνακας 25. Ευρήματα συμβατικών και μοριακών μεθόδων

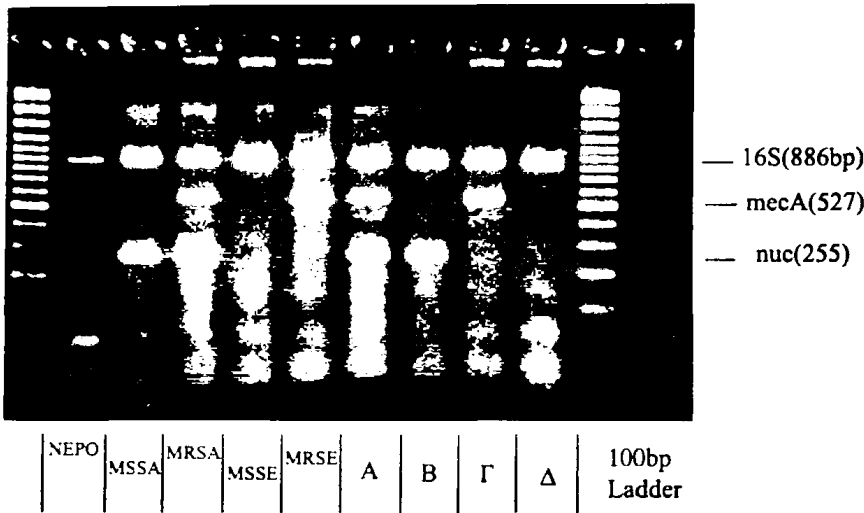
Χαρακτηρισμός των στελεχών	Στελέχη στα οποία ανιχνεύτηκε το γονίδιο <i>mecA</i> (+)	Στελέχη στα οποία δεν ανιχνεύτηκε το γονίδιο <i>mecA</i> (-)
MRSA από το Vitek II	1033	-
MSSA από το Vitek II	15	-
MRSA με την μέθοδο των δίσκων κεφοξιτίνης	1044	-
MSSA με την μέθοδο των δίσκων κεφοξιτίνης	4	-

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η ευαισθησία του συστήματος Vitek II σε σχέση με την μέθοδο αναφοράς υπολογίστηκε σε 98.5 %, ενώ η ευαισθησία της δοκιμασίας των δίσκων κεφοξιτίνης σε σχέση με την μέθοδο αναφοράς υπολογίστηκε σε 99.6 %.

Η ειδικότητα τόσο του συστήματος Vitek II όσο και της δοκιμασίας των δίσκων κεφοξιτίνης ήταν 100 %.

Μέθοδος	Ευαισθησία	Ειδικότητα
House PCR	100 %	100 %
GENOTYPE® MRSA kit	100 %	100 %
Vitek II	98.5 %	100 %
Δοκιμασία δίσκων κεφοξιτίνης	99.6 %	100 %

Εικόνα 1. MRSA Multiplex PCR



MSSA: Methicillin-sensitive *S.aureus*

MRSA : Methicillin-resistant *S.aureus*

MRSE : Methicillin-resistant *S.epidermidis*

MSSE : Methicillin-sensitive *S.epidermidis*

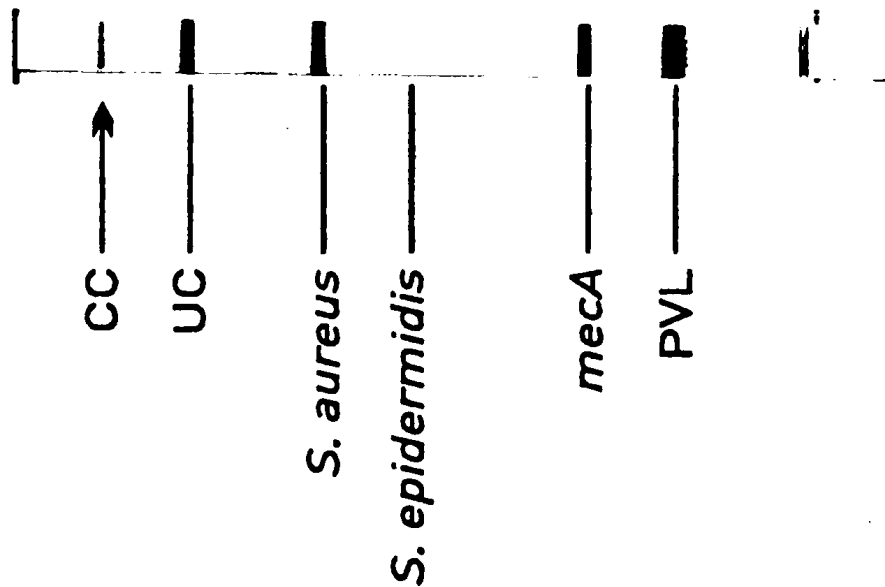
A: *Staphylococcus aureus* ATCC 33591

B: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Γ: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 51625

Δ: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

Εικόνα 2. Στέλεχος MRSA (Strip υβριδισμού Genotype MRSA)



3.A.3. Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας σε άλλα αντιβιοτικά

Πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της ευαισθησίας και ο προσδιορισμός της MIC όλων των στελεχών *S.aureus* τα οποία απομονώθηκαν στο Π.Ν.Ι. κατά το χρονικό διάστημα 2000-2008.

Συνολικά απομονώθηκαν 2771 στελέχη. Τα στελέχη αυτά εμφάνιζαν την ακόλουθη αντοχή (πίνακας 26)

Πίνακας 26. Αντοχή (%) στα αντιβιοτικά των στελεχών *S.aureus* τα οποία απομονώθηκαν κατά το διάστημα 2000-2008

	MRSA n= 1048 (37.8%)	MSSA n= 1723
Πενικιλίνη	100 %	84 %
Κλινδαμυκίνη	45 %	5 %
Φουσιδικό οξύ	73 %	13 %
Τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη	5 %	0.0 %
Ριφαμικίνη	38 %	1 %
Γενταμυκίνη	41 %	2 %
Τομπραμυκίνη	50 %	4 %
Τετρακυκλίνη	73 %	17 %
Σιπροφλοξασίνη	29 % ⁽¹⁾	2 % ⁽²⁾
Κινουπριστίνη/δαλφοπριστίνη	0.0 % ⁽³⁾	0 ⁽⁴⁾
Λινεζολίδη	0 ⁽⁵⁾	0 ⁽⁶⁾
Βανκομυκίνη	0	0

⁽¹⁾ ⁽³⁾ ⁽⁵⁾ επί 508 στελεχών

⁽²⁾ ⁽⁴⁾ ⁽⁶⁾ επί 720 στελεχών



3.A.4. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ελέγχου ευαισθησίας

Με τα δεδομένα του πίνακα 26, υπολογίσαμε τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (confidence intervals) για τις διαφορές των ποσοστών αντοχής μεταξύ MRSA και MSSA (95% C.I : από $(P_1-P_2) - 1.96 SE$ έως $(P_1-P_2) + 1.96 SE$).

Το 95% διάστημα εμπιστοσύνης (CI) για την διαφορά των ποσοστών αντοχής στην κλινδαμυκίνη μεταξύ MRSA και MSSA είναι από 0.3681 έως 0.4318.

Τα αντίστοιχα διαστήματα είναι 0.5687 έως 0.6312 για το φουσιδικό οξύ, 0.2292 έως 0.310 για την σιπροφλοξασίνη και 0.5278 έως 0.5922 για την τετρακυκλίνη.

Συμπεραίνουμε επομένως, ότι για τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά, οι διαφορές των ποσοστών αντοχής μεταξύ MRSA και MSSA είναι στατιστικά σημαντικές σε επίπεδο 5 % ($P < 0.05$). Αν χρησιμοποιήσουμε την μέθοδο του χ^2 (chi-square analysis) βλέπουμε ότι υπάρχει πολύ ισχυρή ένδειξη (very strong evidence) ότι οι διαφορές αυτές είναι στατιστικά σημαντικές ($P < 0.0001$).

Πίνακας 27. Ποσοστά αντοχής *S.aureus* ανά έτος

	2001		2002		2003		2004	
	MSSA	MRSA	MSSA	MRSA	MSSA	MRSA	MSSA	MRSA
	n=171	n= 128 (42.8%)	n= 209	n= 124 (37.2%)	n= 196	n= 118 (37.5%)	n= 209	n= 90 (30.1%)
Κλινδαμυκίνη	4 %	66 %	3 %	63 %	2 %	53 %	4 %	33 %
Φουσιδικό οξύ	5 %	77 %	8 %	81 %	8 %	68 %	5 %	70 %
TMP/SMX*	0 %	4 %	0 %	5 %	0 %	5 %	0 %	6 %
Γενταμυκίνη	2 %	66 %	2 %	65 %	3 %	44 %	0 %	36 %
Τετρακυκλίνη	12 %	76 %	12 %	82 %	6 %	67 %	16 %	70 %
Σιπροφλοξασίνη	-	-	-	-	-	-	-	-
ΡΙφαμυκίνη	0 %	65 %	1 %	64 %	1 %	43 %	0 %	34 %
Τομπραμυκίνη	4 %	71 %	5 %	69 %	6 %	62 %	7 %	77 %
Νιτροφουραντοΐνη	4 %	2 %	10 %	7 %	8 %	10 %	3 %	6 %

	2005		2006		2007		2008	
	MSSA	MRSA	MSSA	MRSA	MSSA	MRSA	MSSA	MRSA
	n= 179	n= 103 (36.5%)	n= 192	N= 176 (47.8%)	n= 179	n= 131 (42.2%)	n= 219	n= 114 (34.2%)
Κλινδαμυκίνη	6 %	16 %	4 %	40 %	2 %	27 %	11 %	42 %
Φουσιδικό οξύ	12 %	72 %	21 %	81 %	30 %	64 %	21 %	63 %
TMP/SMX	1 %	5 %	0 %	3 %	0 %	8 %	1 %	4 %
Γενταμυκίνη	3 %	13 %	2 %	32 %	1 %	28 %	0 %	27 %
Τετρακυκλίνη	18 %	71 %	22 %	80 %	34 %	64 %	21 %	64 %
Σιπροφλοξασίνη	6 % ⁽¹⁾	17 % ⁽²⁾	2 %	37 %	2 %	29 %	0 %	27 %
ΡΙφαμπικίνη	3 %	13 %	1 %	34 %	1 %	17 %	0 %	16 %
Τομπραμυκίνη	7 %	27 %	2 %	32 %	1 %	27 %	1 %	34 %
Νιτροφουραντοίνη	5 %	3 %	2 %	2 %	4 %	9 %	3 %	2 %

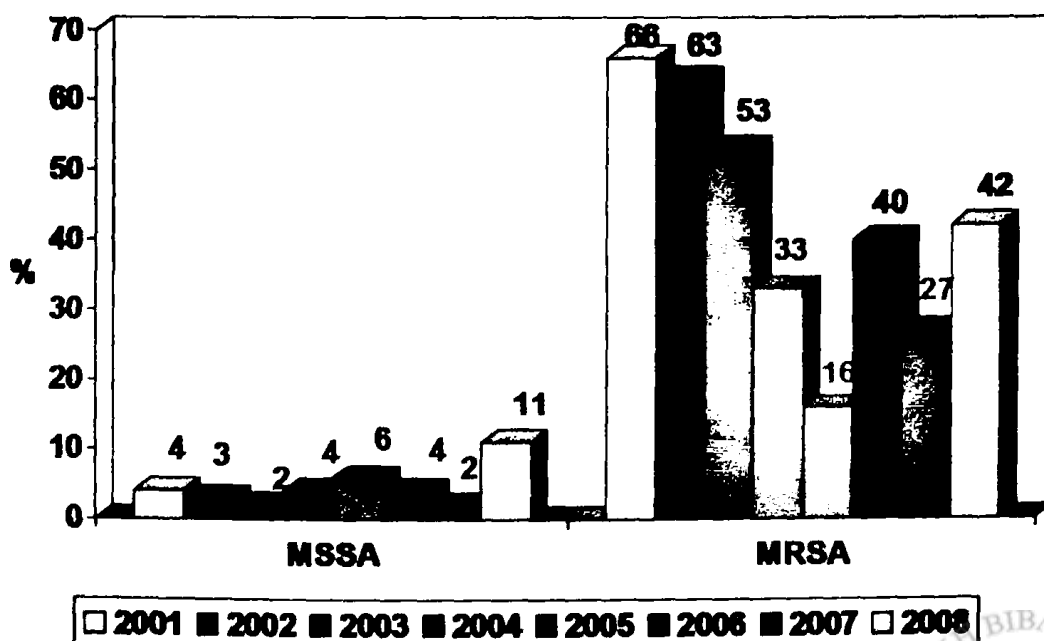
* TMP/SMX= κοτριμοξαζόλη

⁽¹⁾ επί 127 στελεχών

⁽²⁾ επί 86 στελεχών

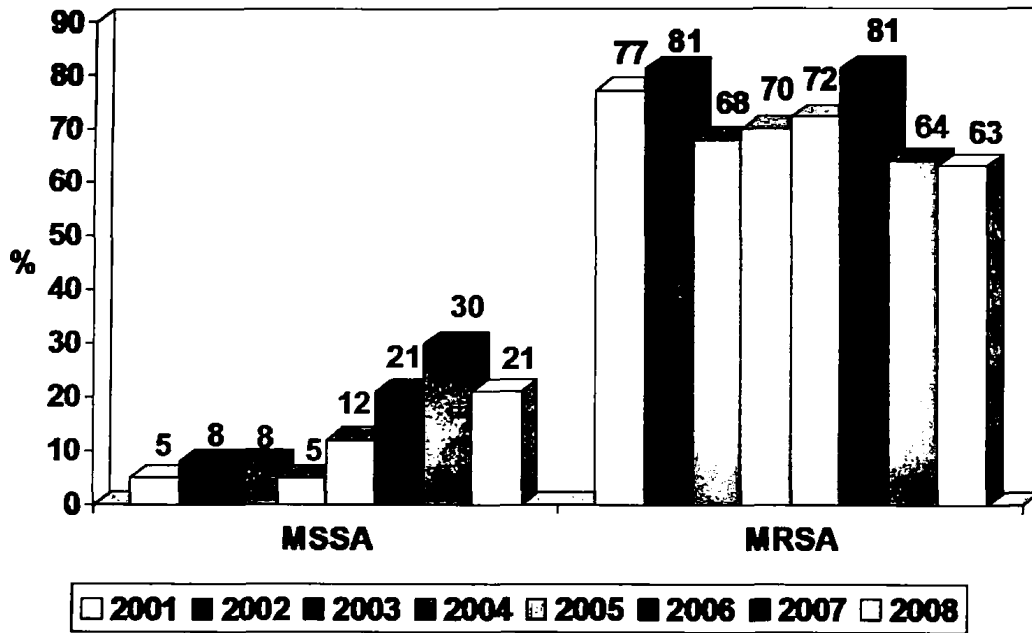
Γράφημα 1. Αντοχή *S.aureus* στην κλινδαμυκίνη

ΚΛΙΝΔΑΜΥΚΙΝΗ



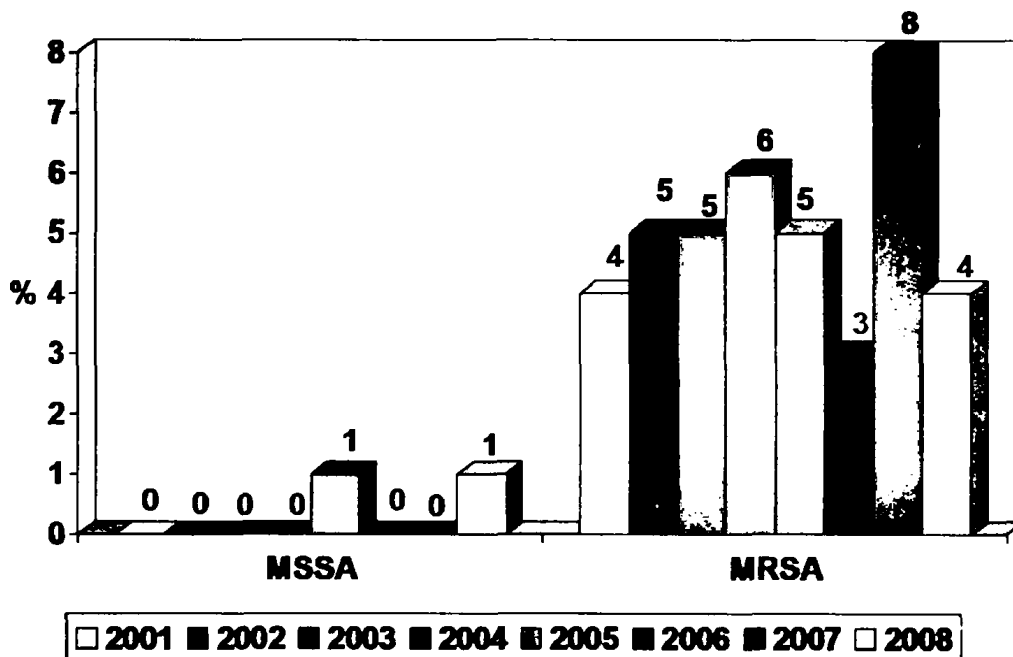
Γράφημα 2. Αντοχή *S.aureus* στο φουσιδικό οξύ

ΦΟΥΣΙΔΙΚΟ ΟΞΥ

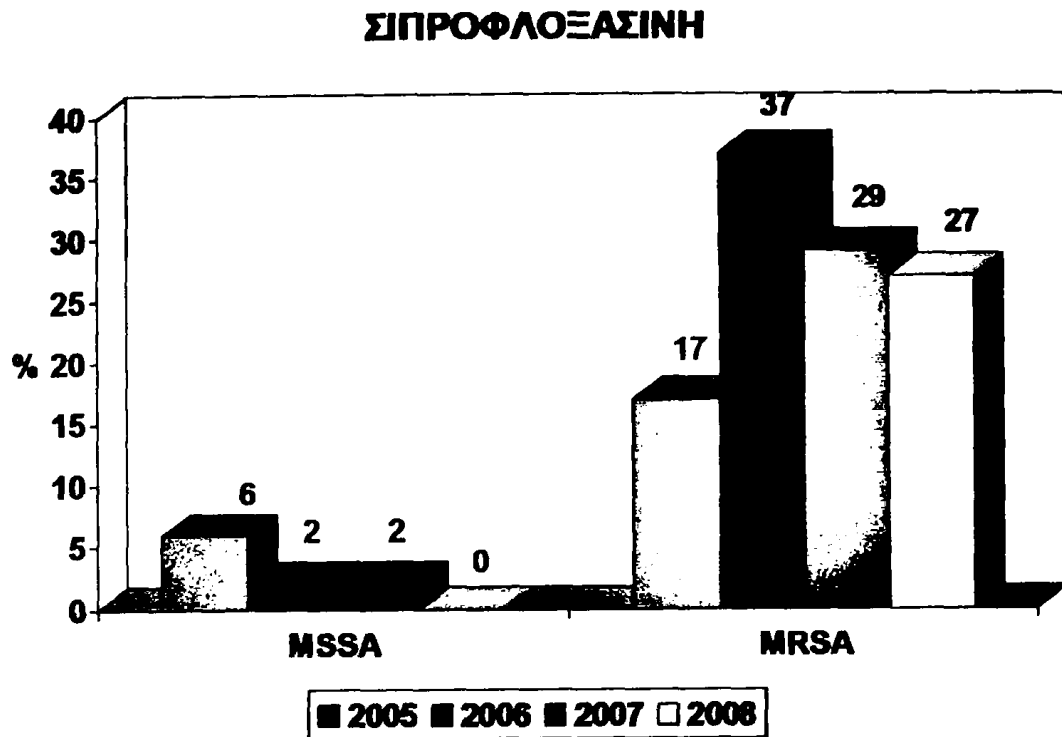


Γράφημα 3. Αντοχή *S.aureus* στην κοτριμοξαζόλη

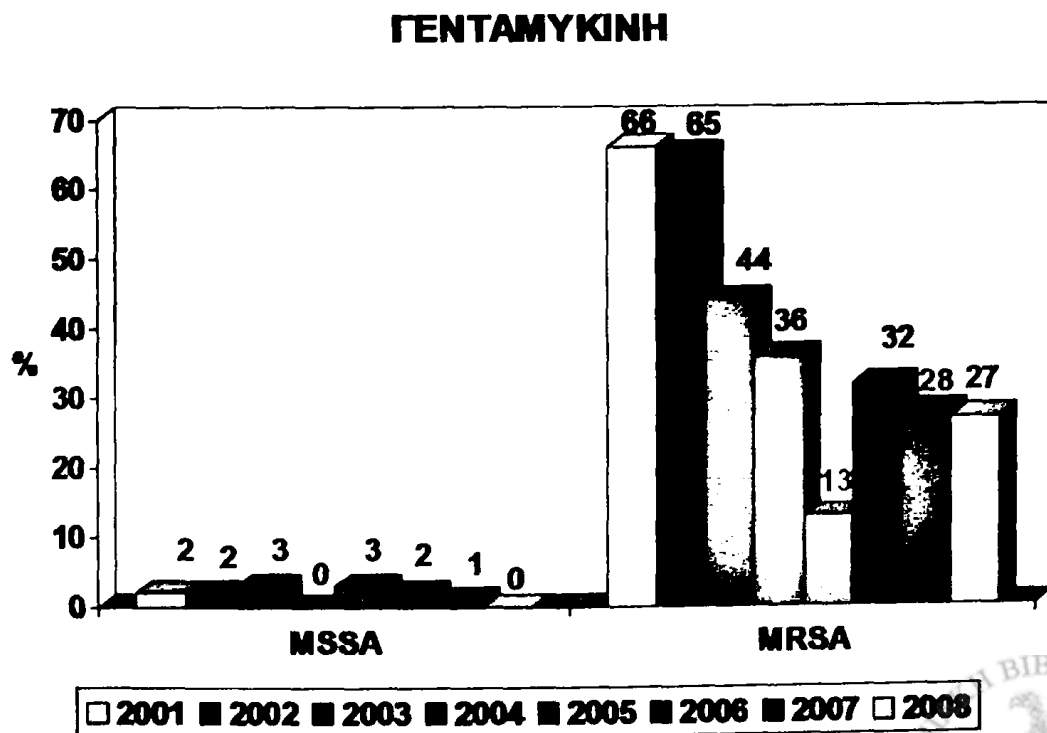
TMP/SMX



Γράφημα 4. Αντοχή *S.aureus* στην σιπροφλοξασίνη



Γράφημα 5. Αντοχή *S.aureus* στην γενταμυκίνη



Enterococcus spp

3.B.1. Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της ευαισθησίας και ο προσδιορισμός της MIC όλων των στελεχών *Enterococcus spp* τα οποία απομονώθηκαν στο Π.Ν.Ι. κατά το χρονικό διάστημα 2000-2008.

Συνολικά απομονώθηκαν 3172 στελέχη εκ των οποίων 2613 *E.faecalis* και 559 *E.faecium*. Πέραν των 3172 αυτών στελεχών, 51 συνολικά στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *gallinarum/casseliflavus*, δεδομένου ότι το σύστημα Vitek II αδυνατεί να ταυτοποιήσει τους κινητούς εντεροκόκκους σε επίπεδο είδους (species level). Τα στελέχη αυτά εμφάνιζαν την ακόλουθη αντοχή (πίνακας 29) :

Πίνακας 28. Αντοχή (%) στελεχών *E.faecalis* και *E.faecium* τα οποία απομονώθηκαν στο Π.Ν.Ι. κατά την χρονική περίοδο 2000-2008

	2000		2001		2002	
	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>
	n = 212	n = 37	n = 234	n = 51	n = 302	n = 57
Ampicillin	3 %	81 %	5 %	76 %	3 %	83 %
Gentamicin HL	69 %	69 %	60 %	82 %	71 %	74 %
STM HL	49 %	54 %	51 %	33 %	50 %	19 %
Vancomycin	1 %	3 %	3 %	8 %	1 %	22 %
Teicoplanin	0 %	0 %	1 %	8 %	1 %	22 %
Quin/Dalfopristin	100 %	38 %	100 %	43 %	100 %	24 %

	2003		2004		2005	
	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>
	n = 282	n = 66	n = 251	n = 66	n = 309	n = 66
Ampicillin	1 %	82 %	1 %	79 %	1 %	80 %
Gentamicin HL	48 %	62 %	32 %	30 %	33 %	27 %
STM HL	43 %	38 %	44 %	79 %	52 %	83 %
Vancomycin	0 %	17 %	0 %	14 %	0 %	6 %
Teicoplanin	0 %	17 %	0 %	12 %	0 %	6 %
Quin/Dalfopristin	100 %	20 %	100 %	9 %	100 %	5 %
Linezolid	-	-	-	-	8 %	0 %

	2006		2007		2008	
	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>
	n = 291	n = 67	n = 371	n = 65	n = 361	n = 84
Ampicillin	1 %	82 %	2 %	91 %	14 %	93 %
Gentamicin HL	37 %	30 %	49 %	43 %	37 %	45 %
STM HL	57 %	79 %	64 %	89 %	52 %	87 %
Vancomycin	0 %	30 %	2 %	36 %	0.3 %	20 %
Teicoplanin	0 %	25 %	2 %	30 %	0 %	7 %
Quin/Dalfopristin	100 %	7 %	100 %	10 %	100 %	5 %
Linezolid	2 %	1 %	2 %	0 %	4 %	2 %



3.B.2. Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας στα γλυκοπεπτίδια

Από τα 2317 στελέχη τα οποία απομονώθηκαν συνολικά, τα 76 εμφάνιζαν απόλυτη ή ενδιάμεση αντοχή στα γλυκοπεπτίδια και χαρακτηρίστηκαν με το σύστημα Vitek II ως GRE (glycopeptide-resistant Enterococci). Με το σύστημα αυτό, 11 από τα στελέχη αυτά ταυτοποιήθηκαν ως *E.faecalis* και 65 ως *E.faecium*.

Όλοι οι κινητοί εντερόκοκκοι χαρακτηρίστηκαν με το ίδιο σύστημα ως ενδιάμεσης ευαισθησίας στην βανκομυκίνη (MIC: 8-16 µg/ml) και ως ευαίσθητοι στην τεϊκοπλανίνη (MIC: ≤ 0.5 µg/ml).

Αναλυτικά, από τα παραπάνω 76 στελέχη:

- 6 στελέχη *E.faecalis* και 2 στελέχη *E.faecium* εμφάνιζαν ενδιάμεση αντοχή στην βανκομυκίνη (MIC: 8-16 µg/ml)
- 5 στελέχη *E.faecalis* και 7 στελέχη *E.faecium* χαρακτηρίστηκαν με το σύστημα Vitek II ως ευαίσθητα στην τεϊκοπλανίνη (MIC: ≤ 0.5-16 µg/ml)
- τα υπόλοιπα 62 στελέχη εμφάνιζαν MIC ≥ 32 µg/ml, τόσο στην βανκομυκίνη όσο και στην τεϊκοπλανίνη.

Οι MIC των στελεχών με ενδιάμεση αντοχή στα γλυκοπεπτίδια απεικονίζονται στον πίνακα 29

Πίνακας 29. MIC στελεχών *Enterococcus* spp με ενδιάμεση αντοχή στα γλυκοπεπτίδια

		Παρατηρούμενες MIC στα γλυκοπεπτίδια					
		≤ 0.5 μg/ml	1 μg/ml	≤ 4 μg/ml	8 μg/ml	16 μg/ml	≥ 32 μg/ml
Στέλεχος 1 <i>E. faecalis</i>	Vancomycin					+	
	Teicoplanin		+				
Στέλεχος 2 <i>E. faecium</i>	Vancomycin						+
	Teicoplanin	+					
Στέλεχος 3 <i>E. faecalis</i>	Vancomycin						+
	Teicoplanin				+		
Στέλεχος 4 <i>E. faecium</i>	Vancomycin						+
	Teicoplanin					+	
Στέλεχος 5 <i>E. faecium</i>	Vancomycin						+
	Teicoplanin			+			
Στέλεχος 6 <i>E. faecalis</i>	Vancomycin				+		
	Teicoplanin		+				
Στέλεχος 7 <i>E. faecalis</i>	Vancomycin				+		
	Teicoplanin						+
Στέλεχος 8 <i>E. faecalis</i>	Vancomycin				+		
	Teicoplanin						+
Στέλεχος 9 <i>E. faecium</i>	Vancomycin					+	
	Teicoplanin	+					
Στέλεχος 10 <i>E. faecium</i>	Vancomycin						+
	Teicoplanin		+				
Στέλεχος 11 <i>E. faecium</i>	Vancomycin					+	
	Teicoplanin	+					
Στέλεχος 12 <i>E. faecalis</i>	Vancomycin				+		
	Teicoplanin		+				
Στέλεχος 13 <i>E. faecium</i>	Vancomycin						+
	Teicoplanin	+					
Στέλεχος 14 <i>E. faecalis</i>	Vancomycin						
	Teicoplanin	+				+	



Οι φαινότυποι αντοχής των GRE στελεχών στα λοιπά αντιβιοτικά απεικονίζονται στον πίνακα 30

Πίνακας 30. Αντοχή των GRE στελεχών σε άλλα αντιβιοτικά

	<i>E.faecalis & E.faecium</i> n= 76		
	R	I	S
Αμπικιλίνη	70 (92.1 %)		6
Αμπικιλίνη-σουλβακτάμη	67 (88.1 %)		9
Σιπροφλοξασίνη	72 (94.7 %)	2	2
Γενταμυκίνη High Level	32 (42.1 %)	-	44
Στρεπτομυκίνη High Level	70 (92.1 %)	-	6
Νιτροφουραντοΐνη	32 (42.1 %)	27	17
Κινουπριστίνη/δαλφοπριστίνη	11 (14.4 %)	7	58
Λινεζολίδη	0	-	76

R: Resistant, ανθεκτικά

S: Susceptible, ευαίσθητα

I: Intermediate, ενδιάμεσης ευαισθησίας

3.B.2. Αποτελέσματα των μοριακών μεθόδων

Ελέγχθηκαν με μοριακές τεχνικές όσα στελέχη εντεροκόκκων εμφάνιζαν απόλυτη ή σχετική αντοχή στα γλυκοπεπίδια, δηλαδή 76 στελέχη συνολικά. Οι κινητοί εντερόκοκκοι δεν ελέγχθηκαν, καθώς εμφανίζουν χαμηλού βαθμού εγγενή αντοχή στα γλυκοπεπίδια.

- Σε δύο στελέχη *E.faecalis* τα οποία χαρακτηρίστηκαν από το σύστημα Vitek II ως ενδιάμεσης ευαισθησίας στην βανκομυκίνη (MIC= 16 µg/ml), η PCR δεν ανίχνευσε κάποιο γονίδιο αντοχής.
- Σε όλα τα υπόλοιπα στελέχη, με την PCR ανιχνεύτηκε γονίδιο αντοχής.
- Υπήρξε απόλυτη ταύτιση των ευρημάτων των 2 μοριακών μεθόδων.

Συνολικά βρέθηκαν 63 στελέχη με γονότυπο VanA και 11 στελέχη με γονότυπο VanB.

Αναλυτικότερα βρέθηκαν:

- 56 στελέχη *E.faecium* με γονότυπο VanA
- 7 στελέχη *E.faecalis* με γονότυπο VanA
- 9 στελέχη *E.faecium* με γονότυπο VanB
- 2 στελέχη *E.faecalis* με γονότυπο VanB

Βλέπουμε πως τα ανθεκτικά στα γλυκοπεπίδια στελέχη *E.faecalis* αντιπροσωπεύουν το 0.35 % των στελεχών *E.faecalis*, ενώ τα ανθεκτικά στα γλυκοπεπίδια στελέχη *E.faecium* αντιπροσωπεύουν το 11.63 % των στελεχών *E.faecium* τα οποία απομονώθηκαν στο Π.Ν.Ι. κατά την χρονική περίοδο 2000-2008.

Στον πίνακα 31 παρατίθενται οι ανευρεθέντες γονότυποι των GRE στελεχών με ενδιάμεση αντοχή στα γλυκοπεπίδια καθώς και οι αντίστοιχοι φαινότυποι.



Πίνακας 31. Ανευρεθέντες γονότυποι των GRE στελεχών με ενδιάμεση ανοχή στα γλυκοπεπτίδια και αντίστοιχοι φαινότυποι

Στέλεχος	Γονότυπος	Φαινότυπος
<i>E. faecalis</i>	-	V _I T _S
<i>E. faecalis</i>	-	V _I T _S
<i>E. faecium</i>	VanB	V _R T _S
<i>E. faecalis</i>	VanB	V _R T _S
<i>E. faecium</i>	VanA	V _R T _I
<i>E. faecium</i>	VanB	V _R T _S
<i>E. faecalis</i>	VanA	V _I T _S
<i>E. faecalis</i>	VanA	V _I T _R
<i>E. faecalis</i>	VanA	V _I T _R
<i>E. faecium</i>	VanB	V _I T _S
<i>E. faecium</i>	VanB	V _R T _S
<i>E. faecium</i>	VanB	V _I T _S
<i>E. faecalis</i>	VanB	V _I T _S
<i>E. faecium</i>	VanB	V _R T _S

V_I: Vancomycin intermediate resistance, V_R: Vancomycin resistant

T_S: Teicoplanin sensitive, T_R: Teicoplanin resistant

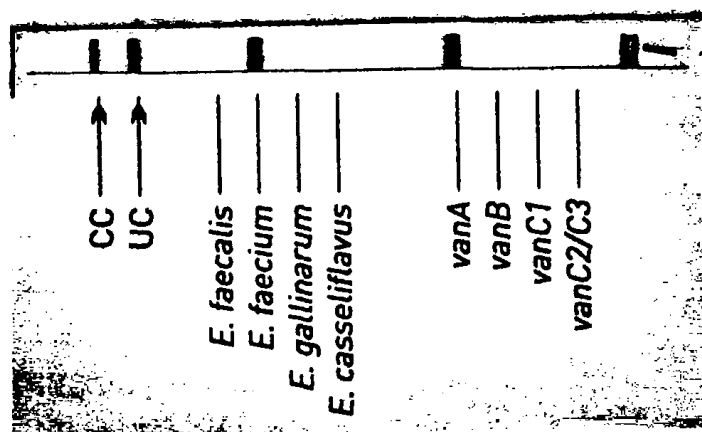
Πίνακας 32. Αποτελέσματα συστήματος Vitek 2 και μοριακών μεθόδων

	Στελέχη στα οποία ανιχνεύτηκε γονίδιο ανοχής n	Στελέχη στα οποία δεν ανιχνεύτηκε γονίδιο ανοχής n
Στελέχη τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως GRE από το σύστημα Vitek 2	61	-
Στελέχη τα οποία εμφάνισαν αμφίβολουσ φαινότυπους με το σύστημα Vitek 2	12	2

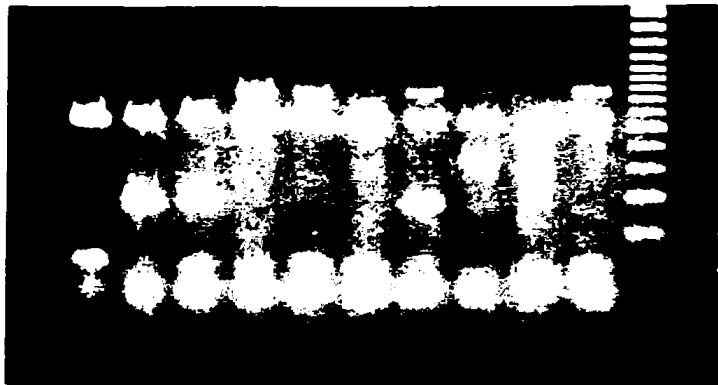
GRE: Glycopeptide-resistant Enterococci

Με βάση τον παραπάνω πίνακα, η ευαισθησία του συστήματος Vitek 2 σε σχέση με την μέθοδο αναφοράς υπολογίστηκε σε 83.5 %.

Εικόνα 3. Στέλεχος *E. faecium* VanA(+) (Strip υβριδισμού Genotype VRE)



Εικόνα 4. VRE Multiplex PCR



VanA(731bp)
16S (549)
C2/3 (448)
C1 (329)
VanB (175)

ATCC 29212	A	B	Γ	VanA + VanB	VanC1	C2/C3	Δ	100bp Ladder
VanB+	VanA+							

E. faecalis ATCC 29212: στέλεχος ευαίσθητο στα γλυκοπεπτίδια

VanA: *E. faecium* BM4147

VanB: *E. faecalis* V583

VanA + VanB: *E. faecium* strain 3363-1

VanC1: *E. gallinarum* ATCC 49573

VanC2 / C3: *E. casseliflavus* ATCC 12755

A: στέλεχος VanB

B: στέλεχος VanA

Γ: στέλεχος ευαίσθητο στα γλυκοπεπτίδια

Δ: στέλεχος VanA

B.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η διατριβή αυτή επικεντρώθηκε στις δύο σημαντικότερες εκφάνσεις της αντοχής των Gram θετικών βακτηρίων: την αντοχή του *S.aureus* στην μεθικιλίνη και την αντοχή των εντεροκόκκων στα γλυκοπεπτίδια.

Η χρήση των συμβατικών μεθόδων για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των *S.aureus* στην μεθικιλίνη απεδείχθη ιδιαίτερα προβληματική.

Η βιβλιογραφία πάνω στις μεθόδους ελέγχου της ευαισθησίας στην μεθικιλίνη είναι συχνά αντικρουόμενη όσον αφορά την επιλογή της πλέον αξιόπιστης μεθόδου ως μεθόδου ρουτίνας. Οι άριστες συνθήκες για την ανίχνευση της αντοχής διαφέρουν από στέλεχος σε στέλεχος και γενικά, δεν υπάρχουν συγκεκριμένες συνθήκες που επιτρέπουν την ανίχνευση όλων των ανθεκτικών στελεχών (Brown D.F.J. et al., 2005). Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο το CLSI (NCCLS) έχει προβεί σε μια σειρά τροποποιήσεων των οδηγιών του. Υπάρχουν μάλιστα αναφορές ότι ακόμα και με την συμβατική μέθοδο αναφοράς (μέθοδος αραιώσεων) υπήρξαν κάποια εσφαλμένα αποτελέσματα (Brown D.F.J. et al., 2005).

Το πρόβλημα των φαινοτυπικών μεθόδων είναι απόρροια της εξαιρετικά περίπλοκης ρύθμισης της έκφρασης της συγκεκριμένης αντοχής. Λίγα πράγματα γνωρίζουμε, επί του παρόντος, για την ρύθμιση αυτή. Οι περισσότεροι ερευνητές πάντως πιστεύουν ότι το *mecA* γονίδιο ρυθμίζεται σε επίπεδο μεταγραφής και ότι ο βαθμός της έκφρασης της αντοχής στην μεθικιλίνη δεν συσχετίζεται απαραίτητα με την ολική ποσότητα παραγόμενης PBP2'. Γεγονός είναι ότι μεταξύ των MRSA στελεχών παρατηρούνται ακραίες διακυμάνσεις της MIC για την μεθικιλίνη. Το φαινόμενο της ετεροαντοχής παίζει κυρίαρχο ρόλο στην εμφάνιση των διακυμάνσεων αυτών. Συνίσταται στην ύπαρξη ενός κυρίαρχου πληθυσμού (99.9%) με χαμηλή MIC για την μεθικιλίνη (1-5 $\mu\text{g/ml}$) και ενός ανθεκτικού υποπληθυσμού με $\text{MIC} \geq 50$ $\mu\text{g/ml}$. Έχει παρατηρηθεί ότι κάποιες συγκεκριμένες καλλιεργητικές συνθήκες (προσθήκη EDTA, pH 5.2, επώαση στους 37- 43⁰ C) καταστέλλουν αυτόν τον ανθεκτικό υποπληθυσμό ενώ κάποιες άλλες (προσθήκη NaCl, επώαση στους 30⁰ C) αυξάνουν το ποσοστό των CFUs που εκφράζουν αντοχή (από 0.1% σε 1%). Ας σημειωθεί εδώ ότι κάποια στελέχη που φέρουν ακέραιο το ρυθμιστικό σύστημα *mecI-mecR1* καταστέλλονται ισχυρά και παράγουν PBP2' μόνο κατόπιν επαγωγής.



Η επαγωγή στα στελέχη αυτά είναι βραδεία.

Η μεθικιλίνη και η οξακιλλίνη είναι ασθενείς επαγωγείς (inducers). Πλήρης επαγωγή από τα αντιβιοτικά αυτά παρατηρείται μετά από 48 ώρες. Επομένως, αν χρησιμοποιήσουμε δισκία μεθικιλίνης ή οξακιλλίνης στην δοκιμασία Bauer-Kirby, ενδέχεται τα στελέχη αυτά να εμφανιστούν ως ψευδώς ευαίσθητα.

Πρόσφατα διαπιστώθηκε μια ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στην MIC της κεφοξιτίνης και στην αντοχή στην μεθικιλίνη. Η συσχέτιση αυτή μεσολαβείται από άγνωστους ακόμα μηχανισμούς. Ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι, σε σχέση με τις κεφαλοσπορίνες, οι κεφαμυκίνες (μοξαλακτάμη, κεφοξιτίνη) έχουν υψηλή χημική συγγένεια με την PBP4 του *S.aureus*, μια πρωτεΐνη η οποία εμπλέκεται στο cross-linking του βακτηριακού τοιχώματος (Felten A. et al., 2002). Η ανωτέρω διαπίστωση οδήγησε στην εισαγωγή της κεφοξιτίνης στην διαγνωστική ως μιας εναλλακτικής μεθόδου ανίχνευσης της αντοχής στην μεθικιλίνη. Τα αποτελέσματα, εφαρμόζοντας τα κριτήρια της NCCLS, ήταν πολύ ενθαρρυντικά ενώ αντίθετα, οι παλαιότερες φαινοτυπικές μέθοδοι επιδεικνύουν σημαντικά χαμηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα.

Έτσι, προέκυψε η ανάγκη της εφαρμογής των μοριακών τεχνικών στην μελέτη της αντοχής του *S.aureus* στα β-λακταμικά αντιβιοτικά, ανάγκη η οποία καταδεικνύεται και στην δική μας μελέτη. Γενικά, το γονίδιο *mecA* είναι σταθερά ανιχνεύσιμο σε όλα τα είδη του γένους *Staphylococcus*, ενώ ταυτόχρονα δεν ανευρίσκεται κάποια ομόλογη αλληλουχία στα μεθικιλίνη-ευαίσθητα στελέχη. Ως εκ τούτου, η PCR θεωρείται πλέον ως το 'gold standard' για την ανίχνευση της αντοχής στην μεθικιλίνη (Skon R.L. et al., 1999). Μεγάλο μέρος της αλληλουχίας του *mecA* είναι αυστηρά διατηρούμενο (highly conserved).

Σήμερα, γνωρίζοντας πλέον την πλήρη αλληλουχία νουκλεοτιδίων του *mecA*, έχουμε την δυνατότητα να επιλέξουμε αλληλουχίες primers από μια τεράστια βάση δεδομένων (GenBank). Παράλληλα μπορούμε να εξασφαλίσουμε την απόλυτη ειδικότητα και την μέγιστη αποτελεσματικότητά των primers αυτών με την χρήση ειδικών πακέτων λογισμικού (Poulsen R.L. et al., 1999). Στην βιβλιογραφία υπάρχει μια πληθώρα PCR πρωτοκόλλων για την ενίσχυση του *mecA* γονιδίου. Τα πρωτόκολλα αυτά χρησιμοποιούν διαφορετικούς primers (Vannuffel P. et al., 1995; Geha D.J. et al., 1994; Ubukata K. et al., 1992).



Οι Skov et al, συγγραφείς του πρωτοκόλλου της house PCR την οποία χρησιμοποιήσαμε, επισημαίνουν ότι μεγάλο μέρος της αλληλουχίας του *mecA* είναι αυστηρά διατηρούμενο (*highly conserved*), γεγονός που προσδίδει στην μέθοδό μας άριστη ευαισθησία και ειδικότητα (Skov R.L. et al., 1999).

Οι Holfeder et al από την άλλη, αξιολογώντας την εμπορευματοποιημένη μοριακή μέθοδο ανίχνευσης του γονιδίου *mecA* (GENOTYPE[®] MRSA kit), διαπίστωσαν ότι η μέθοδος είχε υψηλά ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας, αντίστοιχα με αυτά της δικής μας μελέτης.

Οι Felten et al μελέτησαν 152 κλινικά στελέχη *S.aureus* και συνέκριναν τα ευρήματα διαφόρων φαινοτυπικών μεθόδων με τα ευρήματα της PCR, οι primers της οποίας ήταν ίδιοι με της μελέτης μας (Felten A. et al., 2002). Στα στελέχη αυτά περιελήφθη και ένας αριθμός στελεχών με χαμηλού βαθμού αντοχή στην μεθικιλίνη. Σχετικά με την μέθοδο των δίσκων κεφοξιτίνης, οι συγγραφείς κάνουν λόγο για 99.3% ευαισθησία και 100% ειδικότητα. Οι Cauwelier et al, συγκρίνοντας τα ευρήματα της ίδιας μεθόδου με την PCR, υπολογίζουν την ευαισθησία της μεθόδου σε 99 % και την ειδικότητα σε 100% (Cauwelier B. et al., 2004). Τα ευρήματα των εργασιών αυτών είναι σύμφωνα με τα ευρήματα της δικής μας μελέτης, όσον αφορά την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου των δίσκων κεφοξιτίνης .

Η χρήση του συστήματος Vitek 2 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) επέφερε μια θεαματική πρόοδο στον έλεγχο της ευαισθησίας των βακτηρίων καθώς, όπως προκύπτει από μια πληθώρα εργασιών, πλεονεκτεί σημαντικά έναντι των μεθόδων ρουτίνας ενός κλινικού εργαστηρίου (μέθοδος Kirby-Bauer). Πρόκειται για ένα αυτοματοποιημένο σύστημα ταυτοποίησης και ελέγχου ευαισθησίας (*susceptibility testing*) το οποίο επιτυγχάνει τον γρήγορο προσδιορισμό της MIC ενός βακτηρίου μέσω της ανάλυσης των κινητικών ανάπτυξης (*growth kinetics*). Το λογισμικό του (AES / *advanced expert system*) χρησιμοποιεί μια βάση δεδομένων αποτελούμενη από 2000 φαινοτύπους και 20000 κατανομές MIC (Livermore D.M. et al., 2002). Εφαρμόζοντας την αρχή της «ερμηνευτικής ανάγνωσης» (*interpretive reading*), έννοια την οποία εισήγαγαν οι Courvalin και Livermore, αναλύει profiles ευαισθησίας για ομάδες αντιβιοτικών και όχι ευαισθησίες μεμονωμένων αντιβιοτικών. Με την προσέγγιση αυτή αναγνωρίζεται, σε πολύ υψηλά ποσοστά, ο υποκείμενος μηχανισμός αντοχής (Livermore D.M. et al., 2002; Barry J. et al., 2003).

Υπάρχει εκτενής βιβλιογραφία σχετικά με την ακρίβεια του συστήματος Vitek 2.

Σύμφωνα με τα ευρήματά των Felten et al, 5 στελέχη τα οποία έφεραν το γονίδιο *mecA* χαρακτηρίστηκαν από το σύστημα Vitek 2 ως μεθικιλίνη-ευαίσθητα (MSSA).

Οι συγγραφείς ομιλούν επομένως για 97% ευαισθησία και 100% ειδικότητα του συστήματος (Felten A. et al., 2002). Πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι οι *mecA* primers οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν από τους συγγραφείς αυτούς ήταν ίδιοι με τους primers οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στην house PCR της παρούσης εργασίας (Predari S.C. et al., 1991).

Σε μια άλλη μελέτη, οι Sakoulas et al μελέτησαν 310 κλινικά στελέχη *S.aureus* (203 στελέχη MRSA και 107 στελέχη MSSA) και συνέκριναν τα αποτελέσματα του συστήματος με τα αποτελέσματα της PCR. Σύμφωνα με τα ευρήματά τους, ένα *mecA* θετικό στέλεχος χαρακτηρίστηκε από το σύστημα Vitek 2 ως μεθικιλίνη-ευαίσθητο ($MIC \leq 2 \mu\text{g/ml}$) και 3 *mecA* αρνητικά στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως μεθικιλίνη-ανθεκτικά ($MIC \geq 4 \mu\text{g/ml}$). Το σύστημα Vitek 2 επέδειξε επομένως 99.5% ευαισθησία και 97.2 % ειδικότητα (Sakoulas G. et al., 2001).

Σε μια μεγάλη πανευρωπαϊκή μελέτη, οι Livermore et al χρησιμοποιούν τον όρο «βασική συμφωνία» (essential agreement) για τις περιπτώσεις εκείνες όπου το λογισμικό του συστήματος Vitek 2 (AES) προτείνει τον ίδιο μηχανισμό αντοχής με αυτόν που συνάγεται από την μέθοδο αναφοράς (PCR). Οι συγγραφείς κάνουν λόγο για μερική συμφωνία (partial agreement) όταν το AES προτείνει περισσότερους του ενός πιθανούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένου και αυτού που συνάγεται από την μέθοδο αναφοράς. Στην μελέτη αυτή αναλύθηκαν από τα μικροβιολογικά εργαστήρια 10 πανεπιστημιακών νοσοκομείων 225 στελέχη MRSA των οποίων οι υποκείμενοι μηχανισμοί αντοχής είχαν προσδιοριστεί με PCR. Ασυμφωνία (disagreement) μεταξύ AES και PCR παρατηρήθηκε σε 3 *mecA* θετικά στελέχη *S.aureus* (MRSA). Έτσι, στην περίπτωση των MRSA, η βασική συμφωνία ανάμεσα στο AES του συστήματος Vitek 2 και στην PCR υπολογίστηκε σε 99% (Πίνακας 33) (Livermore D.M. et al., 2002).

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας, όπου η ευαισθησία και η ειδικότητα του συστήματος Vitek 2 υπολογίστηκε σε 98.5% και 100% αντίστοιχα, ήταν συμβατά με τα ευρήματα των παραπάνω μελετών.



Πίνακας 33. Ακρίβεια του συστήματος Vitek 2 στην ανίχνευση των MRSA

	Βασική συμφωνία	Ελάσσονα σφάλματα ⁽³⁾	Μείζονα σφάλματα⁽⁴⁾	Μέγιστα σφάλματα ⁽⁵⁾
Livermore et al ⁽¹⁾	- Αντοχή στην μεθικιλίνη: 99 % - ACC(6') + APH(2'') μεσολαβούμενη αντοχή στην γενταμυκίνη: 83 %			
Barry et al ⁽²⁾	- οξακιλλίνη: 96.5 % - γενταμυκίνη: 100 % - κλινδαμυκίνη: 94.4 % - βανκομυκίνη: 100 % - τεϊκοπλανίνη: 91.5 %	0.0 1.4 % 0.7 % 0.0 1.4 %	2.1 % 0.0 2.1 % 0.0 4.2 %	2.1 % 0.0 0.0 0.0 2.8 %

(1) Βασική συμφωνία (essential agreement): το AES προτείνει τον ίδιο μηχανισμό αντοχής με αυτόν που συνάγεται από την μέθοδο αναφοράς (PCR)- Μερική συμφωνία (partial agreement): το AES προτείνει περισσότερους του ενός πιθανούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένου και αυτού που συνάγεται από την μέθοδο αναφοράς.

(2) Βασική συμφωνία: η MIC σύμφωνα με το Vitek 2 και η MIC σύμφωνα με την μέθοδο αναφοράς (μέθοδος των αραιώσεων σε άγαρ) διαφέρουν κατά μία αραιώση (+/- 1log₂).

(3) Έλασσον σφάλμα (minor error): ένα στέλεχος χαρακτηρίζεται ως ενδιάμεσης ευαισθησίας με την μέθοδο αναφοράς ενώ με το Vitek 2 χαρακτηρίζεται είτε ως ευαίσθητο είτε ως ανθεκτικό-και αντιστρόφως.

(4) Μείζον σφάλμα (major error): ένα στέλεχος χαρακτηρίζεται ως ευαίσθητο με την μέθοδο αναφοράς ενώ με το Vitek 2 χαρακτηρίζεται ως ανθεκτικό

(5) Μέγιστο σφάλμα (very major error): ένα στέλεχος χαρακτηρίζεται ως ανθεκτικό με την μέθοδο αναφοράς ενώ με το Vitek 2 χαρακτηρίζεται ως ευαίσθητο.

(6) Σαν μέθοδος αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των αραιώσεων σε άγαρ.

Και στην περίπτωση των εντεροκόκκων οι φαινοτυπικές μέθοδοι παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα.

Ένα από τα μειονεκτήματα πηγάζει από το γεγονός ότι είναι απαραίτητη η χρήση ειδικών τεχνικών στο κλινικό εργαστήριο προκειμένου να διαπιστώσουμε την πραγματική ευαισθησία τους. Για παράδειγμα, οι συνήθεις μέθοδοι προσδιορισμού της ευαισθησίας δεν είναι σε θέση να προβλέψουν την ύπαρξη αντοχής στην συνεργική δράση πενικιλίνης-αμινογλυκοσιδών. Αντιθέτως, το εργαστήριο πρέπει να ελέγξει για υψηλού βαθμού αντοχή στις αμινογλυκοσίδες ή να ελέγξει την *in vitro* αντοχή του μικροοργανισμού σε συνδυασμούς αντιβιοτικών με μεθόδους που χρησιμοποιούν καμπύλες χρόνου-θανάτωσης (time-kill curves). Ομοίως, οι συνήθεις τεχνικές αποτυγχάνουν να αποκαλύψουν την αντοχή στην πενικιλίνη ή στην αμπικιλίνη πολλών λακταμασοπαραγωγών στελεχών.

Ένα άλλο «εγγενές» πρόβλημα των φαινοτυπικών μεθόδων επισημαίνεται από τον Courvalin: όπως φαίνεται από την μελέτη του πίνακα 34, η ανευρισκόμενη MIC ενός VRE στελέχους είναι δυνατόν να έχει τιμή τέτοια που να κατατάσσει το στέλεχος ως ευαίσθητο σύμφωνα με τα κριτήρια της NCCLS (Courvalin P., 2002). Αυτός είναι και ένας από τους λόγους για τους οποίους συχνά είμαστε υποχρεωμένοι να καταφύγουμε στις μοριακές μεθόδους για την ανίχνευση των VRE. Δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι έχει περιγραφεί στέλεχος *E.faecium* το οποίο έφερε και το VanA και το VanB γονίδιο (στέλεχος 3363-1) όπως επίσης και κάποια σπάνια στελέχη *E.gallinarum* τα οποία φέρουν εκτός από το Van C1 γονίδιο και το VanA ή το VanB γονίδιο (Carreira Merquior V.L. et al., 2008; Mammìna C. et al., 2005). Είναι προφανές ότι οι φαινοτυπικές μέθοδοι αδυνατούν να διακρίνουν τους γονότυπους των στελεχών αυτών.



Πίνακας 34. Ανευρισκόμενες MIC στους διάφορους γονότυπους GRE

	Γονότυπος GRE					
	VanA	VanB	Van C1, C2 / C3	VanD	VanE	VanG
Vancomycin MIC	64 - >1000 μg / ml	4* - 1024 μg / ml	2* - 32 μg / ml	64 - 128 μg / ml	16 μg / ml	8-16 μg / ml
Teicoplanin MIC	16 - 512 μg / ml	≤ 0.5-1 μg / ml	≤ 0.5-1 μg / ml	4 - 64 μg / ml	0.5 μg / ml	0.5 μg / ml

GRE=Glycopeptide resistant Enterococci

*Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τιμή MIC η οποία χαρακτηρίζει το στέλεχος ως ευαίσθητο σύμφωνα με τα κριτήρια της NCCLS.

Στο πρωτόκολλο της house PCR για τους εντεροκόκκους, οι Poulsen et al συνέκριναν τις αλληλουχίες των επιλεγέντων primers με τις αλληλουχίες της βάσης δεδομένων GenBank με την βοήθεια του GCG Wiskonsin Package software (Genetics Computer Group, Wiskonsin, USA). Με τον τρόπο αυτό μεγιστοποίησαν την ειδικότητα και αποτελεσματικότητα των primers (Poulsen R.L. et al., 1999).

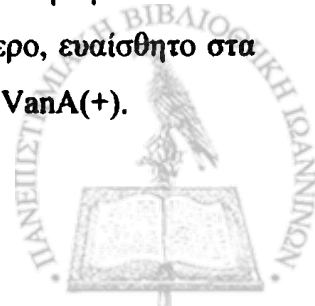
Οι Eigner et al αξιολογούν την ικανότητα της εμπορικής μεθόδου GENOTYPE® Enterococcus kit να ανιχνεύει τα van γονίδια αντοχής συγκρίνοντας την με κάποια κλασσικά πρωτόκολλα PCR. Στα πρωτόκολλα αυτά συμπεριλαμβάνεται και αυτό της house PCR που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Σύμφωνα με τα ευρήματά τους, η μέθοδος ταυτοποίησε ορθά όλα τα van γονίδια αντοχής στα γλυκοπεπτίδια (VanA, VanB, VanC₁, VanC₂) (Eigner U. et al., 2005). Οι συγγραφείς επισημαίνουν το γεγονός ότι με τις φαινοτυπικές μεθόδους μπορεί να μην αναγνωριστούν κάποιοι γονότυποι αντοχής σε περιπτώσεις στελεχών ευαίσθητων τόσο στην βανκομυκίνη όσο και στην τεϊκοπλανίνη (ειδικά οι VanB και VanC φαινότυποι). Αντίθετα, οι μοριακές μέθοδοι δεν εξαρτώνται από την φαινοτυπική έκφραση της αντοχής (Eigner U. et al., 2005).

Σε άλλη μελέτη, οι Dubos et al συγκρίνουν την μέθοδο GENOTYPE[®] Enterococcus kit με μια κλασσική PCR η οποία χρησιμοποιεί ίδιους primers με αυτούς που χρησιμοποιήθηκαν και στην δική μας house PCR (Dutka-Malen S. et al., 1995). Σύμφωνα με τα ευρήματά τους, τόσο η ευαισθησία όσο και η ειδικότητά της υπολογίστηκαν σε 100% (Dubos M.O. et al., 2004).

Στην μελέτη των Livermore et al την οποία προαναφέραμε, αναλύθηκαν και 177 GRE στελέχη των οποίων οι υποκείμενοι μηχανισμοί αντοχής είχαν προσδιοριστεί με PCR. Ασυμφωνία (disagreement) μεταξύ AES και PCR παρατηρήθηκε σε 1 VanA (+) στέλεχος *Enterococcus* spp. Έτσι, και στην περίπτωση των GRE, η βασική συμφωνία ανάμεσα στο AES του συστήματος Vitek 2 και στην PCR υπολογίστηκε σε 99% (Livermore D.M. et al., 2002).

Οι Abele-Horn et al εκτιμούν την ευαισθησία του λογισμικού (AES Version 4.01) του συστήματος Vitek 2 στην ανίχνευση και ταξινόμηση των GRE σε επίπεδο γονοτύπου. Η εκτίμηση του συστήματος έγινε με μέθοδο αναφοράς την PCR. Οι συγγραφείς ορίζουν ως ευαισθησία του συστήματος την ικανότητά του να διαχωρίζει ορθά τα GRE στελέχη από τα στελέχη εκείνα τα οποία δεν φέρουν γονίδια αντοχής (VanA, VanB, VanC). Οι ίδιοι συγγραφείς χρησιμοποιούν και τους όρους «βασική συμφωνία», «μείζον σφάλμα», «μέγιστο σφάλμα» και «έλασσον σφάλμα». Ομιλούν για βασική συμφωνία όταν η MIC σύμφωνα με το Vitek 2 και η MIC σύμφωνα με την μέθοδο αναφοράς διαφέρουν κατά μία αραιώση ($\pm 1 \log_2$). Σαν μέθοδος αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των μικροαραιώσεων σε ζωμό (broth microdilution). Από τα 121 στελέχη *Enterococcus* spp. τα οποία μελετήθηκαν συνολικά, τα 119 ταξινομήθηκαν ορθώς από το λογισμικό του συστήματος (συνολική ευαισθησία του συστήματος: 98.3%). Αναλυτικότερα, το σύστημα Vitek 2 ταξινόμησε ορθά όλα τα *E.faecium* vanB, *E.gallinarum* και *E.casseliflavus* ως vanB, VanC1 και VanC2 αντίστοιχα, ενώ ταξινόμησε ορθά το 98.5 % των στελεχών *E. faecium* vanA ως vanA. Ένα VanA(+) στέλεχος *E. faecium* χαρακτηρίστηκε λανθασμένα ως VanB. Η MIC του στελέχους αυτού στην βανκομυκίνη βρέθηκε 32 $\mu\text{g/ml}$ τόσο με το σύστημα Vitek 2 όσο και με την μέθοδο των αραιώσεων σε άγαρ.

Αντίθετα, η MIC του στην τεϊκοπλανίνη βρέθηκε 4 $\mu\text{g/ml}$ με την μέθοδο των αραιώσεων σε άγαρ και 1 $\mu\text{g/ml}$ με το σύστημα Vitek 2. Ένα δεύτερο, ευαίσθητο στα γλυκοπεπτίδια στέλεχος *E.faecium* χαρακτηρίστηκε λανθασμένα ως VanA(+).



Τα αποτελέσματα της PCR ήταν αρνητικά για γονίδια VanA, VanB, VanC. Η MIC του στελέχους αυτού στην βανκομυκίνη βρέθηκε 16 µg/ml τόσο με το σύστημα Vitek 2 όσο και με την μέθοδο των αραιώσεων σε άγαρ. Η ευαισθησία του συστήματος Vitek 2 (κάρτα P534) στον προσδιορισμό της MIC της βανκομυκίνης υπολογίστηκε σε 100 % για τα VanA και VanC2 στελέχη, ενώ για τα VanB και VanC1 στελέχη υπολογίστηκε σε 85.7 και 86.7 % αντίστοιχα. Η ευαισθησία στον προσδιορισμό της MIC της τεϊκοπλανίνης ήταν 100 % για τα VanC1 και VanC2, ενώ για τα VanA και VanB ήταν 97 και 85.7 % αντίστοιχα (Πίνακας 36).

Τα αποτελέσματα όλων των παραπάνω εργασιών είναι απολύτως συμβατά με τα δικά μας.

Πίνακας 35. Ακρίβεια του Vitek 2 στην ανίχνευση των GRE

	Βασική συμφωνία	Ελάσσονα σφάλματα	Μείζονα Σφάλματα	Μέγιστα Σφάλματα
Livermore et al	- ACC(6') + APH(2'') μεσολαβούμενη αντοχή στην γενταμυκίνη: 95% - Αντοχή στα γλυκοπεπτίδια: 99%			
Barry et al	- αμπικιλίνη: 100 % - βανκομυκίνη: 97.8 % - τεϊκοπλανίνη: 93.3 % - γενταμυκίνη HL: 100 %	0.0 0.0 0.0 0.0	0.0 2.2 % 0.0 0.0	0.0 0.0 2.2 % 0.0
Van Den Braak ⁽⁶⁾	<u>βανκομυκίνη</u> VanA: 100 % VanB: 93 % VanC1: 88 % VanC2: 93 % GSE*: 100 %	VanA: 0.0 VanB: 1 % VanC1: 5.6 % VanC2: 4.1% GSE: 0.5%	0.0 0.0 0.0 0.0 0.0	0.0 0.0 0.0 0.0 0.0
	<u>Τεϊκοπλανίνη</u>	VanA: 6 % VanB: 0.0 VanC1: 0.0 VanC2: 0.0 GSE: 0.0	0.0 0.0 0.0 0.0 0.0	10 % 0.0 0.0 0.0 0.0

*GSE= Glycopeptide-resistant Enterococci

	Βασική συμφωνία	Ελάσσονα σφάλματα	Μείζονα Σφάλματα	Μέγιστα Σφάλματα
Abele-Horn et al	- βανκομυκίνη: 94.2 % - τεϊκοπλανίνη: 95.9 % - linezolid: 97.5 % - quinupristin-dalfopristin: 100 % - moxifloxacin: 100 %	5 % 9 % 5 % 5 % 5 %		



Η στατιστική ανάλυση των ποσοστών αντοχής στα αντιβιοτικά μεταξύ MRSA και MSSA έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο αυτών ομάδων. Οι διαφορές αυτές ερμηνεύονται από το γεγονός ότι, οι γονιδιακές νησίδες SCCmec τύπου II και III περιέχουν, εκτός από το mecA γονίδιο, και γονίδια αντοχής για άλλα αντιβιοτικά, όπως οι αμινογλυκοσίδες, οι λινκοσαμίδες, οι στρεπτογραμίνες, οι κινολόνες, το φουσιδικό οξύ και η κοτριμοξαζόλη (Naimi T.S. et al., 2003).

Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν και μεταξύ GRE και GSE όσον αφορά τα ποσοστά αντοχής στην αμπικιλίνη και στην γενταμυκίνη (HLR).

Τα ποσοστά των MRSA, όπως προκύπτουν από την οκταετή μελέτη μας και αφορούν το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων (Π.Ν.Ι.), είναι παρόμοια με αυτά που έχουν καταγραφεί από άλλα Νοσοκομεία της χώρας (www.mednet.gr/whonet) Τα ποσοστά αντοχής στα υπόλοιπα αντιβιοτικά κυμαίνονται περίπου στα ίδια επίπεδα με αυτά των άλλων Νοσοκομείων (www.mednet.gr/whonet).

Σε μια πολυκεντρική μελέτη (SENTRY), η οποία διήρκησε από τον Ιανουάριο του 1999 έως τον Δεκέμβριο του 2002, με την συμμετοχή 495 νοσοκομείων από 26 χώρες, κατεγράφησαν τα ακόλουθα ποσοστά MRSA σε διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες (Πίνακας 37) (Tiemersma E.W. et al., 2004).

Πίνακας 36. Ποσοστά των MRSA σε διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες

Χώρα	Αριθμός Νοσοκομείων	Αριθμός στελεχών	MRSA (%)
Αυστρία	11	656	8.8 %
Βέλγιο	36	2953	23.6 %
Δανία	22	2406	0.6 %
Φινλανδία	17	1990	1 %
Γαλλία	24	3376	33.1 %
Γερμανία	25	3757	13.8 %
Ιρλανδία	19	2897	41.2 %
Ηνωμένο Βασίλειο	27	5343	41.5 %
Σουηδία	54	6071	0.8 %
Ισπανία	35	2985	24.8 %
Πορτογαλία	15	1540	34.7 %
Ιταλία	57	3593	40.9 %
Ισραήλ	5	849	38.4 %
Μάλτα	1	240	43.8 %
Ελλάς*	19	1126	44.4 %

* περίοδος συμμετοχής: Ιανουάριος 1999 έως Δεκέμβριος 2001 και Ιουλίου 2002 έως Δεκέμβριος 2002

Σύμφωνα και με τα νεώτερα δεδομένα του 2007 που αφορούν την Ευρώπη, παρουσιάζονται παρόμοια ποσοστά MRSA ανά χώρα. Τα χαμηλότερα ποσοστά εξακολουθούν να καταγράφονται στις Σκανδιναυικές χώρες και στην Ολλανδία (0.6-2 %) ενώ τα υψηλότερα στην Ελλάδα και στην Πορτογαλία (35-48%) (EARSS Annual Report 2007 / European Antibiotic Resistance Surveillance System).

Οι Borg et al., καταγράφοντας τα ποσοστά των MRSA σε διάφορες μεσογειακές χώρες, δίνουν αποτελέσματα (μέση τιμή 39%) παρόμοια με της μελέτης μας, με τα υψηλότερα ποσοστά να παρατηρούνται στην Κύπρο, στην Μάλτα και στην Αίγυπτο (> 50%) (Borg M.A. et al., 2007).



Όσον αφορά τα ποσοστά των GRE στην Ελλάδα, το σύστημα επιτήρησης EARSS καταγράφει τα ακόλουθα ποσοστά ανά έτος (www.rivm.nl/earss/database) (Πίνακας 38)

Πίνακας 37. Ετήσια ποσοστά των GRE στην Ελλάδα (στοιχεία EARSS)

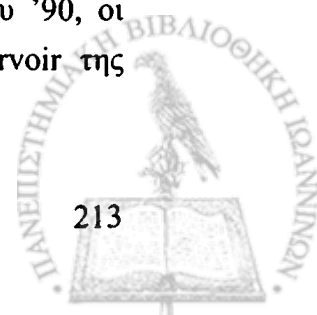
Έτος	Δεδομένα EARSS		Ευρήματα μελέτης μας	
	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>
2000	1 %	1 %	1 %	3 %
2001	7 %	15 %	3 %	8 %
2002	13 %	19 %	1 %	22 %
2003	7 %	18 %	0 %	17 %
2004	4 %	20 %	0 %	14 %
2005	4 %	37 %	0 %	6 %
2006	5 %	42 %	0 %	30 %
2007	7 %	37 %	2 %	36 %
2008	4.6 %	28.2 %	0.3 %	20 %

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, από την μελέτη μας προκύπτει ότι τα ποσοστά των GRE στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων είναι χαμηλότερα σε σχέση με τα ποσοστά τα οποία καταγράφονται στα Νοσοκομεία της υπόλοιπης Ελλάδας.

Ο χαμηλότερος επιπολασμός των GRE στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων πιθανότατα σχετίζεται με την ταχύτερη αναγνώριση και στην συνέχεια αυστηρότερη εφαρμογή πρακτικών πρόληψης και αντιμετώπισης επιδημιών.

Τα στοιχεία του συστήματος EARSS για το 2007 για την Ευρώπη καταγράφουν τα χαμηλότερα ποσοστά VR-*E.faecium* στις Σκανδιναβικές χώρες (0-1 %) και τα υψηλότερα στην Ελλάδα (37 %), στην Ιρλανδία (33 %) και στην Πορτογαλία (29 %).

Οι λόγοι για τον χαμηλότερο επιπολασμό των GRE στην Βόρεια Ευρώπη δεν είναι επακριβώς γνωστοί. Αναμφίβολα, κύρια συμβολή έχει η ορθολογικότερη χρήση των αντιβιοτικών στις χώρες αυτές. Η ορθολογική αυτή χρήση δεν αφορά μόνο τους ανθρώπους αλλά κυρίως την ζωϊκή παραγωγή. Έχοντας απαγορεύσει την χρήση των γλυκοπεπτιδίων στην ζωϊκή παραγωγή ήδη από τα μέσα της δεκαετίας του '90, οι χώρες αυτές κατάφεραν να περιορίσουν σημαντικά αυτό το μεγάλο reservoir της κοινότητας.



Η ύπαρξη αυτού του *reservoir* συνδέθηκε κυρίως με την ευρεία χρήση *anoragcin* στην ζωϊκή παραγωγή. Η *anoragcin* προσδίδει διασταυρούμενη αντοχή στην βανκομυκίνη και η χρήση της συνδέθηκε με υψηλά ποσοστά απομόνωσης VRE στα κόπρανα των ζώων καθώς και σε κρέατα.

Επακολούθως, οι VRE μπορούσαν να αποικίσουν υγιή άτομα μέσω της τροφικής αλυσίδας, είτε με άμεση επαφή είτε τρώγοντας μολυσμένα τρόφιμα. Η αιτιολογική σχέση μεταξύ ζωϊκού *reservoir* και αποικισμού σε ανθρώπους δεν έχει αποδειχθεί οριστικά. Παρ'όλα αυτά, οι ενδείξεις υπέρ της ύπαρξης μιάς τέτοιας σχέσης είναι πολλές.

Άλλοι παράγοντες με σημαντική συμβολή προς την κατεύθυνση αυτή είναι η αυστηρότερη τήρηση των κανόνων υγιεινής στον χώρο των νοσοκομείων, τα αποτελεσματικότερα συστήματα επιτήρησης (*surveillance*), η ταχύτερη ταυτοποίηση και αναγνώριση των στελεχών αυτών και η αυστηρότερη εφαρμογή πρακτικών πρόληψης και αντιμετώπισης επιδημιών.

Συμπερασματικά, η χρήση των κλασικών μεθόδων για τον έλεγχο της ευαισθησίας των *S.aureus* στην μεθικιλίνη και των *Enterococcus spp* στα γλυκοπεπτίδια απεδείχθη προβληματική.

Αντίθετα, οι μοριακές τεχνικές χαρακτηρίζονται πλέον ως η μέθοδος εκλογής για την ανίχνευση των υπεύθυνων γονιδίων αντοχής (*mecA* και *van* γονίδια αντίστοιχα), γιατί είναι ταχείες, έχουν υψηλή ευαισθησία και άριστη ειδικότητα.

Τέλος, ο κλινικός γιατρός μπορεί να γνωρίζει ότι ο εργαστηριακός γιατρός διαθέτει και αξιοποιεί ευαίσθητες μεθόδους Μοριακής Μικροβιολογίας για τη διερεύνηση αντοχής κλινικών στελεχών *S. aureus* και *Enterococcus spp.* στα αντιβιοτικά.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της αντοχής κλινικών στελεχών *Staphylococcus aureus* και *Enterococcus* spp. στα αντιβιοτικά.

Αρχικά, μελετήθηκε η αντοχή σε διάφορα αντιβιοτικά με τη χρήση κλασικών μικροβιολογικών μεθόδων και ειδικότερα με τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (minimal inhibiting concentration – MIC). Επιπλέον, για την ανίχνευση του *mecA* γονιδίου, του υπεύθυνου για την αντοχή του *S. aureus* στα β-λακταμικά αντιβιοτικά και των *van* γονιδίων, υπεύθυνων για την αντοχή των *Enterococcus* spp. στα γλυκοπεπτίδια, εφαρμόστηκαν δύο μοριακές τεχνικές : μια multiplex PCR και ένας συνδυασμός PCR-ανάστροφου υβριδισμού (Genotype MRSA, Genotype VRE, Hain Lifescience).

Μελετήθηκε η αντοχή στα αντιβιοτικά στελεχών *Staphylococcus aureus* και *Enterococcus* spp., τα οποία απομονώθηκαν από καλλιέργειες διαφόρων κλινικών δειγμάτων ασθενών, οι οποίοι νοσηλεύθηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων (Π.Γ.Ν.Ι.) κατά τη χρονική περίοδο 2000-2008. Μελετήθηκαν συνολικά 2.771 στελέχη *S. aureus* και 2.317 στελέχη *Enterococcus* spp. Σε όλα τα στελέχη, τόσο για την ταυτοποίησή τους, όσο και για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά, χρησιμοποιήθηκε αρχικά το σύστημα VITEK II (Biomerieux).

Η αντοχή των στελεχών *S. aureus* στην μεθικιλίνη ελέγχθηκε παράλληλα με τη χρήση δισκίων κεφοξιτίνης των 30 μg. Όσα στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως μεθικιλίνη-ανθεκτικά με τις ανωτέρω μεθόδους, ελέγχθηκαν στη συνέχεια με δύο μοριακές μεθόδους.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η ευαισθησία του συστήματος Vitek II-MIC και της δοκιμασίας των δίσκων κεφοξιτίνης υπολογίστηκε σε 98.5% και 99.6% αντίστοιχα.

Όσα στελέχη *Enterococcus* spp. εμφάνιζαν σχετική ή απόλυτη αντοχή στα γλυκοπεπτίδια σύμφωνα με το σύστημα Vitek II ελέγχθηκαν με δύο μοριακές μεθόδους. Η ευαισθησία του συστήματος Vitek II υπολογίστηκε σε 83.5%.

Η στατιστική ανάλυση των ποσοστών αντοχής στα υπόλοιπα αντιβιοτικά μεταξύ MRSA και MSSA έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο αυτών ομάδων. Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν και μεταξύ GRE και GSE όσον αφορά τα ποσοστά αντοχής στην αμικικιλίνη και στην γενταμυκίνη (HLR).

Συμπερασματικά, η χρήση των κλασικών μικροβιολογικών μεθόδων για την ανίχνευση γονιδίων αντοχής του *S. aureus* στη μεθικιλίνη και του *Enterococcus* spp. στα γλυκοπεπτίδια, απεδείχθη προβληματική, ενώ οι μοριακές τεχνικές αποδείχθηκαν μέθοδοι εκλογής.

SUMMARY

The aim of this doctoral thesis was the investigation of antibiotic resistance of *S.aureus* and *Enterococcus* spp clinical strains.

Initially, we have studied resistance to various antibiotics by the use of classic microbiological methods and more precisely, by the determination of minimal inhibiting concentration (MIC).

Additionally, for the detection of *mecA* gene, mediating resistance of *S.aureus* to β -lactams and *van* genes, mediating resistance of *Enterococcus* spp to glycopeptides, we have applied two molecular techniques: a multiplex PCR and a commercial method combining PCR and reverse hybridization (GenoType MRSA, HAIN- Lifescience).

We have studied antibiotic resistance of *S.aureus* and *Enterococcus* spp strains which were isolated from cultures of various clinical specimens of patients admitted to Ioannina University Hospital during the period 2000-2008.

A total number of 2771 *S.aureus* and 2317 *Enterococcus* spp strains were examined.

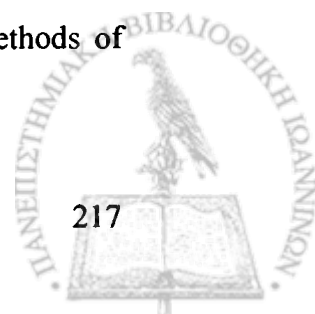
For the identification and susceptibility testing of all these strains we have used the Vitek 2 System (BioMérieux, Marcy l' Etoile, France).

Resistance of *S.aureus* strains to methicillin was also examined by the use of 30 μ g cefoxitin discs. Those strains that were characterized as methicillin-resistant by these two conventional methods, were subsequently examined by the above mentioned two molecular methods. According to our results, sensitivities of the Vitek 2-MIC and cefoxitin disc diffusion test were 98.5 and 99.6 % respectively.

Those *Enterococcus* spp strains appearing to have absolute or relative glycopeptideresistance according to the Vitek 2 System, were subsequently examined by two molecular methods. The sensitivity of the Vitek 2 System was 83.5 %.

Statistical analysis of resistance percentages to other classes of antibiotics between MRSA and MSSA strains has shown statistically significant differences between these two groups. Significant differences were also observed between GRE and GSE strains, regarding resistance percentages to Ampicillin and Gentamicin (HLR).

In conclusion, the use of the conventional microbiological methods for the detection of methicillin resistance in *S.aureus* and glycopeptide resistance in *Enterococcus* spp proved to be problematic, while molecular techniques proved to be the methods of choice.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abele-Horn M., Hommers L., Trabold R., Frosch M. (2006) Validation of VITEK 2 Version 4.01 Software for detection, identification and classification of glycopeptide-resistant *Enterococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 71-76.
2. Adem P.V., Montgomery C.P., Husain A.N., Koogler T.K., Arangelovich V., Humilier M., Boyle-Vavra S., Daum R.S. (2005) *Staphylococcus aureus* sepsis and the Waterhouse-Friderichsen syndrome in children. *The New England Journal of Medicine* 353 (12) : 1245-1251.
3. Akins R.L., Haase K.K. (2005) Gram-positive resistance : pathogens, implications, and treatment options: insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy* 25 (7) : 1001-1010.
4. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002) Transcription elongation produces superhelical tension in DNA. In : *Molecular Biology of the cell, 4th edition*. Garland Science, New York, pp. 313-315.
5. Appelbaum P.C. (2006) MRSA-the tip of the iceberg. *Clinical Microbiology and Infection* 12 (2) : 3-10.
6. Archer G., Niemeyer D. (1994) Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in *staphylococci*. *Trends in Microbiology* 2 (10) : 343.
7. Arias C.A., Courvalin P., Reynolds P.E. (2000) VanC cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (6) : 1660-1666.

8. Arrecubieta C., Matsunaga I., Asai T., Naka Y., Deng M.C., Lowy F.D. (2008) Vaccination with clumping factor A and Fibronectin Binding Protein A to prevent *Staphylococcus aureus* infection of an artichoke patch in mice. *The Journal of Infectious Diseases* 198 : 571-575.
9. Arthur M., Courvalin P. (1993) Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in *Enterococci*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp.1563-1571.
10. Baba T., Takeuchi F., Kuroda M., Yuzawa H., Aoki K., Oguchi A., Nagai Y., Iwama N., Asano K., Naimi T., Kuroda H., Cui L., Yamamoto K., Hiramatsu K. (2002) Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *The Lancet* Vol 359.
11. Bamberg D.M., Boyd S.E. (2005) Management of *Staphylococcus aureus* infections. *American Family Physician*, 72 (12) : 2474-2481.
12. Baptista M., Depardieu F., Reynolds P., Courvalin P., Arthur M. (1997) Mutations leading to increased levels of resistance to glycopeptide antibiotics in VanB-type *enterococci*. *Molecular Microbiology* 25 (1) : 93-105.
13. Barry J., Brown A., Ensor V., Lakhani U., Petts D., Warren C., Winstanley T. (2003) Comparative evaluation of the VITEK 2 Advanced Expert System (AES) in five UK hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51 : 1191-1202.
14. Berger-Bächi B. (1994) Expression of resistance to methicillin. *Trends in Microbiology* 2 (10) : 389.
15. Berger-Bächi B. (1997) Resistance not mediated by β - lactamase (methicillin resistance). In : *The Staphylococci in human disease*. Eds, Crossley K.B., Archer G.L. Churchill Livingstone, New York, pp. 158-167.



16. Berger-Bächi B. (1999) Genetic basis of methicillin resistance in *S. aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56 : 764-770.
17. Berger-Bächi B., Rohrer S. (2002) Factors influencing methicillin resistance in *Staphylococci*. *Archives of Microbiology* 178 : 165-171.
18. Bland M. (2000) Significance tests. In : *An introduction to medical statistics. Third edition*. Oxford University Press, Oxford, pp. 137-148.
19. Bonten M.J.M., Hayden M.K., Nathan C., Van Voorhis J., Matushek M., Slaughter S., Rice T., Weinstein R.A. (1996) Epidemiology of colonisation of patients and environment with vancomycin-resistant *enterococci*. *The Lancet* 348 : 1615-1619.
20. Bonten M.J.M., Slaughter S., Ambergen A.W., Hayden M.K., Van Voorhis J., Nathan C., Weinstein R.A. (1998) The role of colonization pressure in the spread of vancomycin-resistant *enterococci*. *Arch Intern Med*. 158 : 1127-1132.
21. Bonten M.J.M., Williams R., Weinstein R.A. (2001) Vancomycin-resistant *enterococci* : why are they here, and where do they come from. *The Lancet Infectious Diseases* 1 : 314-325.
22. Borg M.A., De Kraker M., Scicluna E., Van de Sande-Bruinsma N., Tiemersma E., Monen J., Grundmann H. on behalf of the ARMed Project members and collaborators (2007) Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in invasive isolates from southern and eastern Mediterranean countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60 : 1310-1315.
23. Boucher H.W., Sakoulas G. (2007) Perspectives on daptomycin resistance, with emphasis on resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases* 45 : 601-608.

24. Boyle-Vavra S., Daum R.S. (2007) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : the role of Pantone-Valentine leucocidin. *Laboratory Investigation* 87 : 3-9.
25. Bradbury J. (2004) "My enemy's enemy is my friend" Using phages to fight bacteria. *The Lancet* 363 : 624-625.
26. Brakstad O., Mæland J. (1997) Mechanisms of methicillin resistance in Staphylococci. *APMIS* 105 : 264-276.
27. Brown D., Edwards D., Hawkey P., Morrison D., Ridgway G., Towner K., Wren M. (2005) Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *S. aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56 : 1000-1018.
28. Brown D.F.J., Edwards D.I., Hawkey P.M., Morrison D., Ridgway G.L., Towner K.J., and Wren M.W.D. on behalf of the Joint Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy, Hospital Infection Society and Infection Control Nurses Association (2005) Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56 : 1000-1018.
29. Bühlmann M., Bögli-Stuber K., Droz S., Mühlemann K. (2008) Rapid screening for carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by PCR and associated costs. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 2151-2154.
30. Carmeli Y., Eliopoulos G.M., Samore M.H. (2002) Antecedent treatment with different antibiotic agents as a risk factor for vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Emerging Infectious Diseases* 8 (8) : 802-807.



31. Carmeli Y., Samore M.H., Huskins W.C. (1999) The association between antecedent vancomycin treatment and hospital-acquired vancomycin-resistant *enterococci*. A meta-analysis. *Arch Intern Med* 1159 : 2461-2468.
32. Carreira Merquior V.L., Gonçalves Neves F.P., Ribeiro R.L., Duarte R.S., De Andrade Marques E., Martins Teixeira L. (2008) Bacteraemia associated with a vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* strain harbouring both the vanA and vanC1 genes. *Journal of Medical Microbiology* 57 : 244-245.
33. Cauwelier B., Gordts B., Descheemaeker P., Van Landuyt H. (2004) Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 µg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 23 : 389-392.
34. Chambers H. (1997) Methicillin resistance in *Staphylococci* : molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews*, pp. 781-791.
35. Chambers H.F. (2001) The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerging Infectious Diseases* 7 (2) : 178-182.
36. Chandy C. J., Schreiber J.R. (2006) Therapies and vaccines for emerging bacterial infections: learning from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pediatric Clinics of North America* 53 : 699-713.
37. Chang S., Sievert D., Hageman J., Boulton M., Tenover F., Downes F.P., Shah S., Rudrik J., Pupp G., Brown W., Cardo D., Fridkin S. (2003) Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance Gene. *The New England Journal of Medicine* 348 : 1342-1347.

38. Charles P.G.P., Ward P.B., Johnson P.D.R., Howden B.P., Grayson M.L. (2004) Clinical features associated with bacteremia due to heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases* 38 : 448-451.
39. Chini V., Petinaki E., Foka A., Paratiras S., Dimitrakopoulos G., Spiliopoulou I. (2006) Spread of *Staphylococcus aureus* clinical isolates carrying Panton-Valentine leukocidin genes during a 3- year period in Greece. *Clinical Microbiology and Infection* 12 (1) : 29-34.
40. Clark N.C., Teixeira L.M., Facklam R.R., Tenover F.C. (1998) Detection and differentiation of vanC-1, vanC-2, and vanC-3 glycopeptide resistance in *Enterococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 2294-2297.
41. Courvalin P. (2002) Identifying resistance in *Enterococci*. *BioMérieux International Newsletter* No 2.
42. Courvalin P. (2006) Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases* 42 : S25-34.
43. Courvalin P. (2006) Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases* 42 : S25-34.
44. Cui L., Tominaga E., Neoh H., Hiramatsu K. (2006) Correlation between reduced daptomycin susceptibility and vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (3) : 1079-1082.
45. Currie B.P., Lemos-Filho L. (2004) Evidence for biliary excretion of vancomycin into stool during intravenous therapy : potential implications for rectal colonization with vancomycin-resistant *enterococci*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 4427-4429.



46. De Lencastre H., De Jonge B., Matthews P., Tomasz A. (1994) Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 33 : 7-24.
47. De Lencastre, H., Tomasz A. (1994) Reassessment of the number of auxiliary genes essential for expression of high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 2590-2598.
48. DeLisle S., Perl T.M. (2003) Vancomycin-resistant *Enterococci*. *Chest* 123 : 504S-518S.
49. Delves P.J., Martin S.J., Burton D.R., Roitt I.M. (2006) DNA vaccines. In : *Roitt's Essential Immunology, eeventh edition*. Blackwell Publishing, pp. 295-297.
50. Depardieu F., Kolbert M., Pruul H., Bell J., Courvalin P. (2004) VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 3892-3904.
51. Deresinski S. (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : an evolutionary, epidemiologic and therapeutic odyssey. *Clinical Infectious Diseases* 40 : 562-573.
52. Deshpande L.M., Fritsche T.R., Moet G.J., Biedenbach D.J., Jones R.N. (2007) Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant *enterococci* from North America and Europe : a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 58 : 163-170.
53. Deurenberg R.H., Vink C., Kalenic S., Friedrich A.W., Bruggeman C.A., Stobberingh E.E. (2007) The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection* 13 : 222-235.

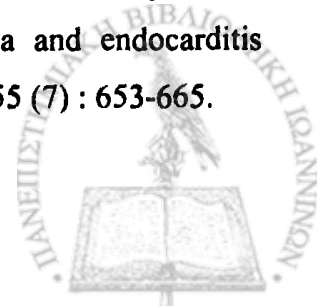


54. Donskey C.J., Chowdhry T.K., Hecker M.T., Hoyer C.K., Hanrahan J.A., Hujer A.M., Hutton-Thomas R.A., Whalen C.C., Bonomo R.A., Rice L.B. (2000) Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant *enterococci* in the stool of colonized patients. *The New England Journal of Medicine* 343 (26) : 1925-1932.
55. Drees M., Boucher H. (2006) New agents for *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Current Opinions in Infectious Diseases* 19 : 544-550.
56. Drew R.H., Perfect J.R., Srinath L., Kurkimilis E., Dowzicky M., Talbot G.H. for the Synercid Emergency-Use Study Group (2000) Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections with quinupristin-dalfopristin in patients intolerant of or failing prior therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46 : 775-784.
57. Dubos M.O., Bourgeois-Nicolaos N., Depardieu F., Courvalin P., Doucet-Populaire F. (2004) Evaluation of the GenoType[®] *Enterococcus* assay for identification of enterococci at the species level and detection of *van* genes. *International Journal of Antimicrobial Agents* 24 (2) : 192.
58. Dutka-Malen S., Evers S., Courvalin P. (1995) Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant Enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33 (5) pp. 24-27.
59. Dutta I., Reynolds P.E. (2002) Biochemical and genetic characterization of the vanC-2 vancomycin resistance gene cluster of *Enterococcus casseliflavus* ATCC 25788. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (10) : 3125-3132.
60. Dutta I., Reynolds P.E. (2003) The vanC-3 vancomycin resistance gene cluster of *Enterococcus flavescens* CCM 439. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51 : 703-706.



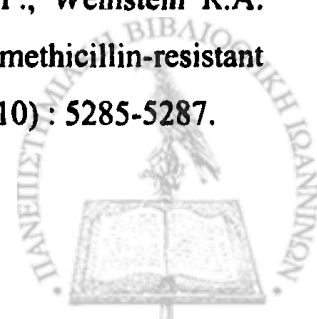
61. Dyke K., Gregory P. (1997) Resistance mediated by β - lactamase. In : *The Staphylococci in human disease*. Eds, Crossley K.B., Archer G.L. Churchill Livingstone, New York, pp. 139-157.
62. Eigner U., Fahr A., Weizenegger M., Witte W. (2005) Evaluation of a new molecular system for simultaneous identification of four *Enterococcus* species and their glycopeptide resistance genotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 2920-2922.
63. Eigner U., Weizenegger M., Fahr A.M., Witte W. (2005) Evaluation of a rapid direct assay for identification of bacteria and the *mecA* and *van* genes from positive-testing blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 5256-5262.
64. Enright M.C., Day N.P.J., Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.G. (2000) Multilocus sequence typing for characterization of Methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (3) : 1008 – 1015.
65. Enright M.C., Robinson D.A., Randle G., Feil E.J., Grundmann H., Spratt B.G. (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PNAS* 99 (11) : 7687- 7692.
66. Felten A., Grandry B., Lagrange P.H., Casin I. (2002) Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) : a disc diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 System, and the MRSA-screen latex agglutination test. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 2766-2771.

67. Fernandes C.J., Fernandes L.A., Collignon P. on behalf of the Australian Group on Antimicrobial Resistance (AGAR) (2005) Cefoxitin resistance as a surrogate marker for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55 : 506-510.
68. Fines M., Perichon B., Reynolds P., Sahm D.F., Courvalin P. (1999) VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43 (9) : 2161–2164.
69. Firth N., Skurray R.A. (2006) *Staphylococci*. Genetics : accessory elements and genetic exchange. In : *Gram positive pathogens*. Eds, Fischetti V., Novick R.P., Feretti J.J., Portnoy D.A., Rood J.I. ASM Press, pp. 413-423.
70. Fluit A.C., Wielders C.L.C., Verhoef J., Schmitz F.J. (2001) Epidemiology and susceptibility of 3,051 *Staphylococcus aureus* isolates from 25 University Hospitals participating in the European SENTRY Study. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 3727- 3732.
71. Forum : Bradley J.S., Guidos R., Baragona S., Bartlett J.G. (2007) Anti-infective research and development-problems, challenges, and solutions. *The Lancet Infectious Diseases* 7 : 68-78.
72. Foster T.J. (2002) *Staphylococcus aureus*. In : *Molecular Medical Microbiology*. Ed, M. Sussman. Academic Press, pp. 841-846.
73. Fowler V.G. Jr., Boucher H.W., Corey G.R., Abrutyn E., Karchmer A.W., Rupp M.E., Levine D.P., Chambers H.F., Tally F.P., Vigliani G.A., Cabell C.H., Link A.S., DeMeyer I., Filler S.G., Zervos M., Cook P., Parsonnet J., Bernstein J.M., Price C.S., Forrest G.N., Fätkenheuer G., Gareca M., Rehm S.J., Brodt H.R., Tice A., Cosgrove S.E., for the *S. aureus* Endocarditis and Bacteremia Study Group (2006) Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *S.aureus*. *The New England Journal of Medicine* 355 (7) : 653-665.



74. Friedman L., Alder J.D., Silverman J.A. (2006) Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to Daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 2137-2145.
75. Gaudreau M.C., Lacasse P., Talbot B.G. (2007) Protective immune responses to a multi-gene DNA vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*, 25 (5) : 814-824.
76. Geha D.J., Uhl J.R., Gustaferra C.A., Persing D.H. (1994) Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant *Staphylococci* in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 1768-1772.
77. Genestier A.L., Michallet M.C., Prévost G., Bellot G., Chalabreusse L., Peyrol S., Thivolet F., Etienne J., Lina G., Vallette F.M., Vandenesch F., Genestier L. (2005) *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation* 115 (11) : 3117-3127.
78. Gikas A., Christidou A., Scoulika E., Nikolaidis P., Skoutelis A., Levidiotou S., Kartali S., Maltezos E., Metalidis S., Kioumis J., Haliotis G., Dima S., Roumbelaki M., Papageorgiou N., Kritsotakis E., Tselentis Y. (2005) Epidemiology and molecular analysis of intestinal colonization by vancomycin-resistant *Enterococci* in Greek hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*, pp.5796-5799.
79. Gold H.S. (2001) Vancomycin-resistant *Enterococci* : mechanisms and clinical observations. *Clinical Infectious Diseases* 33 : 210-219.
80. Gonzales R.D., Schreckenberger P.C., Graham M.B., Kelkar S., DenBesten K., Quinn J.P. (2001) Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *The Lancet* 357 : 1179.

81. González-Zorn B., Courvalin P. (2003) VanA-mediated high level glycopeptide resistance in MRSA. *The Lancet Infectious Diseases* 3 : 67-68.
82. Gordon R., Lowy F.D. (2008) Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical Infectious Diseases* 46 (5) : S350-359.
83. Grayson M.L. (2006) The treatment triangle for staphylococcal infections. *The New England Journal of Medicine*, p.p. 724-727.
84. Grundmann H., Aires-de-Sousa M., Boyce J., Tiemersma E. (2006) Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *The Lancet* 368 : 874-885.
85. Guardabassi L., Christensen H., Hasman H., Dalsgaard A. (2004) Members of the genera *Paenibacillus* and *Rhodococcus* harbor genes homologous to enterococcal glycopeptide resistance genes vanA and vanB. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (12) : 4915-4918.
86. Hackbarth C., Chambers H. (1993) *blaI* and *blaR1* regulate β -lactamase and PBP2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 1144-1149.
87. Hancock L.E., Gilmore M.S. (2006) Pathogenicity of *Enterococci*. In : *Gram positive pathogens*. Eds, Fischetti V., Novick R.P., Feretti J.J., Portnoy D.A., Rood J.I. ASM Press, pp. 299-306.
88. Hancock R.E.W. (2005) Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *The Lancet Infectious Diseases* 5 : 209-218.
89. Hayden M.K., Rezai K., Hayes R.A., Lolans K., Quinn J.P., Weinstein R.A. (2005) Development of Daptomycin resistance in vivo in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (10) : 5285-5287.



90. Hidayat L.K., Hsu D.I., Quist R., Shriner K.A., Wong-Beringer A. (2006) High-dose vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Archives of Internal Medicine* 166 : 2138-2144.
91. Hiramatsu K. (1995) Molecular evolution of MRSA. *Microbiology & Immunology* 39 (8) : 531-543.
92. Hiramatsu K. (2001) Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* : a new model of antibiotic resistance. *The Lancet Infectious Diseases* 1 : 147-155.
93. Hiramatsu K., Cui L., Kuroda M., Ito T. (2001) The emergence and evolution of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology* 9 (10).
94. Hiramatsu K., Katayama H., Yuzawa H., Ito T. (2002) Molecular genetics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology* 292 : 67-74.
95. Hiramatsu K., Okuma K., Ma X.X., Yamamoto M., Hori S., Kapi M. (2002) New trends in *Staphylococcus aureus* infections : glycopeptide resistance in hospital and methicillin resistance in the community. *Current Opinion in Infectious Diseases* 15 : 407-413.
96. Hiramatsu K., Cui L., Kuwahara-Arai K. (2004) Has vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* started going it alone? *The Lancet* 364 : 565-566.
97. Holfelder M., Eigner U., Turnwald A.M., Witte W., Weizenegger M., Fahr A.M. (2006) Direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in clinical specimens by a nucleic acid-based hybridization assay. *Clinical Microbiology and Infection* 12 (12) : 1163-1167.

98. Howden B.P., Charles P.G.P., Johnson P.D.R., Ward P.B., Grayson M.L. (2005) Improved outcomes with linezolid for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: better drug or reduced vancomycin susceptibility? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 4816-4817.
99. Hsu C.T., Ganong A.L., Reinap B., Mourelatos Z., Huebner J., Wang J.Y. (2006) Immunochemical characterization of polysaccharide antigens from six clinical strains of *Enterococci*. *BMC Microbiology* 6 : 62, pp. 1-9.
100. Huycke M.M., Sahm D.F., Gilmore M.S. (1998) Multiple-drug resistant *Enterococci* : the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerging Infectious Diseases* 4 (2) : 239-249.
101. Ito T., Ma X.X., Takeuchi F., Okuma K., Yuzawa H., Hiramatsu K. (2004) Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase *ccrC*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 2637-2651.
102. Ito T., Okuma K., Ma X., Yuzawa H., Hiramatsu K. (2003) Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resistance Updates* 6 : 41-52.
103. Jansen W.T.M., Beitsma M.M., Koeman C.J., Van Wamel W.J.B., Verhoef J., Fluit A.C. (2006) Novel mobile variants of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 2072-2078.
104. Jones R.N. (2006) Microbiological features of vancomycin in the 21st century : minimum inhibiting concentration creep, bactericidal/static activity, and applied breakpoints to predict clinical outcomes or detect resistant strains. *Clinical Infectious Diseases* 42 : S13-24.



105. Josefson E., Hartford O., O'Brien L., Patti J.M., Foster T. (2001) Protection against experimental *Staphylococcus aureus* arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant. *The Journal of Infectious Diseases* 184 : 1572-1580.
106. Kantzanou M., Tassios P.T., Tseleni-Kotsovili A., Maniatis A.N., Vatopoulos A.C., Legakis N.J., the Greek MRSA Study group (1999) A multi-centre study of nosocomial methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Greece. *International Journal of Antimicrobial Agents* 12 : 115-119.
107. Kariyama R., Mitsuhashi R., Chow J.W., Clewell D.B., Kumon H. (2000) Simple and reliable PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant *Enterococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 3092-3095.
108. Kauffman C.A. (2003) Therapeutic and preventative options for the management of vancomycin-resistant enterococcal infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51 : S3 (iii23-iii30).
109. Klare I., Werner G., Witte W. (2001) *Enterococci*. Habitats, infections, virulence factors, resistances to antibiotics, transfer of resistance determinants. In : *Contributions to Microbiology, Vol. 8*. Eds, Mühlendorfer I., Schäfer K.P., Karger, pp. 108-122.
110. Koch S., Hufnagel M., Huebner J. (2004) Treatment and prevention of enterococcal infections-alternative and experimental approaches. *Expert Opinion on Biological Therapy* 4 (9) : 1519-1531.
111. Koch S., Hufnagel M., Theilacker C., Huebner J. (2004) Enterococcal infections : host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 22 : 822-830.
112. Kucers A., Crowe S., Gayson M.L., Hoy J. (1997) Vancomycin In : *The use of antibiotics, fifth edition*. Eds Butterworth-Heinemann, Oxford, pp. 763-790



113. Kuklin N.A., Clark D.J., Secore S., Cook J., Cope L.D., McNeely T., Noble L., Brown M.J., Zorman J.K., Wang X.M., Pancari G., Fan H., Isett K., Burgess B., Bryan J., Brownlow M., George H., Meinz M., Liddell M.E., Kelly R., Schultz L., Montgomery D., Onishi J., Losada M., Martin M., Ebert T., Tan C.Y., Schofield T.L., Nagy E., Meineke A., Joyce J.G., Kurtz M.B., Caulfield M.J., Jansen K.U., McClements W., Anderson A.S. (2006) A novel *Staphylococcus aureus* vaccine : Iron Surface Determinant B induces rapid antibody responses in Rhesus macaques and specific increased survival in a murine *S. aureus* sepsis model. *Infection and Immunity*, pp. 2215-2223.
114. Kuroda M., Ohta T., Uchiyama I., Baba T., Yuzawa H., Kobayashi I., Cui L., Oguchi A., Aoki K., Nagai Y., Lian J.O., Ito T., Kanamori M., Matsumaru H., Maruyama A., Murakami H., Hosoyama A., Mizutani-Ui Y., Takahashi N.K., Sawano T., Inoue R., Kaito C., Sekimizu K., Hirakawa H., Kuhara S., Goto S., Yabuzaki J., Kanehisa M., Yamashita A., Oshima K., Furuya K., Yoshino C., Shiba T., Hattori M., Ogasawara N., Hayashi H., Hiramatsu K. (2001) Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet* Vol 357.
115. Kuwahara-Arai K., Kondo N., Hori S., Tateda-Suzuki E. (1996) Suppression of methicillin resistance in a *mecA*-containing pre-methicillin resistant *S.aureus* strain is caused by the *mecI*-mediated repression of PBP2' production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 2680-2685.
116. Levy S.B. Editorial (1998) Multidrug Resistance-A Sign of the Times. *The New England Journal of Medicine* 338 : 1376-1378.
117. Lewin B. (1997) Gyrase introduces negative supercoils in DNA . In : *Genes VI*, 6th edition. Oxford University Press, Oxford, pp. 553-554.



118. Lewis J.S. 2nd, Owens A., Cadena J., Sabol K., Patterson J.E., Jorgensen J.H. (2005) Emergence of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (4) : 1664-1665. *Erratum* : 2005 May; 49 (5) : 2152.
119. Ligozzi M., Pittaluga F., Fontana R. (1996) Modification of penicillin-binding protein 5 associated with high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 354-357.
120. Lina G., Piémont Y., Godail-Gamot F., Bes M., Peter M.O., Gauduchon V., Vandenesch F., Etienne J. (1999) Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clinical Infectious Diseases* 29 : 1128-1132.
121. Liu C., Chambers H. (2003) *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin : epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 3040-3045.
122. Livermore D. Antibiotic resistance in staphylococci (2000) *International Journal of Antimicrobial Agents* 16 : S3-S10.
123. Livermore D.M., Struelens M., Amorim J., Baquero F., Bille J., Canton R., Henning S., Gatermann S., Marchese A., Mittermayer H., Nonhoff C., Oakton K.J., Praplan F., Ramos H., Schito G.C., Van Eldere J., Verhaegen J., Verhoef J., Visser M.R. (2002) Multicentre evaluation of the VITEK 2 Advanced Expert System for interpretive reading of antimicrobial resistance tests. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49 : 289-300.
124. Lohner K., Staudegger E. (2001) Are we on the threshold of the Post-Antibiotic Era? In : *Development of novel antimicrobial agents : emerging strategies*. Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K., pp. 1-12.



125. Lowy F.D. (2003) Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation* 111 (9) : 1265-1273.
126. Ma X.X., Ito T., Tiensatorn C., Jamklang M., Chongtrakool P., Boyle-Vavra S., Daum R.S., Hiramatsu K. (2002) Novel Type of Staphylococcal Cassette Chromosome mec identified in community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp.1147-1152.
127. Maira- Litràn T., Kropec A., Goldmann D.A., Pier G.B. (2005) Comparative opsonic and protective activities of *Staphylococcus aureus* conjugate vaccines containing native or deacetylated Staphylococcal Poly-*N*-Acetyl- β -(1-6)-Glucosamine. *Infection and Immunity*, pp. 6752-6762.
128. Mak T.W., Saunders M.E. (2006) Vaccines and clinical immunization. In : *The Immune Response, basic and clinical principles*. Elsevier, pp. 696-747.
129. Malhotra-Kumar S., Haccuria K., Michiels M., Ieven M., Poyart C., Hrynnievicz W., Goosens H. on behalf of the MOSAR WP2 study group (2008) Current trends in rapid diagnostics for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and glycopeptide-resistant *Enterococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 1577-1587.
130. Mammina C., Di Noto A.M., Costa A., Nastasi A. (2005) VanB-VanC1 *Enterococcus gallinarum*, Italy. *Emerging Infectious diseases* 11 (9) : 1491.
131. Mangili A., Bica I., Snyderman D.R., Hamer D.H. (2005) Daptomycin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical Infectious Diseases* 40 : 1058-1060.



132. Mascini E.M., Holm S.E. (2004) *Streptococci* and related genera. In : *Infectious Diseases, 2nd edition*. Eds Cohen J., Powderly W.G. Mosby, pp. 2137-2149.
133. Mazmanian S.K., Liu G., Jensen E.R., Lenoy E., Schneewind O. (2000) *Staphylococcus aureus* sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (10) : 5510-5515.
134. Mazmanian S.K., Ton-That H., Schneewind O. (2001) Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 40 (5) : 1049-1057.
135. McAleese F., Petersen P., Ruzin A., Dunman P.M., Murphy E., Projan S.J., Bradford P.A. (2005) A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived *Staphylococcus aureus* mutants to Tigecycline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 1865-1871.
136. McKessar S.J., Berry A.M., Bell J.M., Turnidge J.D., and Paton J.C. (2002) Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (11) : 3224-3228.
137. Merrill C.R., Biswas B., Carlton R., Jensen N.C., Creed G.J., Zullo S., Adhya S. (1996) Long circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 : 3188-3192.
138. Micek S.T., Dunne M., Kollef M.H. (2005) Pleuropulmonary complications of Panton-Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : importance of treatment with antimicrobials inhibiting exotoxin production. *Chest* 128 : 2732-2738.

139. Miler L.G., Perdreau-Remington F., Rieg G., Mehdi S., Perlroth J., Bayer A.S., Tang A.W., Phung T.O., Spellberg B. (2005) Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. *The New England Journal of Medicine* 352 (14) : 1445-1453.
140. Moellering R.C. Jr. (1998) Vancomycin-resistant *Enterococci*. *Clinical Infectious Diseases* 26 : 1196-1199.
141. Moellering R.C. Jr. (2005) *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc* species. In : *Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th edition*. Eds Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. Churchill Livingstone, pp. 2411-2421.
142. Moise P.A., Sakoulas G., Forrest A., Schentag J.J. (2007) Vancomycin in vitro bactericidal activity and its relationship to efficacy in clearance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 2582-2586.
143. Moise P.A., Smyth D.S., El-Fawal N., Robinson D.A., Holden P.N., Forrest A., Sakoulas G. (2008) Microbiological effects of prior vancomycin use in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61 : 85-90.
144. Montero C.I., Stock F., Murray P.R. (2008) Mechanisms of resistance to Daptomycin in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 1167-1170.
145. Moreillon P., Que Y-A., Glauser M.P. (2005) *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In : *Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th edition*. Eds Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. Churchill Livingstone, pp. 2321-2351.



146. Morell V. (1997) Antibiotic Resistance : Road of No Return. *Science* 278 : 575-576.
147. Morgan M. (2005) *Staphylococcus aureus*, Panton-Valentine leukocidin and necrotising pneumonia. *BMJ* 331: 793-794.
148. Morrison D. (2002) The *Enterococci*. In : *Molecular Medical Microbiology*. Ed, M. Sussman. Academic Press, pp. 867-870.
149. Mundt J.O. (1986) *Enterococci*. In : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. Volume 2, Williams & Wilkins, pp. 1063-1065.
150. Murray B.E. (1997) Vancomycin-resistant *Enterococci*. *The American Journal of Medicine* 102 : 284-293.
151. Murray B.E. (2000) Vancomycin-resistant Enterococcal infections. *The New England Journal of Medicine* 342 : 710-721.
152. Naimi T.S., LeDell K.H., Como-Sabetti K., Borchardt S.M., Boxrud D.J., Etienne J., Johnson S.K., Vandenesch F., Fridkin S., O'Boyle C., Danila R.N., Lynfield R. (2003) Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA* 290 (22) : 2976-2984.
153. Nakasone I., Kinjo T., Yamane N., Kisanuki K., Shiohira C.M. (2007) Laboratory-based evaluation of the colorimetric VITEK-2 Compact system for species identification and of the Advanced Expert System for detection of antimicrobial resistances : VITEK-2 Compact system identification and antimicrobial susceptibility testing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 58 : 191-198.

154. Niemeyer D., Pucci M., Thanassi J. (1996) Role of *mecA* transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, pp. 5464-5471.
155. Ohwada A., Sekiya M., Hanaki H., Arai K.K., Nagaoka I., Hori S., Tominaga S., Hiramatsu K., Fukuchi Y. (1999) DNA vaccination by *mecA* sequence evokes an antibacterial immune response against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44 : 767-774.
156. Oliveira D.C., Tomasz A., De Lencastre H. (2002) Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet Infectious Diseases* 2 : 180-189.
157. Oliveira D.C., Tomasz A., De Lencastre H. (2001) The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microbial Drug Resistance* 7 (4) : 349-361.
158. Patel J.B., Jevitt L.A., Hageman J., McDonald L.C., Tenover F.C. (2006) An association between reduced susceptibility to daptomycin and reduced susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases* 42 : 1652-1653.
159. Patiño L.A., Courvalin P., Perichon B. (2002) VanE gene cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* BM4405. *Journal of Bacteriology*, 184 (23) : 6457-6464.
160. Peacock S.J. (2005) *Staphylococcus*. In : *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 10th edition. Hodder Arnold, pp. 771-816.



161. Petinaki E., Arvaniti A., Dimitracopoulos G., Spiliopoulou I. (2001) Detection of *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes among clinical isolates of methicillin resistant *staphylococci* by combined polymerase chain reactions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47 : 297-304.

162. Poole K. (2005) Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56 : 20-51.

163. Poulsen R.L., Pallesen L.V., Frimodt-Møller N., Espersen F. (1999) Detection of clinical vancomycin-resistant *enterococci* in Denmark by multiplex PCR and sandwich hybridization. *APMIS* 107 : 404-412.

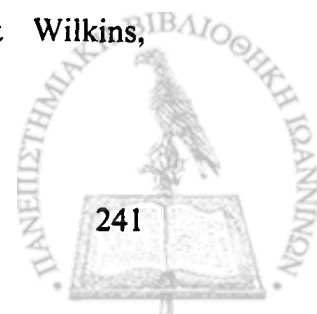
164. Predari S.C., Ligozzi M., Fontana R. (1991) Genotypic identification of methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci* by polymerase chain reaction. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 2568-2573.

165. Proctor R.A. (2006) Respiration and small colony variants of *Staphylococcus aureus*. In : *Gram positive pathogens*. Eds, Fischetti V., Novick R.P., Feretti J.J., Portnoy D.A., Rood J.I. ASM Press, pp. 434-439.

166. Projan S.J., Nesin M., Dunman P.M. (2006) Staphylococcal vaccines and immunotherapy : to dream the impossible dream? *Current Opinion in Pharmacology* 6 : 473-479.

167. Projan S.J., Novick R.P. (1997) The molecular basis of pathogenicity. In : *The Staphylococci in human disease*. Eds, Crossley K.B., Archer G.L. Churchill Livingstone, New York, pp. 55-75.

168. Rice L.B., Bonomo R.A. (2005) Genetic and biochemical mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. In : *Antibiotics in Laboratory Medicine, 5th edition*. Ed, Lorian V. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 441-498.



169. Rivas J.M., Speziale P., Patti J.M., Höök M. (2004) MSCRAMM- Targeted vaccines and immunotherapy for staphylococcal infection. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 7 (2) : 223-227.
170. Robbins J.B., Schneerson R., Horwith G., Naso R., Fattom A. (2004) *Staphylococcus aureus* types 5 and 8 capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines. *American Heart Journal* pp. 593-598.
171. Robinson D.A., Enright M.C. (2003) Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (12) : 3926-3934.
172. Russel A.D., Chopra I. (1996) Antibiotics that inhibit peptidoglycan synthesis. In : *Understanding antibacterial action and resistance*. Ellis Horwood Editors, pp. 57-74.
173. Russel A.D., Chopra I. (1996) Genetic and biochemical basis of acquired resistance to chemotherapeutic antibiotics. In : *Understanding antibacterial action and resistance*. Ellis Horwood Editors, pp. 172-201.
174. Rybak M.J. (2006) The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of vancomycin. *Clinical Infectious Diseases* 42 : S35-39.
175. Rybkine T., Mainardi J.L., Sougakoff W., Collatz E., Gutmann L. (1998) Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of β -lactam resistance. *The Journal of Infectious Diseases* 178 : 159-163.
176. Sakoulas G., Moellering R.C. Jr. Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Clinical Infectious Diseases* 46 (5) : S360-367.



177. Sakoulas G., Gold H.S., Venkataraman L., Degirolami P.C., Eliopoulos G.M., Qian Q. (2001) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : comparison of susceptibility testing methods and analysis of mecA-positive susceptible strains. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 3946-3951.
178. Sakoulas G., Moise-Broder P.A., Schentag J., Forrest A., Moellering R.C. Jr., Eliopoulos G.M. (2004) Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 2398-2402.
179. Saleh-Mghir A., Ameer N., Muller-Serieys C., Ismael F., Lemaitre F., Massias L., Feger C., Bléton R., Crémieux A.C. (2002) Combination of Quinupristin-Dalfopristin (Synercid) and Rifampin is highly synergistic in experimental *Staphylococcus aureus* joint prosthesis infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 1122-1124.
180. Schaffer A.C., Solinga R.M., Cocchiaro J., Portoles M., Kiser K.B., Risley A., Randall S.M., Valtulina V., Speziale P., Walsh E., Foster T., Lee J.C. (2006) Immunization with *Staphylococcus aureus* clumping factor B, a major determinant in nasal carriage, reduces nasal colonization in a murine model. *Infection and Immunity*, pp. 2145-2153.
181. Schleifer K.H. (1986) Micrococcaceae. In : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. Volume 2, Williams & Wilkins, pp. 1003-1019.
182. Schmitz F.J., Higgins P.G., Mayer S., Fluit A.C., Dalhoff A. (2002) Activity of quinolones against Gram-positive cocci : Mechanisms of drug action and bacterial resistance. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 21 : 647-659.

183. Senna J.P., Roth D.M., Oliveira J.S., Machado D.C., Santos D.S. (2003) Protective immune response against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a murine model using a DNA vaccine approach. *Vaccine* 21 (19-20) : 2661-2666.
184. Shinefield H., Black S., Fattom A., Horwith G., Ragson S., Ordonez J., Yeoh H., Law D., Robbins J.B., Schneerson R., Muenz L., Naso R. (2002) Use of a *Staphylococcus aureus* conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis. *The New England Journal of Medicine* 346 (7) : 491- 496.
185. Shlaes D.M., Rice L.B. (1994) Bacterial resistance to the cyclic glycopeptides. *Trends in Microbiology* 2 (10) : 385-388.
186. Shorr A.F., Kunkel M.J., Kollef M. (2005) Linezolid versus vancomycin for *Staphylococcus aureus* bacteraemia : pooled analysis of randomized studies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56 : 923-929.
187. Silverman J.A., Perlmutter N.G., Shapiro H.M. (2003) Correlation of Daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 2538-2544.
188. Skov R., Smyth R., Clausen M., Larsen A.R., Frimodt-Møller N., Olsson-Liljequist B., Kahlmeter G. (2003) Evaluation of a cefoxitin 30 µg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52 : 204-207.
189. Skov R., Smyth R., Larsen A.R., Frimodt-Møller N., Kahlmeter G. (2005) Evaluation of cefoxitin 5 and 10 µg discs for the detection of methicillin resistance in staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55 : 157-161.



190. Skov R.L., Pallesen L.V., Poulsen R.L., Espersen F. (1999) Evaluation of a new 3-h hybridization method for detecting the *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* and comparison with existing genotypic and phenotypic susceptibility testing methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43 : 467-475.
191. Smith T.L., Pearson M.L., Wilcox K.R., Cruz C., Lancaster M.V., Robinson-Dunn B., Tenover F.C., Zervos M.J., Band J.D., White E., Jarvis W.R. (1999) Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The New England Journal of Medicine*, 340 (7).
192. Soltani M., Beighton D., Philpott-Howard J., Woodford N. (2000) Mechanisms of resistance to Quinupristin-Dalfopristin among isolates of *Enterococcus faecium* from animals, raw meat, and hospital patients in Western Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 433-436.
193. Soriano, Marco F., Martínez J.A., Pisos E., Almela M., Dimova V.P., Alamo D., Ortega M., Lopez J., Mensa J. (2008) Influence of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical Infectious Diseases* 46 : 193-200.
194. Stefani S., Varaldo P.E. (2003) Epidemiology of methicillin-resistant *staphylococci* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 9 (12).
195. Stranger-Jones Y.K., Bae T., Schneewind O. (2006) Vaccine assembly from surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *PNAS* 103 (45) : 16942-16947.
196. Suppola J.P., Kolho E., Salmenlinna S., Tarkka E., Vuopio-Varkila J., Vaara M. (1999) VanA and vanB incorporate into an endemic ampicillin-resistant vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* strain : effect on interpretation of clonality. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (12) : 3934-3939.

197. Tanaka M., Wang T., Onodera Y., Uchida Y., Sato K. (2000) Mechanism of quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infections and Chemotherapy* 6 : 131-139.
198. Tenover F.C., Biddle J., Lancaster M.V. (2001) Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases* 7 (2) : 327-332.
199. Texeira L.M., Facklam R.R. (2005) *Enterococcus*. In: *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 10th edition*. Hodder Arnold, pp. 882-897.
200. Tiemersma E.W., Bronzwaer S.L.A.M., Lyytikäinen O., Degener J.E., Schrijnemakers P., Bruinsma N., Monen J., Witte W., Grundmann H. and European Antimicrobial Surveillance System Participants (2004) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerging Infectious Diseases* 10 (9) : 1627-1634.
201. Tsiodras S., Gold H.S., Sakoulas G., Eliopoulos G.M., Wennersten C., Venkataraman L., Moellering R.C. Jr (2001) Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *The Lancet* 358 : 207-208.
202. Tsuji B.T., Rybak M.J., Lau K.L., Sakoulas G. (2007) Evaluation of accessory gene regulator (agr) group and function in the proclivity towards vancomycin intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 1089-1091.
203. Ubukata K., Nakagami S., Nitta A., Yamane A., Kawakami S., Sugiura M., Konno M. (1992) Rapid detection of the *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococci* by enzymatic detection of polymerase chain reaction products. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 1728-1733.



204. Ünal S., Hoskins J., Flokowitsch J.E., Wu C.Y.E., Preston D.A., Skatrud P.L. (1992) Detection of methicillin-resistant *Staphylococci* by using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 1685-1691.
205. Van den Braak N., Goessens W., Van Belkum A., Verbrugh H.A., Endtz H.P. (2001) Accuracy of the VITEK 2 System to detect glycopeptide resistance in *Enterococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 351-353.
206. Vannuffel P., Gigi J., Ezzedine H., Vandercam B., Delmee M., Wauters G., Gala J.L. (1995) Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 2864-2867.
207. Verhoef J., Fluit A.C., Schmitz F.J. (2004) *Staphylococci* and other Micrococcaceae. In : *Infectious Diseases, 2nd edition*. Eds Cohen J., Powderly W.G. Mosby, pp. 2119-2129.
208. Wang G., Hindler J.F., Ward K.W., Bruckner D.A. (2006) Increased vancomycin MICs for *Staphylococcus aureus* clinical isolates from a University Hospital during a 5-year period. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 3883-3886.
209. Weichhart T., Horky M., Söllner J., Gangl S., Henics T., Nagy E., Meinke A., Von Gabain A., Fraser C.M., Gill S.R., Hafner M., Von Ahsen U. (2003) Functional selection of vaccine candidate peptides from *Staphylococcus aureus* whole- genome expression libraries in vitro. *Infection and Immunity*, pp. 4633-4641.
210. Weigel L.M., Clewell D.B., Gill S.R., Clark N.C., McDougal L.K., Flannagan S.E., Kolonay J.F., Shetty J., Killgore G.E., Tenover F.C. (2003) Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 302 : 1569-1571.

211. Weiss S., Chakraborty T. (2001) Bacteria mediated DNA transfer. In : *Development of novel antimicrobial agents : emerging strategies*. Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K., pp. 81-88.
212. Werner G., Coque T.M., Hammerum A.M., Hope R., Hryniewicz W., Johnson A., Klare I., Kristinsson K.G., Leclercq R., Lester C.H., Lillie M., Novais C., Olsson-Liljequist B., Peixe L.V., Sadowy E., Simonsen G.S., Top J., Vuopio-Varkila J., Willems R.J., Witte W., Woodford N. (2008) Emergence and spread of vancomycin resistance among *Enterococci* in Europe. *Eurosurveillance* 13(47) : 1-11.
213. Werner G., Cuny C., Schmitz F.J., Witte W. (2001) Methicillin-resistant, Quinupristin-Dalfopristin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced sensitivity to glycopeptides. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 3586-3590.
214. Werner G., Gfrörer S., Fleige C., Witte W., Klare I. (2008) Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from a German intensive care unit patient. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, February, pp.1182-1183.
215. Whitener C., Park S., Browne F., Parent L., Julian K., Bozdogan B., Appelbaum P., Chaitram J., Weigel L., Jernigan J., McDougal L., Tenover F., Fridkin S. (2004) Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the absence of vancomycin exposure. *Clinical Infectious Diseases* 38 : 1049-1055.
216. Williams R.J., Heymann D.L. (1998) Containment of Antibiotic Resistance. *Science* 279 : 1153-1154.
217. Wills Q.F., Kerrigan C., Soothill J.S. (2005) Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 1220-1221.



218. Winn W.C., Allen S.D., Janda W.M., Koneman E.W., Schreckenberger P.C. (2006) *Staphylococci* and related Gram-positive cocci. In : *Color Atlas & Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th edition*. Eds, Lippincott Williams & Wilkins, pp. 624-648.
219. Winn W.C., Allen S.D., Janda W.M., Koneman E.W., Schreckenberger P.C. (2006) Streptococci, Enterococci and the "Streptococcus-like" bacteria. In : *Color Atlas & Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th edition*. Eds, Lippincott Williams & Wilkins, pp. 674-704.
220. Wise R. (2006) The drugs industry and the need for new antimicrobials. *The Lancet* 367 (9504) : 27.
221. Witte W., Strommenger B., Werner G. (2006) *Staphylococci*. Diagnostics, Typing, and Taxonomy. In : *Gram positive pathogens*. Eds, Fischetti V., Novick R.P., Feretti J.J., Portnoy D.A., Rood J.I. ASM Press, pp. 371-378.
222. Woodford N., Johnson A.P., Morrison D., Speller D.C.E. (1995) Current perspectives on glycopeptide resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, pp.585-615.
223. Wunderink R.G., Rello J., Cammarata S.K., Croos-Dabrera R.V., Kollef M.H. (2003) Linezolid vs Vancomycin : analysis of two double-blind studies of patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia. *Chest* 124 : 1789-1797.
224. Zhang H., Hackbarth C., Chansky K., Chambers H. (2001) A proteolytic transmembrane signalling pathway and resistance to β -lactams in *Staphylococci*. *Science* 291 : 1962-1965.

225. Zhou H., Xiong Z.Y., Li H.P., Zheng Y.L., Jiang Y.Q. (2006) An immunogenicity study of a newly fusion protein Cna-FnBP vaccinated against *Staphylococcus aureus* infections in a mouse model. *Vaccine* 24 (22) : 4830-4837.
226. Zirakzadeh A., Patel R. (2005) Epidemiology and mechanisms of glycopeptide resistance in *enterococci*. *Current Opinion in Infectious Diseases* 18 : 507-512.
227. Βαμβακοπούλου Σ.Ε., Κολονίτσιου Φ., Δημητρακόπουλος Γ.Ο., Αναστασίου Ε.Δ. (2003) Μικροβιακές μεμβράνες : biofilms. *Δελτίον Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας*, Τόμος 48, Τεύχος 6.
228. Πετεινάκη Ε., Σπηλιοπούλου Ι., Δημητρακόπουλος Γ. (2000) Σταφυλόκοκκοι με οριακή αντοχή στην μεθικιλίνη : Μηχανισμοί αντοχής και μέθοδοι ανίχνευσης. *Δελτίον Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας*, Τόμος 45, Τεύχος 5.
229. Πετεινάκη Ε.Α., Μανιάτης Α.Ν. (2000) Μοριακοί μηχανισμοί της αντοχής στη μεθικιλίνη του *S. aureus*. *Δελτίον Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας*, Τόμος 45, Τεύχος 4.
230. Σπηλιοπούλου Ι. (2006) Στελέχη *Staphylococcus aureus* ανθεκτικά στη methicillin ως αίτιο λοιμώξεων στο νοσοκομείο και στην κοινότητα *Εφαρμοσμένη Κλινική Μικροβιολογία & Εργαστηριακή Διαγνωστική*, Τόμος 11, Τεύχος 4, σελ.169-179.

