

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑΣ,**  
**ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΑΣ, ΖΩΟΝΟΣΩΝ ΚΑΙ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗΣ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ**  
**BANKOMYΚΙΝΗ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΑΣ ΧΡΗΣΤΙΔΟΥ**  
**ΙΑΤΡΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΟΥ (ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΥ)**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2006**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ ΤΣΕΛΕΝΤΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΧΙΛΛΕΑΣ ΓΚΙΚΑΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΣΑΜΩΝΗΣ

Στην οικογένειά μου, για την αγάπη που μας ενώνει.

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠΑΓΝΗ) και στο Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης με επιβλέποντα τον καθηγητή κ. Ιωάννη Τσελέντη και συμμετέχοντες στην τριμελή επιτροπή τους καθηγητές κ. Αχιλλέα Γκίκα και κ. Γεώργιο Σαμώνη, καθώς και τον συμμετέχοντα στην πρώτη τριμελή συμβουλευτική επιτροπή καθηγητή κ. Γεώργιο Ηλιόπουλο.

Θέλω να εκφράσω την βαθιά ευγνωμοσύνη μου πρωτίστως για τον καθηγητή κ. Ιωάννη Τσελέντη που διεύρυνε τους ορίζοντες των γνώσεών μου και μου παρείχε την δυνατότητα να πραγματοποιήσω αυτό το ταξίδι στο χώρο της επιστημονικής σκέψης. Επίσης τον καθηγητή κ. Αχιλλέα Γκίκα για την βοήθεια, την στήριξη, την καθοδήγηση και συμπαράσταση σε όλα τα στάδια της παρούσης μελέτης και τους καθηγητές κ. Γεώργιο Σαμώνη και κ. Γεώργιο Ηλιόπουλο για την αμέριστη συμπαράσταση που μου προσέφεραν ως μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής.

Θερμές ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στην επίκουρο καθηγήτρια κ. Ευσταθία Σκούληκα για την βοήθειά της στην πραγματοποίηση της μοριακής διερεύνησης και την κ. Νικολέττα Παπαγεωργίου, χημικό, για την προσφορά της στην τεχνική εφαρμογή των μοριακών μεθόδων. Επίσης την κ. Μαρία Ρουμπελάκη, νοσηλεύτρια της επιτροπής ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων, για την συμβολή της σε όλα τα στάδια της μελέτης, τον βιολόγο κ. Αλέξανδρο Γεωργιλαδάκη, υπεύθυνο του τμήματος ελέγχου ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, για την βοήθειά του στον προσδιορισμό των ανθεκτικών στελεχών, τον κ. Ευάγγελο Κρητσωτάκη, μαθηματικό, για την προσφορά του στην στατιστική

επεξεργασία των δεδομένων, καθώς και όλους τους συναδέλφους και συνεργάτες στο Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠΑΓΝΗ).

Ιδιαίτερη μνεία οφείλω στον εκλιπόντα συνάδελφο κ. Ιωάννη Πεδιαδίτη, ιατρό επιδημιολόγο, για την συμβολή του στον σχεδιασμό και οργάνωση της επιδημιολογικής μελέτης.

Ευχαριστώ θερμά τον σύζυγό μου Αντώνιο Στεφανάκη, τη μητέρα μου Αλεξάνδρα Χρηστίδου και τους υιούς μου Δημήτριο, Αλέξανδρο και Βασίλειο-Ανάργυρο Στεφανάκη, γιατί η αγάπη τους μου έδωσε την δύναμη να ολοκληρώσω αυτήν την μελέτη. Στη σκέψη και στην καρδιά μου διατηρείται ζωντανή η μνήμη του πατέρα μου, Δημητρίου Χρηστίδη, γιατί η αγάπη του με συνοδεύει και με στηρίζει ακόμη περισσότερο τώρα που δεν βρίσκεται στην παρούσα ζωή.

Όλως ιδιαίτερα θέλω και πάλι να ευχαριστήσω βαθιά τον καθηγητή κ. Ιωάννη Τσελέντη για τα χρόνια της γόνιμης μαθητείας δίπλα του, για την στήριξη, την εμπιστοσύνη και την αγάπη που μου έδειξε και την σοφή καθοδήγησή του στο χώρο της επιστημονικής αναζήτησης.

**ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ****ΣΕΛΙΔΑ****ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ****ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟ ΣΤΗ ΒΑΝΚΟΜΥΚΙΝΗ****ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟ**

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	19-20
2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	20-21
3. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ	23
4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	23-24
5. ΣΥΖΕΥΞΗ	24-25
6. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ	25-27
7. ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	27
7. 1. Φυσική αντοχή	28-30
7. 2. Επίκτητες αντοχές στα αντιβιοτικά	30-34
8. ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΑ	34
8. 1. Ιστορική αναδρομή	34-35
8. 2. Δράση της βανκομυκίνης στη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης.	35-36
8. 3. Περιγραφή φαινοτύπων	36-37
8. 4. Γονοτυπικός χαρακτηρισμός και μηχανισμός των τύπων αντοχής	37-42
8. 5. Βανκομυκίνη-εξαρτώμενοι εντερόκοκκοι	42-43
8. 6. Ταυτόχρονη μεταφορά αντοχής.	43
9. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ VRE	43-50
9. 1. Γεωγραφική κατανομή	43-45
9. 1. α) VRE στα νοσοκομεία	43-44
9. 1. β) VRE στην κοινότητα	45
9. 2. Παράγοντες κινδύνου	45-47
9. 3. Σχέση αποικισμού και λοίμωξης	47-48
9. 4. Εστίες μετάδοσης	48-50
10. ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ	50-59
10. 1. Ορθολογική χρήση βανκομυκίνης	51-52
10. 2. Εκπαίδευση προσωπικού.	52-53
10. 3. Συμβολή του μικροβιολογικού εργαστηρίου στην διάγνωση και τον έλεγχο του VRE.	53-54

10. 4. Εφαρμογή μέτρων ελέγχου λοιμώξεων	55-57
10. 5. Καλλιέργειες προς επιτήρηση	57-58
10. 6. Προσπάθειες εκρίζωσης του VRE από το γαστρεντερικό	58-59
11. ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ VRE	59-62
12. ΘΕΡΑΠΕΙΑ	62-68
ΕΠΙΛΟΓΟΣ	68-69

## ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

### ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

A. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΜΕΛΕΤΗΣ	71-79
A.1. Πρώτη εμφάνιση του VRE στο ΠΑΓΝΗ	71
A.2. Μέτρα ελέγχου και περιορισμού της διασποράς του VRE	71-72
A.3. Διεξαγωγή πρώτης μελέτης επιπολασμού του VRE στο γαστρεντερικό σύστημα ασθενών νοσηλευομένων στο ΠΑΓΝΗ	72-74
A. 4. Διεξαγωγή πολυκεντρικής μελέτης επιπολασμού του VRE στο γαστρεντερικό σύστημα ασθενών νοσηλευομένων σε 13 Ελληνικά νοσοκομεία	74-75
A. 5. Καταγραφή και μελέτη περιστατικών λοίμωξης από VRE στο ΠΑΓΝΗ	75
A. 6. Μέθοδοι ελέγχου της ευαισθησίας των απομονωθέντων στελεχών VRE στα αντιβιοτικά	75-76
A.7. Χαρακτηρισμός του γονότυπου αντοχής στην βανκομυκίνη με την μέθοδο multiplex PCR	76-78
A.8. Ανάλυση απομονωθέντων στελεχών VRE με την μέθοδο ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed-Field Gel Electrophoresis-PFGE).	78-79
B. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ ΤΟΥ VRE ΣΤΟ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟ ΤΩΝ ΝΟΣΗΛΕΥΟΜΕΝΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΤΟΥ ΠΑΓΝΗ	80-84
B. 1. Δειγματοληψία	80
B. 2. ΕΙΔΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΟΠΡΑΝΩΝ ΓΙΑ VRE	81
B. 3. Μέθοδος καλλιέργειας κοπράνων για απομόνωση VRE	82

B. 4. Τυποποίηση εντεροκόκκων	82-83
B. 5. Διερεύνηση απομονωθέντων στελεχών VRE.	83
B. 6. Επιδημιολογική διερεύνηση	84
Γ. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΟΛΥΚΕΝΤΡΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ ΤΟΥ VRE ΣΤΟ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟ ΑΣΘΕΝΩΝ ΝΟΣΗΛΕΥΟΜΕΝΩΝ ΣΕ 13 ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑ	85-87
Γ. 1. Νοσοκομεία που συμμετείχαν	85
Γ. 2. Δειγματοληψία	85
Γ. 3. Επιδημιολογική διερεύνηση-παράγοντες κινδύνου	86-87
Γ. 4. Διερεύνηση απομονωθέντων στελεχών	87
Δ. ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ ΛΟΙΜΩΣΗΣ ΑΠΟ VRE ΣΤΟ ΠΑΓΝΗ	88-90
Δ. 1. Καταγραφή ασθενών	88
Δ. 2. Καταγραφή στελεχών	89
Δ. 3. Κατανομή σε χρονικές περιόδους	89-90
Ε. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	91-95
Ε. 1. Υλικό	91
Ε. 2. Έλεγχος ευαισθησίας με την μέθοδο διάχυσης των αντιβιοτικών σε δίσκους.	93
Ε. 3. Μέθοδος προσδιορισμού της ελαχίστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) των αντιβιοτικών με την μέθοδο E-test.	93
Ε. 4. Αντιβιοτικά.	94
Ε. 5. Χαρακτηρισμός φαινότυπου αντοχής στα γλυκοπεπτίδια.	94-95
ΣΤ. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΑ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΑΛΥΣΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ (MULTIPLEX PCR)	96-101
ΣΤ. 1. Υλικό	96
ΣΤ. 2. Περιγραφή μεθόδου	96-97
ΣΤ. 3. Εξαγωγή του DNA-Μέθοδος φαινόλης	99-100
ΣΤ. 4. Πολλαπλή αλυσωτή αντίδραση θερμοανθεκτικής πολυμεράσης (multiplex PCR)	100-101



Z. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΕΣΗΣ ΣΕ ΠΑΛΛΟΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ (PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS-PFGE)	102-107
Z. 1. Περιγραφή μεθόδου	102
Z. 2. Υλικό	103
Z. 3. Μέθοδος εξαγωγής DNA	105-106
Z. 4. Μέθοδος εφαρμογής του περιοριστικού ενζύμου <i>SmaI</i>	106
Z. 5. Μέθοδος εκτίμησης των ευρημάτων	107
ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ	
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	108
A. ΣΥΡΡΟΗ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ VRE ΣΤΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ	109-124
A. 1. Διάγνωση της πρώτης για το νοσοκομείο λοίμωξης από VRE	109-110
A. 2. Επιδημιολογική διερεύνηση του πρώτου κρούσματος	111
A. 3. Ανάδυση του προβλήματος με την μορφή χρονικής συρροής κρουσμάτων	112-118
A. 4. Συσχέτιση περιστατικών	120
A. 5. Συσχέτιση του πρώτου περιστατικού λοίμωξης με τους φορείς VRE που εντοπίστηκαν αμέσως στην ίδια κλινική.	121
A. 6. Συμπεράσματα	121-122
B. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ ΓΙΑ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟ ΤΟΥ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΤΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ ΑΠΟ VRE.	125-133
B. 1. Επιπολασμός του αποικισμού του γαστρεντερικού συστήματος των νοσηλευομένων ασθενών από VRE	125-126
B. 2. Ταυτοποίηση στελεχών	126-127
B. 3. Ευαισθησία στα αντιβιοτικά	127
B. 4. Ανάλυση με την μέθοδο multiplex PCR	127-128
B. 5. Παράγοντες κινδύνου για αποικισμό από VRE	128
B. 6. Συμπεράσματα	129

Γ. ΠΟΛΥΚΕΝΤΡΙΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ ΓΙΑ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟ ΤΟΥ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΑΠΟ VRE ΣΕ 13 ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑ	134-153
Γ. 1. Γενική κατανομή	134-135
Γ. 2. Ειδική κατανομή κατά είδος και τύπο αντοχής των απομονωθέντων στελεχών.	135-138
Γ. 3. Επιπολασμός στελεχών με επίκτητο τύπο αντοχής (VanA, VanB)	138-140
Γ. 4. Χαρακτηρισμός του γονότυπου αντοχής κατόπιν εφαρμογής multiplex PCR	141
Γ. 5. Ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (pulse field gel electrophoresis, PFGE)	141-142
Γ. 6. Ανάλυση παραγόντων κινδύνου για αποικισμό από VRE	143-144
Γ. 7. Συσχέτιση των αποτελεσμάτων των δύο μελετών στο ΠΑΓΝΗ μεταξύ τους και προς την πολυκεντρική.	144-145
Γ. 8. Συμπεράσματα	145-146
Δ. ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΠΟ VRE ΜΕ ΜΟΡΦΗ ΣΠΟΡΑΔΙΚΩΝ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ	154-169
Δ.1. Αριθμός κρουσμάτων - χρονική κατανομή	154-157
Δ. 2. Καταγραφή ασθενών	154
Δ. 2. α) Χαρακτηριστικά των ασθενών-δημογραφικά στοιχεία	164-155
Δ. 2. β) Μορφή λοίμωξης – θέση απομόνωσης	155
Δ. 2. γ) Παθολογικό υπόστρωμα ασθενούς	155-156
Δ. 2. δ) Χειρουργική επέμβαση	156
Δ. 2. ε) Παρεμβατικές	156-157
Δ. 2. στ) Χορήγηση αντιβιοτικών	157
Δ. 3. Επιδημιολογικά στοιχεία	158-161
Δ. 3. α) Διάστημα νοσηλείας	158
Δ. 3. β) Κατανομή σε τμήματα	158-159
Δ. 3. γ) Διακίνηση ασθενών	159-160
Δ. 3. δ) Έλεγχος για αποικισμό	160-161
Δ. 4. Μικροβιολογικά δεδομένα-πολυμικροβιακές λοιμώξεις	174-165
Δ. 5. Έκβαση	165
Δ. 6. Καταγραφή στελεχών	165

Δ. 6. α) Αρχικά στελέχη	165
Δ. 6. β) Πολλαπλές απομονώσεις από τον ίδιο ασθενή	166
Δ. 7. Συμπεράσματα	166-168
<b>E. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ</b>	170-180
E. 1. Γενική περιγραφή αποτελεσμάτων	170
E. 2. Αποτελέσματα κατά αντιβιοτικό	170-171
E. 3. Αποτελέσματα κατά είδος εντεροκόκκου	171-172
E. 4. Αποτελέσματα κατά φαινότυπο αντοχής	172
E. 5. Συμπεράσματα	173-174
<b>ΣΤ. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗΝ ΒΑΝΚΟΜΥΚΙΝΗ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ MULTIPLEX PCR</b>	181-185
ΣΤ. 1. Αποτελέσματα	181-182
ΣΤ. 2. Αξιολόγηση αποτελεσμάτων	182-183
<b>Z. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΣΕ ΠΑΛΛΟΜΕΝΟ ΠΕΔΙΟ (PFGE)</b>	186-199
Z. 1. Γενική περιγραφή αποτελεσμάτων	186
Z. 2. Αποτελέσματα κατά νοσοκομείο	186-187
Z. 3. Αποτελέσματα στελεχών απομονωθέντων από τον ίδιο ασθενή	187
Z. 4. Συσχέτιση των προτύπων (pattern) που προέκυψαν από την PFGE ανάλυση	188-189
Z. 5. Χωροταξική και χρονική κατανομή στελεχών με κοινό πρότυπο ανάλυσης	189-190
Z. 6. Αξιολόγηση ερημάτων	191-192
<b>ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ</b>	
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	
A. ΠΡΩΤΗ ΕΜΦΑΝΙΣΗ (ΔΙΕΘΝΗΣ ΕΜΠΕΙΡΙΑ)	201-202
B. ΠΡΩΤΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ ΤΟΥ VRE ΣΤΟ ΠΑΓΝΗ	202-204
Γ. ΠΟΛΥΚΕΝΤΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ ΤΟΥ VRE ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑ.	204-214
Γ. 1. Επιπολασμός-συσχέτιση με διεθνή δεδομένα	204-208

Γ. 2. Αναφορές VRE στην Ελλάδα.	208-210
Γ. 3. Επιπολασμός κατά νοσοκομεία	210
Γ. 4. Επιπολασμός κατά τομείς	210-212
Γ. 5. Παράγοντες κινδύνου	212-214
Δ. ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΠΟ VRE	215-223
Δ. 1. Εντόπιση λοίμωξης	215
Δ. 2. Παθολογικό υπόστρωμα ασθενών και προδιαθεσικοί παράγοντες.	215-216
Δ. 3. Βακτηραιμία από VRE	216-217
Δ. 4. Επίπτωση και διασπορά VRE λοιμώξεων σε τμήματα.	217-223
E. ΦΑΣΜΑ ΑΝΤΟΧΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE ΣΤΑ ΑΛΛΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	224-225
ΣΤ. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ ΑΝΤΟΧΗΣ ΜΕ MULTIPLEX PCR.	226-228
ΣΤ. 1. Φαινότυπος αντοχής και μοριακός χαρακτηρισμός του γονότυπου αντοχής στα γλυκοπεπτίδια.	226-227
ΣΤ. 2. Επιδημιολογική σημασία του <i>E. gallinarum</i> και <i>E. casseliflavus</i>	227-228
Z. ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ VRE.	229-235
Z. 1. Σημασία μοριακής διερεύνησης της επιδημιολογίας του VRE.	229-231
Z. 2. Επιδημιολογικά πρότυπα	231-234
Z. 3. Ποικιλομορφία στελεχών VRE απομονωθέντων από τον ίδιο ασθενή.	234-235
H. ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΥΤΩΝ	235-237
ΕΠΙΛΟΓΟΣ	238
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	239-262
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	263-273

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΣΕΛΙΔΑ
1	ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΑ ΕΙΔΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ ENTEROCOCCUS	22
Γ1	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑ ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΞΕΤΑΣΘΕΝΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΟΛΥΚΕΝΤΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΓΙΑ ΕΠΠΟΛΑΣΜΟ ΑΠΟ VRE.	86
E1	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>E. FAECIUM</i>	91
E2.	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>E. GALLINARUM</i>	92
E3.	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>E.</i> <i>CASSELIFLAVUS/FLAVESCENS</i>	92
E4.	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>E. FAECALIS</i> ΚΑΙ ΑΛΛΑ ΕΙΔΗ	92
ΣΤ1.	ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ PRIMERS ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ MULTIPLEX PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΤΩΝ VRE	98
Z1.	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΤΑ ΕΙΔΟΣ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΟ ΑΝΤΟΧΗΣ	104
A1.	ΦΟΡΕΙΣ VRE ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΘΗΚΕ ΤΟ ΠΡΩΤΟ ΚΡΟΥΣΜΑ.	111
A2.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ ΠΕΡ Γ.	117
A3.	ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΤΩΝ 5 ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΠΟ VRE	118
A4.	ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	119
A5.	ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ 1 <sup>ΟΥ</sup> ΚΡΟΥΣΜΑΤΟΣ (ΠΕΡ Α) ΚΑΙ ΤΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΤΟΥΣ ΘΑΛΑΜΟΥΣ	123
B1.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΕΠΠΟΛΑΣΜΟΥ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΟΠΟΥ ΕΛΕΓΧΘΗΚΕ ΠΟΣΟΣΤΟ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ	130

<b>B2.</b>	ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΟΠΟΥ ΕΛΕΓΧΘΗΚΕ ΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ	131
<b>B3.</b>	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΚΑΤΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ, ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΕΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ	131
<b>B4.</b>	ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΤΑ ΕΙΔΟΣ ΚΑΙ ΤΥΠΟ ΑΝΤΟΧΗΣ	131
<b>B5.</b>	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ Van-A Η Van- B ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΑΝΤΟΧΗΣ	132
<b>B6.</b>	ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟ ΑΣΘΕΝΩΝ ΑΠΟ VRE	133
<b>Γ2.</b>	ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ ΤΟΥ VRE ΚΑΤΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΚΑΙ ΤΟΜΕΑ.	136
<b>Γ3.</b>	ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE ΚΑΤΑ ΕΙΔΟΣ ΣΕ ΟΛΑ ΤΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑ	137
<b>Γ4.</b>	ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE ΚΑΤΑ ΤΥΠΟ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΕ ΟΛΑ ΤΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑ	137
<b>Γ5.</b>	ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ ΤΟΥ VRE ΜΕ VanA / VanB ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΚΑΤΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΚΑΙ ΤΟΜΕΑ	139
<b>Γ6.</b>	ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΟΜΑΔΕΣ ΜΕ PFGE ΑΝΑΛΥΣΗ 81 ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΟΛΥΚΕΝΤΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ	147
<b>Γ7.</b>	ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟ ΑΠΟ ΣΤΕΛΕΧΗ VRE ΜΕ ΤΥΠΟ ΑΝΤΟΧΗΣ VAN-A Η VAN-B	149
<b>Γ8.</b>	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΗΡΑ-1 (ΠΑΓΝΗ) ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΟΛΥΚΕΝΤΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ- ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΟΠΟΥ ΕΛΕΓΧΘΗΚΕ ΠΟΣΟΣΤΟ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ	150
<b>Γ9.</b>	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΗΡΑ-1 (ΠΑΓΝΗ) ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΟΛΥΚΕΝΤΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ-	151

	ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΟΠΟΥ ΕΛΕΓΧΘΗΚΕ ΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ	
<b>Γ10.</b>	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΗΡΑ-1 (ΠΑΓΝΗ) ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΟΛΥΚΕΝΤΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΠΟΛΑΣΜΟΥ ΚΑΤΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ, ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΕΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ	151
<b>Γ11.</b>	ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ ΕΠΠΟΛΑΣΜΟΥ	152
<b>Γ12.</b>	ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΤΑ ΕΙΔΟΣ ΚΑΙ ΤΥΠΟ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΙΣ ΔΥΟ ΜΕΛΕΤΕΣ ΕΠΠΟΛΑΣΜΟΥ	153
<b>Δ1.</b>	ΕΤΗΣΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΙ ΕΠΠΤΩΣΗ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ VRE	161
<b>Δ2</b>	.ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ VRE	162
<b>Δ3.</b>	ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ VRE ΣΤΟ ΠΑΓΝΗ ΚΑΤΑ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΑΣ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΟΤΗΤΑ ΕΚΑΣΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ	169
<b>Ε5.</b>	ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ 174 ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>E.</i> <i>FAECIUM</i> ΣΕ 14 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	175
<b>Ε6.</b>	ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ 174 ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>E.</i> <i>GALLINARUM</i> ΣΕ 14 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	176
<b>Ε7.</b>	ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ 27 ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>E.</i> <i>CASSELIFLAVUS</i> ΣΕ 14 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	177
<b>Ε8.</b>	ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ 25 ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>E.</i> <i>FAECALIS</i> ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΕΙΔΩΝ ΣΕ 14 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	178
<b>Ε9</b>	ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	179

ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ 373 ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE  
ΣΤΑ 14 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

<b>E10.</b>	ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ 174 ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE ΜΕ VanA Η VanB ΤΥΠΟ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΑ	180
<b>ΣΤ2.</b>	ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΤΑ ΕΙΔΟΣ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΟ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗΝ BANKOMYΚΙΝΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ MULTIPLEX PCR	185
<b>Z1.</b>	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΤΑ ΕΙΔΟΣ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΟ ΑΝΤΟΧΗΣ	193
<b>Z2.</b>	ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΟΜΑΔΕΣ ΜΕ PFGE ΑΝΑΛΥΣΗ 120 ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE	196-197
<b>Z3.</b>	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΑΣΘΕΝΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΘΕΝΤΩΝ ΜΕ PFGE	198

### ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<b>ΣΧΗΜΑ</b>	<b>ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ</b>	<b>ΣΕΛΙΔΑ</b>
<b>A1.</b>	ΧΩΡΟΤΑΞΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ 1 <sup>ΟΥ</sup> ΚΡΟΥΣΜΑΤΟΣ (ΠΕΡ Α) ΚΑΙ ΤΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ	123
<b>A2.</b>	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ	124
<b>Γ1.</b>	ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΔΟΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ PFGE ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΟΛΥΚΕΝΤΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ.	148
<b>Δ1.</b>	ΕΤΗΣΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ VRE ΣΤΟ ΠΑΓΝΗ	163
<b>Δ2.</b>	ΕΤΗΣΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤΑ ΕΙΔΟΣ ΚΑΙ ΤΥΠΟ	163



	ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ VRE ΣΤΟ ΠΑΓΝΗ	
<b>ΣΤ1.</b>	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΕΣΗ ΣΕ ΑΓΑΡΟΖΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ MULTIPLEX PCR ΣΕ VRE ΣΤΕΛΕΧΗ.	184
<b>Z1.</b>	ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ (PATTERNS) ΜΕΤΑ ΑΠΟ PFGE ΑΝΑΛΥΣΗ VRE ΣΤΕΛΕΧΩΝ	194-195
<b>Z2</b>	ΧΩΡΟΤΑΞΙΚΗ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΔΥΟ ΕΠΙΚΡΑΤΕΣΤΕΡΩΝ PFGE PATTERNS ΣΤΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΗΡΑ-1 (ΠΕΠΑΓΝΗ)	199
<b>Δ3.</b>	ΜΗΝΙΑΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΚΑΙ ΔΕΥΤΕΡΗ ΠΕΡΙΟΔΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΠΟΛΑΣΜΟΥ (18/12/2000 –31/10/2002)	221
<b>Δ4.</b>	ΜΗΝΙΑΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΕΥΤΕΡΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΠΟΛΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΧΡΟΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟ (1/11/2002 –31/8/2003)	222
<b>Δ5.</b>	ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤΑ ΜΗΝΑ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΕΥΤΕΡΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΠΟΛΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΧΡΟΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟ (1/9/2003 –31/12/2004)	223

**ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ**  
**ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟ ΣΤΗ**  
**BANKOMYKINH ENTEPOKOKKO**

- 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**
- 2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ**
- 3. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ**
- 4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ**
- 5. ΣΥΖΕΥΞΗ**
- 6. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ**
- 7. ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ**
- 8. ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΑ**
- 9. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ VRE**
- 10. ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΚΑΙ  
ΕΛΕΓΧΟΥ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ**
- 11. ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ  
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΤΗΝ  
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ VRE**
- 12. ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εισαγωγή της χρήσης των αντιβιοτικών στη θεραπεία των λοιμώξεων άνοιξε ένα καινούργιο κεφάλαιο, όχι μόνο στην ιστορία της αντιμετώπισης των λοιμώξεων, αλλά και στην ιστορία της εξέλιξης των μικροοργανισμών. Η ανάγκη για προσαρμογή στις εκάστοτε διαμορφούμενες συνθήκες και η αέναη πάλη των ειδών για επιβίωση, οδηγεί τους μεν μικροοργανισμούς σε ανάπτυξη μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά, την δε επιστήμη σε ολοένα αυξανόμενη προσπάθεια ανεύρεσης νέων αντιμικροβιακών μέσων.

Η διερεύνηση των μικροοργανισμών υπό το πρίσμα της χρήσης των αντιβιοτικών οδήγησε στην διαπίστωση ότι αρκετά μικρόβια ήταν εφοδιασμένα από την σύστασή τους, δηλαδή περιείχαν μέσα στο γενετικό τους κώδικα πληροφορίες, που τα καθιστούσαν ανθεκτικά σε κάποια αντιβιοτικά. Άλλοτε πάλι ο μηχανισμός αντοχής ήταν επίκτητος, είχε δηλαδή αποκτηθεί στην πορεία και κάτω από την πίεση της παρουσίας αντιβιοτικών και γι' αυτό ήταν πιο επαγωγίμος, πιο ευέλικτος, πιο προσαρμόσιμος και κυρίως πιο ευκίνητος, πιο ικανός δηλαδή να μεταβιβάζεται και να διασπείρεται στο κόσμο των μικροοργανισμών, όχι μόνο μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους, αλλά και ανάμεσα σε διαφορετικά είδη. Μέσα σε περιβάλλον με έντονες πιέσεις, όπως είναι το νοσοκομειακό περιβάλλον με την χρήση πολλών και ισχυρών αντιβιοτικών, κάποια μικρόβια μπόρεσαν να λειτουργήσουν πολυσυλλεκτικά, να συγκεντρώσουν δηλαδή μέσα τους πολλαπλούς μηχανισμούς αντοχής, καθιστάμενα έτσι απρόσβλητα από τα περισσότερα εν χρήσει αντιβιοτικά.

Έτσι, στην εποχή των αντιβιοτικών, η επικινδυνότητα ενός μικροβίου δεν καθορίζεται μόνο από αυτήν καθ' αυτήν την παθογενετική ικανότητά του, αλλά και από την ικανότητά του να επιβιώνει σε δυσμενές περιβάλλον, αντέχοντας στην δράση των αντιβιοτικών και βρίσκοντας πρόσφορο έδαφος σε ευάλωτους και ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς να καθίσταται θανατηφόρο.

Οι εντερόκοκκοι, έχοντας αξιοσημείωτη συστασιακή αντοχή σε αρκετά αντιβιοτικά και αποκτώντας συνεχώς αυξανόμενη αντοχή σε άλλα, αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα μικροοργανισμών που ο ρόλος τους στην

παθογένεια των λοιμώξεων, την αντιμετώπιση και την έκβασή τους προσλαμβάνει ανησυχητικές διαστάσεις.

## 2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Το γένος *Enterococcus* κατατάσσεται στην οικογένεια *Streptococcaceae*, όπου συγκαταλέγονται κόκκοι θετικοί κατά gram, που παρουσιάζουν συνήθως στρεπτή διάταξη ή διάταξη κατά ζεύγη και δεν παράγουν καταλάση (230). Η οικογένεια *Streptococcaceae*, σύμφωνα με την κατά το έτος 1984 έκδοση του *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*, περιελάμβανε 10 γένη συμπεριλαμβανομένου και του γένους *Streptococcus*. Έκτοτε η οικογένεια *Streptococcaceae* υπέστη πολλές ανακατατάξεις και επεκτάσεις ώστε ο αριθμός των συμπεριλαμβανομένων ειδών να αυξηθεί. Μια τέτοια αναθεώρηση ανέδειξε τα εντεροκοκκικά είδη της ομάδος D των στρεπτοκόκκων που μέχρι προ τινός συμπεριλαμβάνονταν στο γένος *Streptococcus* (181), σε ξεχωριστό γένος (286, 287). Βάσει μελετών με DNA-rRNA υβριδισμό και ανάλυση ακολουθίας του rRNA, οι μικροοργανισμοί που κατατάσσονταν μέχρι πρότινος στο γένος *Streptococcus* διαιρέθηκαν σε τρία ξεχωριστά γένη: *Streptococcus*, *Enterococcus* και *Lactococcus* (287). Στο γένος *Enterococcus* εκτός από τα εντεροκοκκικά είδη της ομάδος D, κατατάχθηκαν και αρκετά νέα είδη με μεθόδους γενετικής ανάλυσης, μολονότι δεν πληρούν τις προδιαγραφές του παλιού ορισμού των εντεροκόκκων. Με βάση τον παλιό ορισμό ο χαρακτηρισμός ενός εντεροκοκκικού είδους στηρίζονταν στην ικανότητα ανάπτυξης σε 10°C και 45°C, ανάπτυξη παρουσία 6,5% NaCl, ανάπτυξη σε pH 9,6, επιβίωση στους 60°C για 30 min, ικανότητα υδρόλυσης της εσκουλίνης παρουσία χολής σε συγκέντρωση 40%, και παραγωγής pyrrolidonyl arylamidase (PYR) (286, 287, 292). Επιπρόσθετα τα εντεροκοκκικά είδη έπρεπε να περιέχουν στο κυτταρικό τους τοίχωμα το λιποτεichoϊκό αντιγόνο ομάδος D κατά Lancefield. Με την τρέχουσα ταξινόμηση σε πολλά από τα είδη που με μελέτες γενετικής κατατάχθηκαν στο γένος των εντεροκόκκων απουσιάζουν κάποια από το φαινοτυπικά αυτά

χαρακτηριστικά (328). Όμως τα περισσότερα από αυτά τα είδη δεν βρίσκονται συχνά σε κλινικά δείγματα ανθρώπων.

Τα σημαντικότερα είδη εντεροκόκκων παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1  
ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΑ ΕΙΔΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ ENTEROCOCCUS

<i>E. faecalis</i>	Το συχνότερο σε κλινικά δείγματα και στο έντερο του ανθρώπου. Βρίσκεται επίσης στο έντερο πουλερικών, βοοειδών, αιγοπροβάτων και άλλων ζώων
<i>E. faecium</i>	Εξ ίσου συχνό σε κλινικά δείγματα και έντερο ανθρώπου, καθώς και στην εντερική χλωρίδα ζώων.
<i>E. avium</i>	Απομονωθέν από έντερο πουλερικών, σκύλων και ανθρώπου. Παράγει H <sub>2</sub> S.
<i>E. durans</i>	Σπάνιο σε κλινικά δείγματα, βρίσκεται συνήθως σε γαλακτοκομικά προϊόντα.
<i>E. gallinarum</i>	Ένα από τα τρία κινητά είδη. Βρίσκεται στην εντερική χλωρίδα πουλερικών.
<i>E. casseliflavus</i>	Είναι κινητό και παράγει κίτρινη χρωστική. Απομονώθηκε από φυτά, έδαφος και κόπρανα πουλερικών.
<i>E. malodoratus</i>	Απομονώθηκε από τυρί Gouda και γαλακτοκομικά προϊόντα. Μοιάζει με <i>E. avium</i> και παράγει επίσης H <sub>2</sub> S.
<i>E. hirae</i>	Βρίσκεται στο έντερο ζώων και πουλερικών.
<i>E. raffinosus</i>	Μοιάζει με <i>E. avium</i> , απομονώθηκε από κλινικά δείγματα
<i>E. pseudoavium</i>	Επίσης συγγενές με <i>E. avium</i> .
<i>E. dispar</i>	Συγγενές με <i>E. hirae</i> .
<i>E. sulfureus</i>	Απομονώθηκε από φυτά, παράγει κίτρινη χρωστική.
<i>E. flavescens</i>	Κινητό, παράγει κίτρινη χρωστική, απομονώθηκε από κλινικά δείγματα.
<i>E. cecorum</i>	Βρίσκεται στο έντερο των πουλερικών, δεν έχει αντιγόνο ομάδος D, είναι PYR-αρνητικό και δεν αναπτύσσεται σε ζωμό με NaCl.
<i>E. columbae</i>	Απομονώθηκε από περιττώματα περιστεριών. Είναι επίσης PYR αρνητικό και δεν αναπτύσσεται παρουσία NaCl.
<i>E. saccharolyticus</i>	Έχει φαινοτυπικά χαρακτηριστικά εντεροκόκκου, αλλά δεν εκφράζει το αντιγόνο ομάδος D.

### 3. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ

Οι εντεροκόκκοι είναι μικρόβια αερόβια προαιρετικά αναερόβια. Αποτελούν σημαντικό μέρος της χλωρίδας του ανθρώπου και των ζώων. Αποβάλλονται από το έντερο και διασπείρονται στο περιβάλλον. Μπορεί επίσης να βρεθούν σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Στα κόπρανα του ανθρώπου βρίσκονται σε συγκέντρωση  $10^8$  cfu ανά γραμμάριο. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις μπορεί να βρεθούν στο λεπτό έντερο, στα χοληφόρα, στον κόλπο των γυναικών, στην ουρήθρα των ανδρών και στο δέρμα, κυρίως στην περιγεννητική περιοχή. Τα είδη που κυριαρχούν στην χλωρίδα του ανθρώπου είναι *E. faecalis* και *E. faecium*. Τα άλλα είδη σπανίως απομονώνονται από τον άνθρωπο, κυριαρχούν όμως στην εντερική χλωρίδα ποικίλων ζώων (230).

### 4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Από τα 16 αναφερόμενα είδη εντεροκόκκων, δύο είναι τα είδη που κυριαρχούν ως αίτια λοιμώξεων στον άνθρωπο: *E. faecalis*, που ενοχοποιείται για το 80-90% των εντεροκοκκικών λοιμώξεων στον άνθρωπο και *E. faecium*, που ευθύνεται για το 5-10% (191, 213, 273). Άλλα είδη εντεροκόκκου που έχουν απομονωθεί από κλινικά δείγματα ασθενών είναι τα: *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. avium*, και *E. raffinosus*. Όμως αυτά τα είδη στο σύνολό τους δεν αντιπροσωπεύουν αναλογία μεγαλύτερη από 5% του συνόλου των εντεροκόκκων που απομονώνονται από κλινικά δείγματα (191, 213, 273).

Οι παράγοντες που προσδίδουν παθογόνο δράση στους εντεροκόκκους δεν είναι απόλυτα γνωστοί. Ως τέτοιοι αναφέρονται:

- **κυτολυσίνη**, παράγεται από στελέχη *E. faecalis* και *E. faecium*, δρα ως αιμολυσίνη έναντι των ερυθροκυττάρων του ανθρώπου, του κονίκλου, του ίππου και των βοοειδών, αλλά όχι του προβάτου και είναι τοξική για αρκετά ευκαρυωτικά κύτταρα (57, 155).
- **Παράγων συσσώρευσης**, πρωτεΐνη επιφανείας που κωδικοποιείται από πλασμίδιο και προάγει την συνάθροιση μικροβιακών κυττάρων προς ανταλλαγή πλασμιδίων (57). Αυτή η ουσία πιστεύεται ότι βοηθά στην προσκόλληση του εντεροκόκκου στο εντερικό επιθήλιο, τα

νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα, αλλά και σε εκβλαστήσεις του ενδοκαρδίου σε πειραματικές ενδοκαρδίτιδες (57, 175).

- **Φερομόνες**, μικρά πεπτίδια που εκκρίνονται από τους εντεροκόκκους και προάγουν τη συζευκτική μεταφορά πλασμιδίων DNA μεταξύ των κυττάρων (62, 63). Φαίνεται επίσης ότι αυτές οι ουσίες μπορούν να δράσουν χημειοτακτικά στα ουδετερόφιλα και να ενισχύσουν έτσι τη φλεγμονώδη αντίδραση σε λοιμώξεις (99).
- **Λιποτεϊχοϊκά οξέα**, συνιστούν το αντιγόνο ομάδος D των εντεροκόκκων (326) και πιθανόν συμβάλλουν στην λοιμογόνο δράση τους επάγοντας την παραγωγή του παράγοντα νέκρωσης ιστών (tumor necrosis factor-TNF) .
- **Βακτηριοσίνη**, ουσία που κωδικοποιείται από πλασμίδιο 7,4-kDa και ασκεί βακτηριολυτική δράση σε ευρύ φάσμα gram θετικών και gram αρνητικών μικροβίων (159).
- **Ζελατινάση, υαλουρονιδάση**, εξωκυττάρια ένζυμα που παράγονται από στελέχη *E. faecalis* (201, 271).

## 5. ΣΥΖΕΥΞΗ

Εκτός από τους παράγοντες παθογενετικότητας των εντεροκόκκων σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η ικανότητά τους να αποκτούν πολλαπλούς μηχανισμούς αντοχής στα αντιβιοτικά. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω πολλών διακριτών **μηχανισμών σύζευξης** που διαθέτουν και κυρίως ο *E. faecalis*, πολλοί των οποίων είναι αρκετά κατανοητοί και άλλοι όχι.

Ο πλέον μελετημένος μηχανισμός σύζευξης είναι αυτός που γίνεται με τις **φερομόνες**. Συνοπτικά, στελέχη *E. faecalis* εκκρίνουν μέσα στο υλικό ανάπτυξης μικρά πεπτίδια (sex pheromones) ειδικά για διαφορετικούς τύπους πλασμιδίων (pheromone-responsive plasmid). Όταν ένα μικροβιακό κύτταρο που φέρει το ανάλογο απαντητικό πλασμίδιο έρθει σε επαφή με την αντίστοιχη φερομόνη, τότε ξεκινά η μεταγραφή ενός ειδικού γονιδίου στο πλασμίδιο που καταλήγει στην σύνθεση μιας ουσίας (παράγων συσσώρευσης), η οποία εμφανίζεται στην επιφάνεια του κυττάρου. Το κύτταρο αυτό λειτουργεί πλέον



σαν κύτταρο-δότης. Όταν προσκρούσει πάνω σε ένα άλλο μικροβιακό κύτταρο του ίδιου είδους αυτός ο παράγων συσώρευσης κολλά στην επιφάνεια του άλλου μικροβίου. Με μία διαδικασία που δεν έχει απόλυτα διευκρινιστεί, το απαντητικό στην φερομόνη πλασμίδιο μεταφέρεται από το μικροβιακό κύτταρο-δότη στο νέο μικροβιακό κύτταρο-δέκτη. Μόλις το κύτταρο δέκτης αποκτήσει το ειδικό πλασμίδιο, η σύνθεση της φερομόνης αναστέλλεται (63,87).

Ένα άλλο σύστημα σύζευξης, που επίσης δεν έχει πλήρως κατανοηθεί, αφορά πλασμίδια με ευρύ φάσμα ξενιστών, τα οποία μπορούν να μεταφερθούν μεταξύ ειδών εντεροκόκκων και άλλων gram θετικών βακτηριδίων, όπως στρεπτοκόκκων και σταφυλοκόκκων. Η συχνότητα μεταφοράς σε αυτήν την κατηγορία είναι πολύ χαμηλότερη απ' ό,τι με το σύστημα των φερομονών και σε πειραματικό επίπεδο επιτυγχάνεται καλύτερα μέσω φίλτρων, παρά σε ζωμό. Η σημασία αυτού του μηχανισμού έγκειται στο γεγονός ότι μπορούν να μεταφέρουν γονίδια αντοχής μεταξύ διαφορετικών ειδών (64).

Ένας τρίτος τύπος σύζευξης γίνεται με την βοήθεια μεταθετών στοιχείων σύζευξης (conjugative transposons). Αντίθετα με τα κοινά μεταθετά στοιχεία, που μπορούν να μεταπηδούν μέσα σε ένα μικροβιακό κύτταρο από μία θέση DNA σε κάποια άλλη, τα μεταθετά στοιχεία σύζευξης κωδικοποιούν την δυνατότητα σύζευξης μεταξύ διαφορετικών βακτηριακών κυττάρων (65). Καθώς τα πλασμίδια χρειάζονται ένα πιο σύνθετο μηχανισμό για αναδιπλασιασμό, τα μεταθετά στοιχεία μπορούν χωρίς διπλασιασμό να εισαχθούν στο μικροβιακό ή πλασμιδιακό γενετικό υλικό ενός καινούργιου ξενιστή. Αυτός ο μηχανισμός μεταφοράς παρουσιάζεται πιο ευέλικτος και πιο αποτελεσματικός τρόπος ευρύτερης διασποράς μηχανισμών αντοχής (232).

## **6. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ**

Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από τους εντεροκόκκους μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες:

1. Λοιμώξεις που προκαλούνται από την ενδογενή χλωρίδα του ασθενούς και συνήθως οφείλονται σε εντεροκόκκους που εκφράζουν

την φυσική (συστασιακή) αντοχή των εντεροκόκκων στα αντιβιοτικά (ενδογενείς λοιμώξεις).

2. Λοιμώξεις που προκαλούνται στο νοσοκομειακό περιβάλλον και συχνά οφείλονται σε στελέχη με πολλαπλούς επίκτητους μηχανισμούς αντοχής στα αντιβιοτικά (εξωγενείς νοσοκομειακές λοιμώξεις).

Από την δεκαετία του '80 πολλές μελέτες αποσκοπούν στον προσδιορισμό της συμμετοχής των εντεροκόκκων στην ανάπτυξη των λοιμώξεων. Μία μελέτη στα νοσοκομεία του Nottingham προσδιορίζει την συμμετοχή των εντεροκόκκων σαν μοναδικό αίτιο βακτηριαιμίας στο 2,1% των ασθενών με βακτηριαιμία (158). Την ίδια εποχή μελέτες στις ΗΠΑ αναφορικά με τα αίτια των νοσοκομειακών λοιμώξεων δείχνουν ότι η συμμετοχή των εντεροκόκκων προσδιορίζεται σταθερά στο 7% (207) και ανιχνεύουν μια αυξητική τάση στην επίπτωση των νοσοκομειακών λοιμώξεων από εντερόκοκκο (200), γεγονός που αποδίδεται στην επικρατούσα τότε τάση να χορηγούν κεφαλοσπορίνες για την θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων (137).

Η συμμετοχή των εντεροκόκκων στις νοσοκομειακές λοιμώξεις εμφανίζεται ολοένα και μεγαλύτερη. Οι εντερόκοκκοι αναδεικνύονται το δεύτερο κατά σειράν αίτιο νοσοκομειακών ουρολοιμώξεων και λοιμώξεων τραυμάτων, ενώ αναδεικνύονται ως το τρίτο αίτιο νοσοκομειακής βακτηριαιμίας (213, 229, 230, 285)

Αναφορικά με την εντόπιση οι εντεροκοκκικές λοιμώξεις μπορούν να διαχωριστούν στις εξής μορφές:

1. **Λοιμώξεις ουροποιητικού.** Πρόκειται συνήθως για κυστίτιδες, πυελονεφρίτιδες, προστατίτιδες και περινεφρικά αποστήματα που συχνά εμφανίζονται ως νοσοκομειακές λοιμώξεις ή σχετίζονται με την χρήση ουροκαθετήρων και την παρουσία ανατομικών ανωμαλιών (176, 225).
2. **Ενδοκοιλιακές λοιμώξεις και λοιμώξεις ελάσσονος πυέλου.** Πρόκειται συνήθως για μικτές λοιμώξεις, στην παθογένεση των οποίων συμβάλλουν και άλλα αερόβια ή αναερόβια μικρόβια της εντερικής χλωρίδας. Εντεροκοκκική περιτονίτις μπορεί να συμβεί αυτόματα ή να σχετίζεται με περιτοναϊκή κάθαρση. Είναι δυνατόν επίσης να προκύψουν λοιμώξεις

γυναικολογικές, όπως ενδομητρίτιδες, οξεία πυελική φλεγμονή, επιλόχειος λοίμωξη, καθώς και ενδοκοιλιακά αποστήματα, μετεγχειρητικά ή μετατραυματικά (85, 230, 241).

3. **Βακτηριαιμίες.** Οι βακτηριαιμίες από εντερόκοκκο είναι συνήθως δευτεροπαθείς, λόγω εισόδου στην κυκλοφορία του αίματος από κάποια πρωτοπαθή εστία λοίμωξης (138).
4. **Ενδοκαρδίτιδες.** Οι εντερόκοκκοι ενοχοποιούνται για το 5-20% όλων των περιπτώσεων ενδοκαρδίτιδας, είναι δε το πέμπτο κατά σειρά συχνότητας αίτιο ενδοκαρδίτιδας σε προσθετικές βαλβίδες. Στην κλινική τους έκφραση οι εντεροκοκκικές ενδοκαρδίτιδες είναι υποξείες (208, 230).
5. **Νεογνική σηψαιμία και μηνιγγίτιδα.** Έχει την μορφή οξείας και πρώιμης νόσου που εκδηλώνεται με πυρετό και αναπνευστική δυσχέρεια. Αφορά συχνότερα τα πρόωρα, ιδιαίτερα όταν φέρουν ενδαγγειακούς καθετήρες και σωλήνες θρέψης (17).
6. **Μηνιγγίτιδα ενηλίκων.** Πρόκειται για μια σπάνια εκδήλωση εντεροκοκκικής λοίμωξης που μπορεί να αναπτυχθεί όταν υπάρχει σοβαρή υποκείμενη νόσος, όπως κακοήθεια, σακχαρώδης διαβήτης, νεφρική ανεπάρκεια, ή θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά. Περίπου το ένα τρίτο των περιπτώσεων φέρουν τραύμα στο κεντρικό νευρικό σύστημα (λόγω ατυχήματος, τραυματισμού από πυροβόλο όπλο, ή μετά από χειρουργική επέμβαση), ενώ άλλο ένα τρίτο των ασθενών παρουσιάζουν πρωτοπαθή εντεροκοκκική λοίμωξη σε άλλη θέση (297).

## 7. ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Ένας από τους σημαντικότερους λόγους που καθιστούν τους εντεροκόκκους ικανούς να επιβιώνουν στο νοσοκομειακό περιβάλλον είναι η φυσική τους αντοχή σε αρκετά από τα εν χρήσει αντιβιοτικά. Παράλληλα όμως με την φυσική αντοχή διαθέτουν την ικανότητα να αποκτούν επιπρόσθετες αντοχές, είτε κατόπιν μεταλλάξεων, είτε με την πρόσληψη γενετικού υλικού από άλλα βακτήρια που μεταφέρεται μέσω πλασμιδίων και μεταθετών στοιχείων (62).

## 7.1. Φυσική αντοχή

### **Β-λακτάμες:**

Οι εντερόκοκκοι παρουσιάζουν φυσική (συστασιακή) αντοχή σε όλες τις κεφαλοσπορίνες και εμφανίζουν υψηλότερες MICs στην πενικιλίνη και αμπικιλίνη σε σχέση με τους άλλους στρεπτοκόκκους. Σε γενικές γραμμές, εντερόκοκκοι του είδους *E. faecalis* είναι 10 ως 100 φορές λιγότερο ευαίσθητοι στην πενικιλίνη από τα είδη των στρεπτοκόκκων, ενώ του είδους *E. faecium* είναι τουλάχιστον 4 ως 16 φορές λιγότερο ευαίσθητοι από το είδος *E. faecalis*. Η τιμή MIC της αμπικιλίνης για το είδος *E. faecalis* κυμαίνεται από 0,5 έως 8 µg/ml, ενώ για το είδος *E. faecium* συνήθως κυμαίνεται από 16 έως 64 µg/ml, ενώ μερικές φορές μπορεί να είναι και υψηλότερη. Αυτές οι αντοχές οφείλονται στο γεγονός ότι οι πενικιλινο-συνδετικές πρωτεΐνες (PBPs) που εντοπίζονται στο κυτταρικό τοίχωμα των εντεροκόκκων εμφανίζουν ελαττωμένη τάση σύνδεσης (affinity) προς τις πενικιλίνες (114, 116, 329). Επιπρόσθετα, ακόμα και αν οι β-λακτάμες εμφανίζονται δραστικές, δεν ασκούν βακτηριοκτόνο δράση έναντι των περισσοτέρων εντεροκοκκικών ειδών. Ωστόσο, εφ' όσον η MIC παραμένει σε σχετικά χαμηλά επίπεδα ( $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ ), μπορούν να χρησιμοποιηθούν θεραπευτικά σε αυξημένες δόσεις και σε συνδυασμό με άλλα αντιβιοτικά, όπως αμινογλυκοσίδες, προκειμένου να δώσουν βακτηριοκτόνο συνέργεια.

### **Αμινογλυκοσίδες:**

Καθώς η πρόσληψη αμινογλυκοσιδών από τα βακτήρια απαιτεί ενέργεια που παράγεται οξειδωτικά, η φυσική αντοχή των εντεροκόκκων στις αμινογλυκοσίδες οφείλεται στην μειωμένη ενεργητική διάβαση του εντεροκοκκικού κυτταρικού τοιχώματος από τις αμινογλυκοσίδες, εξ αιτίας της χαμηλής παροχής ενέργειας στη μεμβράνη (35). Όμως, δεν υφίσταται κάποια περαιτέρω αδυναμία δράσης στο στόχο των αμινογλυκοσιδών που είναι τα ριβοσώματα. Αυτός ο τύπος φυσικής αντοχής καλείται χαμηλού επιπέδου αντοχή, γιατί οι MICs των αμινογλυκοσιδών είναι σχετικά χαμηλές (για στρεπτομυκίνη και καναμυκίνη  $< 2000 \mu\text{g/ml}$  και για γενταμικίνη  $< 500 \mu\text{g/ml}$ ).

Αυτή η φυσική αντοχή χαμηλού επιπέδου έχει ως αποτέλεσμα η συνέργεια των αμινογλυκοσιδών με την πενικιλίνη να είναι βακτηριοκτόνος, γιατί η αδυναμία σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος που επιφέρει η πενικιλίνη επιτρέπει την είσοδο στις αμινογλυκοσίδες, ώστε να βρουν τον στόχο τους στο εσωτερικό του μικροβιακού κυττάρου (215). Η ίδια ακριβώς συνέργεια αναπτύσσεται και όταν η πενικιλίνη αντικατασταθεί από άλλα αντιβιοτικά με δράση στο βακτηριακό τοίχωμα.

Επιπρόσθετα όμως, όλα τα στελέχη *E. faecium* παράγουν 6'-ακετυλτρανσφεράση των αμινογλυκοσιδών (AAC6'), που κωδικοποιείται από το χρωμοσωμιακό γονίδιο *aac(6')-Ii*, το οποίο τροποποιεί τις περισσότερες από τις αμινογλυκοσίδες (με εξαίρεση την στρεπτομυκίνη και την γενταμικίνη), έχοντας ως άριστο υπόστρωμα την καναμυκίνη (70). Η παραγωγή αυτού του ενζύμου έχει σαν συνέπεια την απώλεια συνέργειας μιας πενικιλίνης, ή ενός γλυκοπεπτιδίου με μια αμινογλυκοσίδη, εκτός από εκείνες που δεν αποτελούν υπόστρωμα για το εν λόγω ένζυμο, όπως η στρεπτομυκίνη και η γενταμικίνη. Είναι παράδοξο ότι η συνέργεια με την αμικασίνη δεν παρεμποδίζεται, ενώ είναι γνωστό ότι αποτελεί και αυτή υπόστρωμα του ενζύμου (214).

#### **Σουλφοναμίδες και τριμεθοπρίμη:**

Αν και *in vitro* οι εντερόκοκκοι μπορούν να εμφανισθούν ευαίσθητοι στις σουλφοναμίδες, εν τούτοις *in vivo* μπορούν να παρακάμψουν τον κύκλο βιοσύνθεσης του φυλλικού, όπως στα ούρα, όπου μπορούν να χρησιμοποιήσουν εξωγενές φυλλικό και έτσι να καταστούν ανθεκτικοί (185)

#### **Λινκοζαμίνες:**

Η ενδογενής αντοχή του *E. faecalis* στην κλινδαμυκίνη είναι χρήσιμη για την ταυτοποίηση αυτού του είδους (185)

#### **Γλυκοπεπτίδια :**

Τρία είδη εντεροκόκκων (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*) εμφανίζουν φυσική αντοχή χαμηλού επιπέδου στην βανκομυκίνη ( MIC κυμαίνεται από 8 ως 32  $\mu\text{g/ml}$  ) και ευαισθησία στην τεϊκοπλανίνη. Αυτά τα τρία είδη είναι τα κινητά είδη εντεροκόκκου, ιδιότητα που τα διαχωρίζει φαινοτυπικά από τα άλλα είδη. Αυτός είναι ο φαινότυπος Van-C σε

αντιδιαστολή προς τους άλλους φαινοτύπους που προσδιορίζουν επίκτητη μεταφερόμενη αντοχή. Σε γονιδιακό επίπεδο τα ειδικά γονίδια αντοχής στα γλυκοπεπτίδια *vanC1*, *vanC2*, και *vanC3* είναι ειδικά για τα είδη *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* και *E. flavescens* αντίστοιχα (186, 189, 190, 238).

## **7. 2. Επίκτητες αντοχές στα αντιβιοτικά**

### **B-λακτάμες**

Περαιτέρω αύξηση της αντοχής των εντεροκόκκων στην πενικιλίνη και αμπικιλίνη έχει αναπτυχθεί επίκτητα (131) και οφείλεται σε δύο κυρίως μηχανισμούς.

α) **παραγωγή πενικιλινάσης** περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1983 σε ένα στέλεχος *E. faecalis* που απομονώθηκε από κάποιον ασθενή στο Τέξας των ΗΠΑ (233). Από τότε περιγράφηκαν αρκετές περιπτώσεις στελεχών *E. faecalis* που παράγουν πενικιλινάση, αλλά καμία *E. faecium*. Η αντοχή που οφείλεται σε παραγωγή β-λακταμάσης συνήθως συνδυάζεται με υψηλού επιπέδου αντοχή στην βανκομυκίνη (228). Η παραγωγή πενικιλινάσης δεν προσδίδει ιδιαίτερα αυξημένες MICs σε πενικιλίνη και αμπικιλίνη, γι' αυτό και μπορεί να διαφύγει αν δεν γίνει δοκιμασία ανίχνευσης της παραγωγής πενικιλινάσης, όπως με την μέθοδο διάσπασης της χρωμογόνου κεφαλοσπορινάσης νιτροζεφίνης. Η δράση της πενικιλινάσης αναστέλλεται από τους αναστολείς των β-λακταμασών, όπως κλαβουλανικό οξύ, σουλβακτάμη, ταζομπακτάμη. Το γονίδιο που καθορίζει την παραγωγή της πενικιλινάσης του εντεροκόκκου είναι όμοιο με το γονίδιο *blazZ* που κωδικοποιεί την τύπου A πενικιλινάση του σταφυλόκοκκου (346), γι' αυτό η απόκτηση της ικανότητας παραγωγής πενικιλινάσης από *E. faecalis* αποδίδεται στην μεταφορά του αντίστοιχου οπερονίου από τον *Staphylococcus aureus* (269). Ωστόσο αυτός ο μηχανισμός αντοχής είναι αρκετά σπάνιος.

Η ανάλυση με PFGE των εντεροκόκκων που παράγουν πενικιλινάση έδειξε ότι πολλά απομονωθέντα στελέχη σε διαφορετικά νοσοκομεία των ΗΠΑ προέρχονταν από τον ίδιο κλώνο καθόσον έδωσαν πανομοιότυπα ή παρεμφερή πρότυπα (pattern). Έτσι τα στελέχη εντεροκόκκων που παράγουν πενικιλινάση

είναι λίγα και στα νοσοκομεία που εμφανίστηκαν παρουσίασαν μονοκλωνική ή ολιγοκλωνική διασπορά (232).

β) **αλλαγή στις πενικιλλινο-συνδεδετικές πρωτεΐνες.** Η πλειονότητα των στελεχών *E. faecium* εμφανίζουν επιπρόσθετη αντοχή σε πενικιλίνη και αμπικιλίνη χωρίς να παράγουν κάποια πενικιλινάση. Αυτή η αντοχή αποδίδεται σε αλλαγές στις πενικιλλινο-συνδεδετικές πρωτεΐνες (PBPs) και κυρίως στην PBP 5, που αφορούν τόσο τα επίπεδα παραγωγής, όσο και την τάση σύνδεσής της (affinity) (115). Είναι γνωστό ότι η PBP 5 μπορεί να διεκπεραιώσει όλες τις λειτουργίες που σχετίζονται με την σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος παρουσία πενικιλίνης (329). Η παραγωγή μεταλλακτών που να αδυνατούν να παράγουν την PBP 5, λόγω απώλειας του αντίστοιχου *pbp5* γονιδίου, καταλήγει σε υπερευαίσθητα στην πενικιλίνη στελέχη (96). Αντίθετα τα στελέχη που εμφανίζουν επιπρόσθετη αντοχή είναι μεταλλάκτες που παρουσιάζουν είτε αυξημένη παραγωγή PBP 5 λόγω εξάλειψης του σχετικού ρυθμιστικού γονιδίου (*psr*) (193), είτε παραγωγή PBP 5 με ακόμη μικρότερη τάση σύνδεσης λόγω μετάλλαξης στο γονίδιο *pbp5* (275).

Όλα σχεδόν τα στελέχη *E. faecium* που έχουν αντοχή στην βανκομυκίνη, έχουν ταυτόχρονα και αντοχή υψηλού επιπέδου στην αμπικιλίνη. Αυτή η φαινοτυπική σύνδεση των δύο αντοχών βρέθηκε να έχει και γενετική βάση. Και το δύο γονίδια *pbp5* και *vanB* βρέθηκαν συνδεδεμένα μέσα στο χρωμόσωμα επειδή ένα VanB transposon (Tn5382) εισήχθη μέσα στο χρωμόσωμα ακριβώς μετά το *pbp5* γονίδιο. Και τα δύο γονίδια βρέθηκαν πάνω σε ένα μεγάλο μεταθετό στοιχείο που μπορούσε εύκολα να μεταφερθεί μεταξύ των στελεχών *E. faecium*. Και αυτό το μεγαλύτερο μεταθετό στοιχείο διασκορπίστηκε ευρύτατα και βρέθηκε πάνω σε στελέχη *E. faecium* που δεν είχαν κλωνική συσχέτιση μεταξύ τους (146). Ωστόσο έχει παρατηρηθεί και το φαινόμενο της συνέργιας αμπικιλίνης-βανκομυκίνης σε στελέχη VRE με χαμηλού επιπέδου αντοχή στην αμπικιλίνη. Το φαινόμενο αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι, παρουσία βανκομυκίνης, το στέλεχος αντικαθιστά την PBP 5 από άλλες PBPs με μεγαλύτερο μοριακό βάρος και μικρότερη τάση σύνδεσης με την αμπικιλίνη (4).

### **Υψηλού επιπέδου αντοχή στις αμινογλυκοσίδες (High-Level Aminoglycosides Resistance, HLR)**

Κατά την δεκαετία του 1970 παρατηρήθηκε ότι ο συνδυασμός πενικιλλίνης-στρεπτομυκίνης έχασε την συνεργική του δράση έναντι πολλών εντεροκόκκων. Μελέτες έδειξαν ότι αυτά τα στελέχη είχαν αποκτήσει μια επιπρόσθετη αντοχή στην στρεπτομυκίνη, πέραν της φυσικής αντοχής χαμηλού επιπέδου που οφείλεται στην μειωμένη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος των εντεροκόκκων από τις αμινογλυκοσίδες. Η ελαχίστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) της στρεπτομυκίνης για τα στελέχη αυτά βρέθηκε >2000μg/ml. Αυτός ο τύπος αντοχής ονομάστηκε υψηλού επιπέδου αντοχή (HLR) (189, 229) .

Μέχρι το 1977 αντοχή υψηλού επιπέδου σε καναμυκίνη και αμικασίνη είχε επίσης περιγραφεί, όχι όμως και στην γενταμικίνη και τομπραμικίνη. Αυτό το είδος της αντοχής περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1979 σε μελέτη από την Γαλλία (152) και ακολούθησε καταιγισμός ανακοινώσεων σε άλλες Ευρωπαϊκές και Αμερικανικές μελέτες (40, 137, 278).

Η υψηλού επιπέδου αντοχή των εντεροκόκκων στις αμινογλυκοσίδες επιτυγχάνεται με τρεις ξεχωριστούς μηχανισμούς: μετάλλαξη του στόχου (ριβωσώματα) ώστε αυτά να γίνουν ανθεκτικά στην ανασταλτική δράση των αμινογλυκοσιδών, παρακώλυση στην μεταφορά του αντιβιοτικού και σε αδρανοποίηση των αμινογλυκοσιδών από παραγόμενα τροποποιητικά ένζυμα. Οι δύο πρώτοι μηχανισμοί οφείλονται σε χρωμοσωμιακές μεταλλάξεις, ενώ ο τρίτος σε πλασμιδιακά μεταφερόμενα γονίδια (73, 185, 189).

Η αδρανοποίηση των αμινογλυκοσιδών επιτυγχάνεται, είτε με αδενυλίωση (αδενυλ-τρανσφεράσες, adenyltransferase-ANT), είτε με ακετυλίωση (ακετυλ-τρανσφεράσες, acetyltransferase-AAC), είτε με φωσφοριλίωση (φωσφο-τρανσφεράσες, phosphotransferase-APH). Άλλοτε η δράση των ενζύμων είναι εκλεκτική και αφορά συγκεκριμένη αμινογλυκοσίδη και άλλοτε η δράση τους επεκτείνεται και σε άλλα ομοειδή μόρια ώστε να καθίστανται ανενεργά αρκετά αντιβιοτικά της ομάδος των αμινογλυκοσιδών. Η αδενυλ-τρανσφεράση της



στρεπτομυκίνης (ANT-SM) αδρανοποιεί μόνον την στρεπτομυκίνη, ενώ 6'-ακετυλ-τρανσφεράση (AAC-6') αδρανοποιεί καναμυκίνη, τομπραμικίνη και νετιλμικίνη. Παράλληλα βρέθηκε ένα ένζυμο διπλής λειτουργίας που εμφανίζει ταυτόχρονα δράση 6'-ακετυλτρανσφεράσης και 2''-φωσφοτρανσφεράσης (6' AAC-2'' APH) που αδρανοποιεί γενταμικίνη, καναμυκίνη, τομπραμικίνη, αμικασίνη και στρεπτομυκίνη. Το ένζυμο αυτό είχε προηγουμένως ευρεθεί παραγόμενο από *Staphylococcus aureus* και *Staphylococcus epidermidis* (73, 110, 185, 189).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα τροποποιητικά αυτά ένζυμα εδράζονται συνήθως σε πλασμίδια. Ωστόσο είναι γνωστό ότι ο *E. faecium* παράγει μια χρωμοσωμιακή 6'-ακετυλτρασφεράση (AAC-6') που αδρανοποιεί καναμυκίνη, τομπραμικίνη, αμικασίνη, νετιλμικίνη, και σισομικίνη εξουδετερώνοντας έτσι την συνέργεια αυτών με την πενικιλίνη. Φαινοτυπικά αυτό εμφανίζεται ως υψηλού επιπέδου αντοχή στην καναμικίνη (MIC>2000), ενώ οι άλλες συναφείς αμινογλυκοσίδες πιθανόν να εμφανίζουν MICs <2000, όμως δεν έχουν συνέργεια με την πενικιλίνη και αν χρησιμοποιηθούν θεραπευτικά αποτυγχάνουν. Το πιο ενδιαφέρον όμως είναι ότι πιθανόν να μην φαίνεται in vitro η αντοχή αυτή, γι' αυτό όλα τα στελέχη *E. faecium* πρέπει να θεωρούνται ως έχοντα αυτήν την αντοχή ακόμη κι' αν δεν εκφράζεται in vitro (70, 214).

Κατά την εποχή που πρωτοεμφανίστηκε η αντοχή υψηλού επιπέδου στις αμινογλυκοσίδες οι μοριακές μέθοδοι επιδημιολογικής διερεύνησης ήταν περιορισμένες. Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν σημαντική ετερογένεια μεταξύ των πλασμιδίων που φέρουν γονίδια αντοχής υψηλού επιπέδου στην γενταμικίνη (232).

Συχνά γονίδια τροποποιητικών ενζύμων βρίσκονται στο ίδιο πλασμίδιο και μεταφέρονται μαζί. Με όλους αυτούς τους μηχανισμούς έχουν προκύψει στελέχη εντεροκόκκων έναντι των οποίων καμιά αμινογλυκοσίδη δεν μπορεί να δράσει συνεργικά. Αυτό το γεγονός σε συνδυασμό με την αντοχή σε πενικιλίνη και αμπικιλίνη οδήγησε στην εγκατάλειψη του γνωστού θεραπευτικού σχήματος πενικιλίνη-αμινογλυκοσίδη και στην ανάδειξη των γλυκοπεπτιδίων (βανκομυκίνης, τεϊκοπλανίνης) σε θεραπεία πρώτης εκλογής (185).

## 8. ANTOXH STA GLYKOPEPTIDIA

### 8.1. Ιστορική αναδρομή

Η βανκομυκίνη ανακαλύφθηκε το 1956 και άρχισε να χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη από το 1958, όμως η χρήση της ήταν περιορισμένη ως την δεκαετία του 1970, οπότε και άρχισε να χρησιμοποιείται στην θεραπεία των εντεροκόκκων (109). Ευρύτατη χρήση της βανκομυκίνης έγινε κατά την δεκαετία 1980 (137). Η τεϊκοπλανίνη είναι ένα άλλο γλυκοπεπτίδιο που χρησιμοποιήθηκε στην Ευρώπη για την θεραπεία του μεθικιλίνη ανθεκτικού σταφυλόκοκκου.

Φυσική αντοχή στα γλυκοπεπτίδια διαθέτουν τα γένη *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.* και από τα gram θετικά βακτηρίδια οι γαλακτοβάκιλλοι (107). Φυσική αντοχή χαμηλού επιπέδου μόνο στην βανκομυκίνη διαθέτουν, όπως έχει προαναφερθεί, τα εντεροκοκκικά είδη *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* και *E. flavescens*.

Μετά από μία τριακονταετή χρήση των γλυκοπεπτιδίων, το 1988, οι Uttley και συν. ανακοίνωσαν την απομόνωση για πρώτη φορά στην Αγγλία εντεροκόκκων ανθεκτικών στην βανκομυκίνη (311). Ακολούθησαν ανάλογες ανακοινώσεις σε Ηνωμένο Βασίλειο, Γαλλία και Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής. Πολύ γρήγορα οι ανθεκτικοί στην βανκομυκίνη εντερόκοκκοι (vancomycin resistant enterococci, VRE) διεσπάρησαν παγκοσμίως προκαλώντας σοβαρά θεραπευτικά προβλήματα (160).

Η πιο ανησυχητική διάσταση του προβλήματος είναι η δυνατότητα μεταφοράς του μηχανισμού αντοχής, όχι μόνο μεταξύ των ειδών εντεροκόκκου, αλλά και μεταξύ άλλων gram θετικών βακτηριδίων. Ο κίνδυνος αυτός διαπιστώθηκε πολύ νωρίς (1988), όταν οι Leclercq και συν διαπίστωσαν ότι τα γονίδια αντοχής στα γλυκοπεπτίδια φέρονταν πάνω σε πλασμίδια (pIP819, pIP821) και μάλιστα στο δεύτερο πλασμίδιο συνυπήρχαν με γονίδια αντοχής στα MLS (macrolides, lincosamines, synergistines). Τα πλασμίδια αυτά μπορούσαν να μεταφερθούν μεταξύ διαφορετικών ειδών εντεροκόκκου, αλλά σε πειραματικές συνθήκες μεταβιβάστηκαν και σε άλλα gram θετικά μικρόβια

όπως: *S. sanguis*, *L. lactis*, *S. pyogenes*, και *L. monocytogenes*, επισημαίνοντας έτσι τον κίνδυνο ευρύτερης διασποράς σε περισσότερα γένη μικροβίων (188). Η ανεύρεση μεταθετών στοιχείων σε κλινικά στελέχη *Staphylococcus aureus* με αντοχή στην βανκομυκίνη όμοιων με αυτά του VRE ενισχύει την ανησυχία για αυτόν τον κίνδυνο (61).

## **8. 2. Δράση της βανκομυκίνης στη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης.**

Το σημείο δράσης των γλυκοπεπτιδίων είναι η σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης. Η πεπτιδογλυκάνη η οποία προσδίδει στερεότητα και λειτουργική σταθερότητα στο μικροβιακό κύτταρο, αποτελείται από ένα πλέγμα όπου οι παράλληλες γραμμές σχηματίζονται από εναλλασσόμενα μόρια N-ακετυλογλυκοζαμίνης και N-ακετυλομουραμικού οξέος συνδεδεμένα με δεσμό β-1,4. Μικρές τετραπεπτιδικές αλυσίδες αποτελούμενες από D- και L- αμινοξέα συνδέονται με το N-ακετυλομουραμικό οξύ μέσω πεπτιδικού δεσμού σχηματίζοντας γέφυρες ανάμεσα στις παράλληλες γραμμές. Η πεπτιδογλυκάνη αποτελεί το 80% του τοιχώματος των gram θετικών βακτηρίων, δημιουργεί ένα παχύ περίβλημα εξωτερικά της κυτταρικής μεμβράνης και είναι καθοριστική για την βιωσιμότητα του μικροβιακού κυττάρου (95).

Η βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης διεξάγεται σε πολλά στάδια, αρχής γενομένης στο κυτταρόπλασμα, για να ολοκληρωθεί έξω από την κυτταρική μεμβράνη. Το τελικό στάδιο της διαδικασίας είναι ο σχηματισμός των τετραπεπτιδικών γεφυρών που συνδέουν μεταξύ τους τις παράλληλες αλυσίδες ώστε να σχηματισθεί το στερεό πλέγμα της πεπτιδογλυκάνης. Αυτή η διαδικασία ξεκινά με την ένωση δύο μορίων D-αλανίνης που ενώνονται με την βοήθεια μιας λιγκάσης ώστε να σχηματισθεί το διπεπτίδιο D-Ala-D-Ala. Αυτό με την σειρά του προστίθεται στο UDP-N-acetylmuramyl-tripeptide για να σχηματίσει UDP-N-acetylmuramyl-pentapeptide. Η τελική ενσωμάτωση του UDP-N-acetylmuramyl-pentapeptide στην πεπτιδογλυκάνη (transglycosylation) καταλήγει στον σχηματισμό των γεφυρών (transpeptidation). Η τρανσπεπτιδίωση, όπου ένα τερματικό μόριο γλυκίνης πάνω σε μια πλευρική

αλυσίδα πενταγλυκίνης συνδέεται με τη d-αλανίνη μιας παρακείμενης αλυσίδας, απελευθερώνοντας ένα δεύτερο μόριο d-αλανίνης γίνεται με την βοήθεια μιας τρανσπεπτιδάσης (95). Η τρανσπεπτιδάση που είναι συνδεδεμένη πάνω στην κυτταρική μεμβράνη, συγκαταλέγεται στην οικογένεια των ενζύμων που είναι γνωστά ως πενικιλίνο-συνδετικές πρωτεΐνες (penicillin-binding proteins, PBPs).

Ο τρόπος δράσης των γλυκοπεπτιδίων είναι να συνδέονται στο d-αλανίνη-d-αλανίνη άκρο του πενταπεπτιδίου που αποτελεί πρόδρομο δομικό στοιχείο για την πεπτιδογλυκάνη επειδή τα γλυκοπεπτίδια έχουν δομικές και λειτουργικές ομοιότητες με την d-alanyl-d-alanyl τρανσπεπτιδάση. Αυτή η λάθος σύνδεση μπλοκάρει την παραπέρα σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης και καταλήγει στην καταστροφή του μικροβιακού κυττάρου (13).

Η αντοχή στην βανκομυκίνη προκύπτει όταν αντί να συντεθεί το αναμενόμενο πενταπεπτίδιο με την κατάληξη D-Ala-D-Ala, συντίθεται πενταπεπτίδιο που καταλήγει σε D-Ala-D-Lac, με το οποίο η βανκομυκίνη έχει πολύ μικρότερη τάση σύνδεσης. Έτσι η σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης δεν παρακωλύεται.

### **8.3. Περιγραφή φαινοτύπων**

Ως τώρα έχουν ταυτοποιηθεί 5 φαινότυποι αντοχής στην βανκομυκίνη, VanA, VanB, VanC, VanD και VanE (5, 72, 112, 256).

Ο φαινότυπος **VanA** εμφανίζεται ως επίκτητη και επαγωγίμη αντοχή υψηλού επιπέδου στην βανκομυκίνη (MICs >64μg/ml) και την τεϊκοπλανίνη (MICs >=16μg/ml) (5). Η επαγωγή της αντοχής μπορεί να προκληθεί από γλυκοπεπτίδια (βανκομυκίνη, τεϊκοπλανίνη, αβοπαρσίνη και ριστοσετίνη), αλλά και από μη γλυκοπεπτιδικά αντιβιοτικά, όπως βακιτρακίνη και πολυμυξίνη B (50).

Ο φαινότυπος **VanB**, όπως αρχικά εμφανίστηκε, χαρακτηρίζονταν από επαγωγίμη, αλλά ενδιάμεση αντοχή στην βανκομυκίνη (MICs, 32-64μg/ml) και ευαισθησία στην τεϊκοπλανίνη (5). Σήμερα όμως είναι γνωστό ότι τα επίπεδα

αντοχής στην βανκομυκίνη μπορεί να είναι πολύ υψηλά ( $4 \rightarrow 1024 \mu\text{g/ml}$ ), ενώ η ευαισθησία στην τεϊκοπλανίνη διατηρείται (50).

Ο φαινότυπος **VanC** αφορά την φυσική συστασιακή αντοχή χαμηλού επιπέδου στην βανκομυκίνη (MICs,  $4-32 \mu\text{g/ml}$ ) με ευαισθησία στην τεϊκοπλανίνη που παρουσιάζουν τα είδη του εντεροκόκκου *E. gallinarum* και *E. casseliflavus/flavescens* (5).

Ωστόσο προέκυψαν αρκετές διαφοροποιήσεις στο αρχικό τυπικό αυτό σχήμα. Σήμερα είναι γνωστό ότι στελέχη *E. gallinarum* και *E. casseliflavus/flavescens* μπορεί να εμφανίσουν επίκτητο μηχανισμό αντοχής τύπου VanA (88). Σε στελέχη *E. avium* έχει περιγραφεί αντοχή τύπου VanA που όμως εκφράζεται με χαμηλά επίπεδα αντοχής στην βανκομυκίνη (MIC  $16 \mu\text{g/ml}$ ) (272) ενώ έχουν περιγραφεί μεταλλάκτες προερχόμενοι από VanB στελέχη που εκφράζουν αντοχή και στην τεϊκοπλανίνη και δεν μπορούν να ξεχωρίσουν φαινοτυπικά από VanA στελέχη (149). Εντούτοις το σχήμα φαινοτυπικού χαρακτηρισμού της αντοχής παραμένει ακόμη χρήσιμο επειδή συνήθως αντιστοιχεί στην γονοτυπική ταξινόμηση και μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες με απλό και όχι δαπανηρό τρόπο για τον μηχανισμό αντοχής.

#### **7. 4. Γονοτυπικός χαρακτηρισμός και μηχανισμός των τύπων αντοχής**

##### **VanA**

Η γενετική βάση του VanA φαινοτύπου αντοχής είναι ένα σύμπλεγμα (cluster) γονιδίων που εδράζεται πάνω σε ένα μεταθετό στοιχείο (10.581-bp transposon, Tn1546) το οποίο συνήθως φέρεται πάνω σε πλασμίδιο (9). Η τελική κατάληξη της έκφρασης αυτού του συμπλέγματος έχει σαν συνέπεια, κατά την σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, η πρόδρομη πενταπεπτιδική μονάδα αντί να καταλήγει σε D-Ala-D-Ala, να έχει σαν κατάληξη D-Ala-D-Lactate. Όμως, η βανκομυκίνη έχει πολύ μικρότερη τάση σύνδεσης προς αυτό το καταληκτικό διπεπτίδιο (37). Τα επιμέρους γονίδια που συναρτίζουν το σύμπλεγμα είναι: *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanX*, και *vanZ*. Η αλληλουχία των

γεγονότων έχει ως ακολούθως: η πρωτεΐνη VanA είναι μία λιγκάση με τροποποιημένη ειδικότητα υποστρώματος, ώστε να παράγει D-Ala-D-Lac (38). Η πρωτεΐνη VanH είναι μία D-hydroxy acid dehydrogenase που οδηγεί σε υπερσυγκέντρωση D-lactate ώστε να χρησιμοποιηθεί στην προηγούμενη αντίδραση (10). Η πρωτεΐνη VanX είναι μία D,D-dipeptidase που στερείται δράσης έναντι του διπεπτιδίου D-Ala-D-Lac, ενώ διασπά κανονικά το διπεπτίδιο D-Ala-D-Ala που παράγεται από την ενδογενή εντεροκοκκική ligase, περιορίζοντας έτσι την σύνθεση του φυσιολογικού πενταπεπτιδίου (267, 338).

Το γονίδιο VanA μόνο του δεν μπορεί να προσφέρει αντοχή στον εντερόκοκκο, επειδή το D-Lac δεν είναι ούτε φυσικό προϊόν στο περιβάλλον του εντεροκόκκου ούτε παράγεται φυσιολογικά από τον ίδιο τον εντερόκοκκο (186). Έτσι λοιπόν ο εντερόκοκκος πρέπει να προσλάβει μαζί με το *vanA* και το γονίδιο που θα κατευθύνει την παραγωγή του D-Lac που αποτελεί υπόστρωμα για την δράση του VanA, δηλαδή το *vanH*.

Τα γονίδια *vanR*, *vanS* είναι ρυθμιστικά γονίδια και καθορίζουν την σύνθεση ενός συστήματος δύο πρωτεϊνών που συντελεί στην ομαλή μεταγραφή του συμπλέγματος *vanHAX* (6). Η πρωτεΐνη VanS λειτουργεί σαν αισθητήρας για την ανίχνευση της παρουσίας της βανκομυκίνης ή μάλλον της κάποιας αρχικής επίδρασης της βανκομυκίνης στην σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (5, 9, 140). Ακολούθως η πρωτεΐνη VanS δίνει ένα σμα στην πρωτεΐνη VanR ώστε αυτή να μεταστρέψει προς την βιοσύνθεση των πρωτεϊνών VanH, VanA, VanX που εμπλέκονται στην αντοχή. Στα στελέχη με φαινότυπο VanA, τόσο η βανκομυκίνη όσο και η τεϊκοπλανίνη μπορούν να επάγουν την έκφραση του μηχανισμού αντοχής. Τα γονίδια *vanY* και *vanZ* συμβάλλουν αλλά δεν είναι άκρως καθοριστικά στην έκφραση της αντοχής. Η πρωτεΐνη VanY είναι μία D,D-carboxypeptidase που αποκόπτει το D-Ala τελικό πεπτίδιο από οποιοδήποτε άλλο πεπτίδιο. Η VanZ αυξάνει τα επίπεδα αντοχής στην τεϊκοπλανίνη (6, 7, 8).

Η μελέτη της δομής του συμπλέγματος γονιδίων *vanA* έδειξε σημαντική ετερογένεια στην οργάνωσή του. Το τρανσπόζον Tn1546 που το μεταφέρει, άλλοτε βρίσκεται άθικτο και άλλοτε παρεμβάλλονται ακολουθίες (insertion-like

sequences) μεταξύ *vanS* και *vanH*. Επιπλέον αυτά τα συμπλέγματα γονιδίων μπορεί να είναι ενσωματωμένα σε ακόμη μεγαλύτερα μεταθετά στοιχεία που να περιέχουν επιπρόσθετες παρεμβλλόμενες ακολουθίες (insertion sequences- IS) (84, 144, 145).

## VanB

Ο VanB φαινότυπος αντοχής στα γλυκοπεπτίδια οφείλεται και αυτός σε σύμπλεγμα γονιδίων. Όπως και στον VanA τύπο έχει προσδιορισθεί μια αντίστοιχη ακολουθία γονιδίων, *vanH<sub>B</sub>*, *vanX<sub>B</sub>*, *vanY<sub>B</sub>*, *vanR<sub>B</sub>*, και *vanS<sub>B</sub>*. (12, 104). Η VanB πρωτεΐνη συμπεριφέρεται ως κάποια ανώμαλη λιγκάση που είναι δομικά όμοια με την VanA λιγκάση (ταύτιση αμινοξέων κατά 75%). Η πρωτεΐνη VanB ομοίως προς την VanA πρωτεΐνη ευνοεί την παραγωγή πενταπεπτιδίου με τελική κατάληξη D-Ala-D-Lac (105).

Διαπιστώθηκε ταύτιση υψηλού βαθμού στην ακολουθία (περίπου 70%) μεταξύ των συμπλεγμάτων VanHAX και VanH<sub>B</sub>BX<sub>B</sub>, αλλά σαφώς μικρότερη ομολογία στην ακολουθία (25 ως 35%) στις πρωτεΐνες RSY μεταξύ των τύπων VanA και VanB (8, 104). Δεν βρίσκεται γονίδιο αντίστοιχο με το *vanZ* και το γονίδιο *vanY<sub>B</sub>* δεν βρίσκεται πάντα, αλλά και η θέση του στο σύμπλεγμα διαφέρει από εκείνη του VanA (7, 104).

Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ετερογένεια στην ακολουθία του DNA, γεγονός που οδηγεί στην διάκριση υποτύπων του γονιδίου *vanB*, δηλαδή σε *vanB-1*, *vanB-2*, *vanB-3* (74, 254, 261). Ανάλογη ετερογένεια δεν έχει βρεθεί στην δομή του γονιδιακού συμπλέγματος *vanA*, το οποίο φαίνεται να είναι πιο σταθερό και πιο ομοιογενές στην DNA ακολουθία του. Όμως το μεταθετό στοιχείο Tn1546 και τα Tn1546-like στοιχεία που φέρουν το γονιδιακό σύμπλεγμα *vanA* παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία που οφείλεται σε παρεμβολές ή διαγραφές γενετικού υλικού κατά την διαδικασία του αναδιπλασιασμού (334).

Αναφορικά με τον μηχανισμό επαγωγής έχει βρεθεί ότι η τείκοπλανίνη που επάγει την έκφραση του VanA δεν προκαλεί το ίδιο και στον VanB, αντίθετα με την βανκομυκίνη που επάγει αμφοτέρους τους τύπους (8, 62).

Επιπρόσθετα η έκθεση ενός στελέχους με *vanB* γονότυπο αντοχής στην βανκομυκίνη μπορεί να το καταστήσει ανθεκτικό και την τεϊκοπλανίνη. Έτσι μεταλλάκτες με αντοχή στην τεϊκοπλανίνη μπορεί να προκύψουν από *vanB* στελέχη που αρχικά ήταν ευαίσθητα στην τεϊκοπλανίνη, αλλά κατέστησαν ανθεκτικά μετά από έκθεση στην τεϊκοπλανίνη. Το ίδιο μπορεί να συμβεί *in vivo* κατά την διάρκεια θεραπείας (231).

Μια άλλη διαφορά μεταξύ VanA και VanB είναι η θέση που εδράζεται το σύμπλεγμα γονιδίων. Το VanA σύμπλεγμα βρίσκεται συνήθως πάνω σε transposon όπως το Tn1546, που μπορεί επίσης να είναι μέρος ενός πλασμιδίου ικανού προς σύζευξη και μεταφορά (9, 142, 144, 145) γεγονός που οδηγεί σε πολλή μεγαλύτερη και ευρύτερη διασπορά. Σε αντίθεση το σύμπλεγμα VanB αρχικά βρέθηκε πάνω σε ένα 64-kb transposon ( Tn1547) σαν τμήμα ενός 250-kb μεταθετού στοιχείου που παρεμβάλλονταν στο χρωμόσωμα του εντεροκόκκου και μπορούσε να εισαχθεί στο χρωμόσωμα ενός άλλου στελέχους. Αυτό το 64-kb transposon μπορεί επίσης να μεταπηδήσει πάνω σε πλασμίδιο μέσα στον εντερόκοκκο ξενιστή και αν αυτό είναι πλασμίδιο σύζευξης να μεταφερθεί σε άλλα στελέχη (264). Πάντως είναι γεγονός ότι ο τύπος VanA παρουσιάζει ευρύτερη διασπορά, αλλά και μεγαλύτερη διεισδυτικότητα μεταξύ των ειδών. Έχει βρεθεί σε πλείστα είδη εντεροκόκκου, αλλά και σε άλλα gram θετικά βακτήρια όπως *Corynebacterium spp.*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Lactococcus spp.*, *Gemella spp.* (265).

### **VanC**

Ο φαινότυπος αντοχής VanC περιλαμβάνει την φυσική αντοχή χαμηλού επιπέδου στη βανκομυκίνη που εκφράζουν τα είδη του εντεροκόκκου, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* και *E. flavescens*. Οι ακολουθίες των νουκλεοτιδίων στα γονίδια *vanC1*, *vanC2* και *vanC3* που χαρακτηρίζουν τα είδη *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* και *E. flavescens* αντίστοιχα έχουν προσδιορισθεί (60). Η VanC λιγκάση του *E. gallinarum* ευνοεί την παραγωγή πενταπεπτιδίου με κατάληξη D-Ala-D-Ser. Η υποκατάσταση της D-αλανανίνης από την D-σερίνη έχει σαν επακόλουθο να εξασθενεί η τάση σύνδεσης της βανκομυκίνης με το



τροποποιημένο αυτό πενταπεπτίδιο. Παράλληλα όμως παραμένει και η δυνατότητα του μικροβίου να παράγει το φυσιολογικό πενταπεπτίδιο όπως αποκαλύπτεται μετά από αδρανοποίηση του *vanC1* (268). Τα επίπεδα αντοχής στην βανκομυκίνη, που εκφράζουν τα διάφορα στελέχη *E. gallinarum* είναι επακόλουθο της ισορροπίας που επιτυγχάνεται στην παραγωγή μεταξύ φυσιολογικής και τροποποιημένης πεπτιδογλυκάνης (95). Έτσι η παρουσία ποικίλων ποσοτήτων D-Ala-D-Ala σε σχέση με D-Ala-D-Ser ευθύνεται για διαφορετικά επίπεδα αντοχής στην βανκομυκίνη που εκφράζεται με διαφορετικές τιμές ελαχίστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MICs) της βανκομυκίνης για τα διάφορα εντεροκοκκικά στελέχη με φαινότυπο VanC (231). Όταν υπερτερεί η σύνθεση D-Ala-D-Ala τότε η MIC είναι χαμηλή ακόμη και κάτω από τα όρια αντοχής, ενώ όταν υπερισχύει η σύνθεση D-Ala-D-Ser τα επίπεδα της MIC ανεβαίνουν (279).

Το γονίδιο *vanC2* που χαρακτηρίζει το είδος *E. casseliflavus* εμφανίζει κατά 66% ομολογία στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων με το γονίδιο *vanC1*. Όπως ο *E. gallinarum* έτσι και ο *E. casseliflavus* διαθέτει μια επιπρόσθετη ενδογενή λιγκάση (238).

Υπάρχει μια εκτεταμένη (98%) ομολογία στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων μεταξύ των γονιδίων *vanC2* και *vanC3* που καθιστά δυσχερή την διάκριση με μεθόδους PCR των δύο γονιδίων (60).

Ωστόσο, πέρα από τα ενδογενή αυτά γονίδια αντοχής στην βανκομυκίνη έχει ταυτοποιηθεί η παρουσία του *vanA* συμπλέγματος γονιδίων σε κάποια στελέχη *E. gallinarum* και *E. casseliflavus* που προσδίδουν αντοχή υψηλού επιπέδου στην βανκομυκίνη (MICs >256μg/ml) αλλά και αντοχή στην τεϊκοπλανίνη (20, 42, 69, 88, 197).

## **VanD**

Αυτός ο τύπος αντοχής στα γλυκοπεπτίδια περιγράφηκε για πρώτη φορά σε νοσοκομείο της Νέας Υόρκης το 1991 (256). Το στέλεχος που παρουσίασε αυτόν τον τύπο αντοχής ήταν *E. faecium* προς το οποίο η ελαχίστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) της βανκομυκίνης ήταν 64 μg/ml και της τεϊκοπλανίνης

4μg/ml. Το υπεύθυνο γονίδιο για την σύνθεση της αντίστοιχης λιγκάσης ονομάστηκε *vanD* και η μελέτη της ακολουθίας απέδειξε ότι ήταν όμοιο, αλλά διαφορετικό από τα γονίδια για τις *vanA* και *vanB* λιγκάσες. Μεγαλύτερη γενετική συγγένεια έχει με τον *vanB* τύπο. Αργότερα περιγράφηκαν τρία κλινικά στελέχη *E. faecium* με τύπο αντοχής VanD που απομονώθηκαν στη Βοστώνη (250). Έτσι προέκυψε ο υπότυπος *vanD2* και αργότερα περιγράφηκαν άλλοι τρεις υπότυποι, οι: *vanD3* στο Τορόντο του Καναδά (31), *vanD4* στην Βραζιλία (71), και *vanD5* στο Βανκούβερ του Καναδά (32). Το γονίδιο *vanD* εμφανίζεται να βρίσκεται πάνω στο χρωμόσωμα και να μην είναι μεταφερόμενο σε άλλους εντεροκόκκους. Η διαφοροποίηση μεταξύ των υποτύπων δεν είναι τόσο μεγάλη όσο μεταξύ των υποτύπων του *vanB*.

### **VanE**

Ο φαινότυπος αυτός παρουσιάζει ομοιότητες με τον συστασιακό τύπο αντοχής VanC. Όμως το υπεύθυνο γονίδιο *vanE* περιγράφηκε στο στέλεχος *E. faecalis* BM4405 που παρουσίαζε χαμηλού επιπέδου αντοχή στην βανκομυκίνη (MIC, 16μg/ml) και ευαισθησία στην τεϊκοπλανίνη (0,5 μg/ml) (112). Η αλληλουχία των αμινοξέων παρουσιάζει μεγαλύτερη ταυτότητα με τον τύπο VanC (55%) απ' ότι με τον VanA (45%) και τον VanB (43%) (112).

### **8. 5. Βανκομυκίνη-εξαρτώμενοι εντερόκοκκοι**

Έχει περιγραφεί ένα ενδιαφέρον φαινόμενο σε μερικά στελέχη VanA και VanB εντεροκόκκων. Πρόκειται για εξάρτηση από την βανκομυκίνη (79, 336). Αυτά τα στελέχη δεν είναι απλώς ανθεκτικά στην βανκομυκίνη αλλά έχουν και ανάγκη από την παρουσία της για να αναπτυχθούν. Έχουν απομονωθεί από καλλιέργειες που γίνονται με την χρήση υλικών που περιέχουν βανκομυκίνη και έγιναν για άλλο σκοπό, δηλαδή απομόνωση *Campylobacter*, ή γονόκοκκου. Τα ίδια αυτά δείγματα ήταν αρνητικά όταν καλλιεργήθηκαν σε υλικά που δεν περιείχαν βανκομυκίνη. Μία πιθανή εξήγηση του φαινομένου είναι ότι αυτά τα στελέχη με την απόκτηση του μηχανισμού αντοχής έχασαν την ικανότητά τους

να συνθέτουν το φυσιολογικό D-Ala-D-Ala διπεπτίδιο αφού δεν τους ήταν πια χρήσιμο και για να συνθέσουν το τροποποιημένο D-Ala-D-Lac έχουν ανάγκη από τον επαγωγέα δηλαδή την βανκομυκίνη που θα προκαλέσει την μεταστροφή στο μηχανισμό, άλλως το D-Ala-D-Ala διπεπτίδιο καταστρέφεται από την δράση του VanX (231).

### **8. 6. Ταυτόχρονη μεταφορά αντοχής.**

Το γεγονός της ταυτόχρονης παρουσίας και μεταφοράς δύο ή περισσότερων μηχανισμών αντοχής σε διαφορετικές ομάδες αντιβιοτικών έχει ήδη παρατηρηθεί και οφείλεται στην παρουσία των αντίστοιχων γόνων αντοχής πάνω στο ίδιο πλασμίδιο (156). Η ταυτόχρονη αντοχή των VRE και στις μακρολίδες έχει περιγραφεί στις πρώτες αναφορές (187, 311). Αργότερα αποδείχθηκε ότι τα γονίδια αντοχής στα γλυκοπεπτίδια (*vanA*) και τα γονίδια αντοχής στις μακρολίδες (*ermAM*, *ermB*) μπορούν να εδράζονται και να μεταφέρονται μαζί στο ίδιο πλασμίδιο (2).

## **9. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ VRE**

### **9. 1. Γεωγραφική κατανομή**

#### **9. 1. α) VRE στα νοσοκομεία**

Οι ανθεκτικοί στην βανκομυκίνη εντερόκοκκοι αποκαλύφθηκαν αρχικά σε νοσοκομεία σαν αίτια ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων. Από το 1989 ως το 1993, η συχνότητα των νοσοκομειακών λοιμώξεων που οφείλονται σε VRE στις ΗΠΑ αυξήθηκε από 0,3% σε 7,9% (45). Η αύξηση αυτή οφείλεται κατά κύριο λόγο στην μεγάλη αύξηση των λοιμώξεων από VRE στις μονάδες εντατικής νοσηλείας (από 0,4% σε 13,6%), αλλά και σε άλλα τμήματα των νοσοκομείων οι λοιμώξεις από VRE αυξήθηκαν επίσης σημαντικά (243). Για το 1998, οι αναφορές του National Nosocomial Infectious Surveillance System (NNIS)

ανεβάζουν την αναλογία των ανθεκτικών στην βανκομυκίνη εντεροκόκκων στις ΗΠΑ σε >20% των στελεχών που απομονώνονται στα νοσοκομεία (46).

Από την Ευρώπη και την Αμερική, όπου πρωτοεμφανίστηκαν οι ανθεκτικοί στην βανκομυκίνη εντερόκοκκοι στα τέλη της δεκαετίας του '80, μέχρι το τέλος της χιλιετίας εξαπλώθηκαν σε όλο τον πλανήτη και ολοένα πυκνώνουν οι αναφορές για την παρουσία του VRE σε όλες τις ηπείρους (19, 154, 318).

Οι νοσοκομειακές λοιμώξεις από VRE συχνά εμφανίζονται με την μορφή επιδημίας και μάλιστα πολλές φορές αυτός ήταν και ο τρόπος της πρώτης εμφάνισης του VRE σε ένα νοσοκομείο. Τέτοιες επιδημίες μπορεί να οφείλονταν σε διασπορά στελεχών που με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο πεδίο (pulsed-field gel electrophoresis-PFGE) αποδείχθηκε ότι υπάγονταν στον ίδιο κλώνο (μονοκλωνική διασπορά). Σε κάποιες περιπτώσεις ένας κλώνος εντοπίστηκε σε αρκετά νοσοκομεία της ίδιας περιφέρειας (222). Σε νοσοκομεία όπου η επιδημία εκδηλώθηκε αμέσως μετά την εγκατάσταση του VRE τα κρούσματα οφείλονταν συνήθως σε μονοκλωνική διασπορά (29, 30, 59, 143, 196, 217). Όταν όμως η παρουσία του VRE στο νοσοκομείο, ή στην κοινότητα ήταν μακροχρόνια, τότε με μοριακές μεθόδους απεδείχθη ότι η αντοχή στην βανκομυκίνη είχε διασπαρεί με πλασμίδια, ή τρανσποζόνια σε περισσότερους κλώνους (59, 144, 204, 224).

Μολονότι αυτό που αποκαλύπτεται εύκολα και προκαλεί ανησυχία είναι η λοίμωξη, εν τούτοις ο αποικισμός των ασθενών κυρίως στο έντερο μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά στην παρουσία και διασπορά του VRE. Ευτυχώς όμως η συχνότητα αποικισμού του εντέρου από VRE απέχει αρκετά από την συχνότητα λοίμωξης (178, 217). Ασθενείς μπορεί να βρεθούν αποικισμένοι ταυτόχρονα από περισσότερα του ενός στελέχη που ανήκουν μάλιστα σε διαφορετικά είδη (204, 320). Ο αποικισμός του εντέρου μπορεί να παραμείνει για εβδομάδες, ή και μήνες. Αρνητικές καλλιέργειες μπορεί να παρεμβάλλονται στις θετικές για πολύ χρόνο (217).

### **9. 1. β) VRE στην κοινότητα**

Στην Ευρώπη, VRE απομονώθηκε από πολλά τρόφιμα ζωικής προέλευσης (3, 16, 171). Η χρήση γλυκοπεπτιδίων, όπως η αβοπαρσίνη, στην εκτροφή ζώων συντέιει στην εμφάνιση του VRE αρχικά στα ζώα και μετέπειτα μέσω της τροφικής αλυσίδας και στους ανθρώπους της κοινότητας (1, 80, 171, 321). Έτσι επιδημιολογικές μελέτες που διεξήχθησαν σε Ευρωπαϊκές χώρες απέδειξαν την παρουσία VRE σε υγιείς που ζούσαν στην κοινότητα, δεν είχαν νοσηλευτεί σε νοσοκομείο και δεν είχαν εργασιακή σχέση με τον νοσοκομειακό χώρο (313). Σ' αυτές τις περιπτώσεις ο επικρατέστερος τύπος αντοχής είναι VanA. Αντίθετα, στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής παρουσία του VRE στην κοινότητα δεν εντοπίζεται (68, 231, 320) και οι λοιμώξεις από VRE έχουν τον χαρακτήρα νοσοκομειακών λοιμώξεων. Όμως και στην Ευρώπη όπου η παρουσία του VRE στην κοινότητα είναι αποδεδειγμένη, οι λοιμώξεις δεν εμφανίζονται ως λοιμώξεις της κοινότητας, αλλά έχουν τον χαρακτήρα νοσοκομειακών λοιμώξεων (168, 169, 296).

### **9. 2. Παράγοντες κινδύνου**

Από τις πρώτες μελέτες που έγιναν αναφορικά με την εμφάνιση του VRE αποκαλύφθηκε ότι οι περισσότεροι ασθενείς ήταν νοσηλευόμενοι σε μονάδες εντατικής θεραπείας (59). Σε μεταγενέστερες μελέτες απεδείχθη η υψηλότερη συχνότητα παρουσίας του VRE σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, καρκίνο, ασθενείς που είχαν υποστεί μεταμόσχευση οργάνου και σε ασθενείς με παρατεταμένη νοσηλεία σε νοσοκομεία (30, 42, 91, 135, 163, 307, 311). Αρκετές μελέτες διεξήχθησαν με σκοπό να προσδιορίσουν τους παράγοντες κινδύνου για αποικισμό, ή λοίμωξη από VRE μεταξύ νοσοκομειακών ασθενών. Οι περισσότερες μελέτες χρησιμοποίησαν μεθόδους case-control και multivariate ανάλυση. Παράμετροι που προσδιορίστηκαν ως παράγοντες κινδύνου είναι η παρατεταμένη διάρκεια νοσηλείας (224, 307), παρατεταμένη παραμονή σε μονάδες εντατικής νοσηλείας (217, 253), η ανάγκη για διακομιδή του ασθενούς μέσα στο νοσοκομείο σε ένα άλλο τμήμα (307), η ανάγκη

χειρουργικής διερεύνησης μετά από μεταμόσχευση ήπατος (253), καθώς και η χορήγηση παρεντερικής διατροφής (294). Άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με αποικισμό, ή λοίμωξη είναι η έκθεση σε επιμολυσμένα ιατρικά και νοσηλευτικά όργανα, όπως θερμομέτρα, νοσηλεία στον ίδιο χώρο με ασθενή που είναι γνωστός ως φορέας VRE, και η διενέργεια νοσηλευτικών χειρισμών αμέσως μετά την νοσηλεία γνωστού φορέα VRE από τον ίδιο νοσηλευτή (30, 165, 196, 294). Έχουν επίσης προσδιορισθεί παράγοντες κινδύνου σχετικοί με την ανάπτυξη σοβαρής λοίμωξης, όπως βακτηραιμία. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται κακοήθειες, ουδετεροπενία, παρατεταμένη νοσηλεία, νεφρική ανεπάρκεια, νοσηλεία σε αιματολογικές κλινικές και μονάδες μεταμόσχευσης μυελού, προηγηθείσα χορήγηση αντιβιοτικών, καθώς και διάρκεια χορήγησης αντιβιοτικής θεραπείας (91, 143, 184, 220, 291).

Ιδιαίτερα η προηγηθείσα χορήγηση αντιβιοτικών στο σύνολό τους, αλλά και καθ' ομάδες, έχει γίνει αντικείμενο διεξοδικών μελετών. Η παρεντερική χορήγηση βανκομυκίνης και τρίτης γενιάς κεφαλοσπορινών έχουν χαρακτηριστεί ως παράγοντες κινδύνου για αποικισμό, ή λοίμωξη (75, 222, 224, 307). Όμως και η χορήγηση βανκομυκίνης από του στόματος μπορεί να διευκολύνει την εγκατάσταση του VRE στο έντερο (29, 178, 198). Με τον ίδιο τρόπο μπορεί να συμβάλλει και η χορήγηση μετρονιδαζόλης και άλλων αντι-αναερόβιων αντιβιοτικών, όχι μόνο στην εγκατάσταση του VRE, αλλά και στην πρόκληση βακτηραιμίας (91, 217, 313). Τα γλυκοπεπτίδια και τα αντι-αναερόβια αντιβιοτικά προκαλούν μεγάλη διαταραχή στην ισορροπία της χλωρίδας του εντέρου. Οι Van der Auwera και συν. βρήκαν ότι η χορήγηση βανκομυκίνης, ή τεϊκοπλανίνης από το στόμα σε άτομα που πριν είχαν μικρή συχνά μη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση VRE στο έντερο, οδήγησε σε μεγάλη αύξηση της συγκέντρωσης αυτού σε  $10^6$  ως  $10^8$  cfu/g κοπράνων (313).

Οι Beezhold και συν. αναφέρουν καθολικό (στο 100% των ασθενών) αποικισμό του εντέρου, αλλά και υψηλό επιπολασμό του VRE στον αποικισμό του δέρματος ασθενών που εμφάνισαν βακτηραιμία. Ο αποικισμός του δέρματος μπορεί να εξηγήσει την σημασία του VRE σαν αίτιο βακτηραιμίας από ενδαγγειακό καθετήρα. Μπορεί επίσης να σημαίνει και επιμόλυνση της

αιμοκαλλιέργειας και έτσι εξηγείται η συχνή αυτόματη αποδρομή της βακτηριαμίας από VRE, καθώς αυτή μπορεί να επιτευχθεί απλώς με την απομάκρυνση του αγγειακού καθετήρα. Ο αποικισμός του δέρματος φαίνεται να σχετίζεται με προηγηθείσα διάρροια (18, 339).

### **9. 3. Σχέση αποικισμού και λοίμωξης**

Σε πολλές μελέτες οι ασθενείς από τους οποίους απομονώνονται VRE είναι απλώς αποικισμένοι χωρίς να εμφανίζουν πραγματική λοίμωξη (30, 163, 185, 217). Η αναλογία αποικισμού προς πραγματική λοίμωξη μεταξύ νοσηλευόμενων που ελέγχθηκαν για αποικισμό με ειδικές καλλιέργειες σε νοσοκομεία βρέθηκε αρκετά υψηλή φθάνοντας στο 10:1 (163, 217). Ωστόσο, κατά τις μελέτες αποικισμού, στα απομονωθέντα στελέχη συχνά επικρατεί ο *E. gallinarum*, όμως ελάχιστες λοιμώξεις οφείλονται σ' αυτόν (185).

Οι λοιμώξεις τείνουν να εμφανίζονται στους πιο καταβεβλημένους ασθενείς καθώς και σε πάσχοντες από άλλα σοβαρά νοσήματα. Η θνητότητα ασθενών με VRE βακτηριαμία μπορεί να φτάσει σε 60 ως 70% (90, 91, 307). Ωστόσο περίπου οι μισοί από αυτούς τους θανάτους μπορούν να αποδοθούν σ' αυτήν καθ' αυτήν την λοίμωξη. Οι Parapanicolaou και συν. βρήκαν ότι η λοίμωξη από VRE αποτελεί ισχυρό προδιαθεσικό παράγοντα θνητότητας σε ασθενείς που έχουν υποστεί μεταμόσχευση ήπατος (253). Οι Linden και συν ανέφεραν ότι η θνητότητα από VRE βακτηριαμία σε ασθενείς με μεταμόσχευση ήπατος ήταν 46%, σημαντικά υψηλότερη από την 25% θνητότητα που προσδιορίστηκε σε ασθενείς της ίδιας κατηγορίας, αλλά με βακτηριαμία από ευαίσθητο στην βανκομυκίνη εντερόκοκκο (194). Ασθενείς με ουδετεροπενία, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, μεταμόσχευση ήπατος και πάσχοντες από άλλα σοβαρά νοσήματα παρουσιάζουν μεγαλύτερες πιθανότητες να υποστούν μια πιο παρατεταμένη, ή και θανατηφόρο λοίμωξη από VRE (220).

Σε άλλες μελέτες όμως βρέθηκε ότι δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στην θνητότητα από βακτηριαμία μεταξύ των πασχόντων από VRE και των πασχόντων από ευαίσθητο στην βανκομυκίνη εντερόκοκκο, ιδιαίτερα δε όταν ελέγχθηκαν παράγοντες όπως η ηλικία και ο δείκτης APACHEE II (30, 307,

323). Επί του παρόντος δεν υπάρχει κανένα δεδομένο που να αποδεικνύει ότι οι εντερόκοκκοι με αντοχή στην βανκομυκίνη είναι πιο λοιμογόνιοι από τους ευαίσθητους.

Εκτός από τις βακτηριαίμιες, που συχνά οφείλονται σε ενδαγγειακούς καθετήρες, οι VRE μπορεί να απομονωθούν από ούρα, ενδοκοιλιακά αποστήματα, λοιμώξεις χειρουργικών τραυμάτων, παροχετεύσεις από φλεγμονές της πυέλου, πλευρικά υγρά, ή εγκεφαλονωτιαία υγρά (95). Δεν είναι όμως πάντα εύκολο να αξιολογηθεί η κλινική σημασία του VRE που απομονώνεται σε κάποια καλλιέργεια, ή να διαχωριστεί σαφώς ο αποικισμός από την λοίμωξη. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα όταν πρόκειται για δείγματα όπως ούρα, ή όταν ο VRE απομονώνεται μαζί με άλλα μικρόβια ως μέρος μιας πολυμικροβιακής λοίμωξης. Σ' αυτές τις περιπτώσεις είναι πολύ δύσκολο να εκτιμηθεί και η σημαίνουσα βαρύτητα της παρουσίας του VRE καθώς συνυπάρχουν σοβαρές υποκείμενες καταστάσεις και μικτές λοιμώξεις (28).

Επειδή οι εντερόκοκκοι είναι μέρος της ενδογενούς φυσιολογικής χλωρίδας της γαστρεντερικής οδού και της γεννητικής οδού των γυναικών, οι λοιμώξεις από αυτούς συχνά οφείλονται στην ενδογενή χλωρίδα του ασθενούς (230). Δηλαδή ο ασθενής πρώτα αποικίζεται και μετά υφίσταται την λοίμωξη. Ωστόσο πολλές μελέτες έδειξαν ότι οι εντερόκοκκοι, συμπεριλαμβανομένων και των VRE, μπορούν να διασπαρούν μέσω άμεσης επαφής ασθενούς με ασθενή, καθώς και με έμμεση επαφή από χέρια του προσωπικού που έχουν αποικισθεί (30, 86), από επιφάνειες του νοσηλευτικού περιβάλλοντος (30, 165) και από εργαλεία και όργανα νοσηλείας (196).

#### **9. 4. Εστίες μετάδοσης**

Μολονότι έχουν εκπονηθεί πολλές μελέτες επί του θέματος, πολλές πτυχές αυτού παραμένουν αδιευκρίνιστες. Το 1993, οι Bates και συν παρατήρησαν ότι αρκετοί από τους νοσοκομειακούς ασθενείς στο Ηνωμένο Βασίλειο δεν είχαν προηγούμενη νοσηλεία σε νοσοκομείο ούτε κανενός είδους προηγηθείσα επαφή με νοσοκομειακά ιδρύματα (16). Οι μελέτες που επακολούθησαν αποκάλυψαν ότι αρκετοί από αυτούς τους ασθενείς διέμεναν ή εργάζονταν σε αγροκτήματα



εκτροφής ζώων και ότι κοτόπουλα και χοίροι σε αυτά βρέθηκαν αποικισμένα από VRE (16). Παρουσία του VRE σε ζώα αποκαλύφθηκε στην συνέχεια σε πολλές Ευρωπαϊκές χώρες. Το γεγονός αυτό σχετίζεται με την χρήση της αβοπαρσίνης, ενός γλυκοπεπτιδίου, στην εκτροφή ζώων με σκοπό την ενίσχυση της ανάπτυξης αυτών. Αυτό συνέβαινε στο Ηνωμένο Βασίλειο, αλλά και σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες για περισσότερο από 15 χρόνια (1, 333). Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι τρόφιμα ζωικής προέλευσης αποτελούν την κύρια εστία διασποράς του VRE μεταξύ των ανθρώπων που διαβιούν στην κοινότητα στην Ευρώπη. Έτσι άνοιξε μια μεγάλη συζήτηση σχετικά με την διαδεδομένη χρήση αντιβιοτικών, και μάλιστα γλυκοπεπτιδίων, ως παραγόντων ανάπτυξης στην κτηνοτροφία και την δυνατότητα ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών που στη συνέχεια, μέσω της διατροφικής αλυσίδας μπορούν να περάσουν στον άνθρωπο (128).

Αντίθετα στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, όπου η αβοπαρσίνη δεν χρησιμοποιήθηκε στην εκτροφή ζώων, παρουσία VRE σε ζώα δεν εντοπίστηκε. Σε αυτήν τη χώρα η κυριότερη εστία διασποράς είναι το έντερο των νοσοκομειακών ασθενών που αποικίζονται από VRE, αλλά καθώς παραμένουν ασυμπτωματικοί η αποκάλυψη αυτών δεν καθίσταται δυνατή παρά μόνο κατόπιν ειδικών καλλιεργειών (28). Μολονότι ο αποικισμός του γαστρεντερικού είναι ο πιο συνηθισμένος, εντούτοις και άλλες περιοχές του σώματος μπορεί να αποικισθούν, όπως δέρμα (319) και ρινοφάρυγγας (320). Σ' αυτές τις περιπτώσεις ο αποικισμός οφείλεται κυρίως σε ιατρικές και νοσηλευτικές πράξεις.

Το νοσοκομειακό περιβάλλον μπορεί επίσης να επιμολυνθεί και να λειτουργήσει σαν εστία μόλυνσης ασθενών. Ρούχα και ιματισμός, κρεβάτια, κομοδίνα, δάπεδα, πόμολα, πιεσόμετρα, γλυκοζιόμετρα, θερμομέτρα, αντλίες ενδαγγειακής έγχυσης, έχουν βρεθεί μολυσμένα από VRE (29, 30, 133, 165, 196, 204, 224, 294). Αυτή η διασπορά είναι ακόμη μεγαλύτερη σε δωμάτια ασθενών που έχουν διάρροια (30). Ο εντερόκοκκος μπορεί να παραμείνει σε τέτοιες επιφάνειες για ημέρες ή και εβδομάδες καθώς είναι ιδιαίτερα ανθεκτικός σε αντισηπτικά και σε ακραίες θερμοκρασίες (30, 246). VRE έχουν επίσης

απομονωθεί από τα χέρια του προσωπικού (319). Σε ελάχιστες περιπτώσεις νοσηλευτικό προσωπικό βρέθηκε αποικισμένο στο έντερο από VRE, αλλά η επιδημιολογική σημασία του ευρήματος δεν είναι σαφής (143, 163).

Η διάρκεια του αποικισμού είναι ένα άλλο αντικείμενο συζήτησης. Οι Montecalvo και συν τόνισαν ότι οι ασθενείς παραμένουν αποικισμένοι για εβδομάδες ή και μήνες και συχνά βρίσκονται αποικισμένοι σε νέα εισαγωγή στο νοσοκομείο (217). Οι Green και συν ανέφεραν ότι περίπου το 60% των ασθενών που υπέστησαν μεταμόσχευση ήπατος και αποικίσθηκαν από VRE παρέμειναν αποικισμένοι για περισσότερο από 12 εβδομάδες (136) και οι Livornese και συν βρήκαν ότι η πλειονότητα των ασθενών παρέμειναν αποικισμένοι για περισσότερο από 3 μήνες (196). Οι Montecalvo και συν διαπίστωσαν ότι κάποιοι από τους αποικισμένους ασθενείς που παρέμειναν θετικοί επί μακρόν έφεραν το ίδιο VRE στέλεχος, όπως αποδείχθηκε με PFGE, ενώ κάποιοι άλλοι βρέθηκαν να φέρουν περισσότερα του ενός στελέχη κατά την διάρκεια της παρακολούθησης (217). Επομένως αυτοί οι ασθενείς μπορεί να επανεισάγουν στο νοσοκομείο διαφορετικά στελέχη κάθε φορά θα πρέπει να ελέγχονται σε κάθε νέα εισαγωγή.

## **10. ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ**

Όπως φαίνεται από τις μέχρι τώρα μελέτες η επιδημιολογία του VRE δεν έχει απόλυτα διευκρινισθεί, όμως υπάρχουν αρκετά δεδομένα που δείχνουν ποιες ομάδες ασθενών βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο να αποικισθούν ή να αναπτύξουν λοίμωξη. Παράγοντες κινδύνου που έχουν προσδιορισθεί είναι η παρουσία σοβαρής υποκείμενης νόσου, η ύπαρξη κάποιου είδους ανοσοκαταστολής, προηγηθείσα ενδοκοιλιακή ή καρδιοχειρουργική επέμβαση, παρουσία ουροκαθετήρα, ή κεντρικού φλεβοκαθετήρα, παρατεταμένη παραμονή στο νοσοκομείο, καθώς και λήψη πολλαπλών αντιμικροβιακών φαρμάκων. Έτσι ασθενείς νοσηλεύόμενοι σε μονάδες εντατικής θεραπείας, ογκολογικές και μονάδες μεταμόσχευσης βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο επειδή συντρέχουν πολλοί από τους παραπάνω παράγοντες κινδύνου (30, 33, 42, 122, 143, 165, 218).

Στην προσπάθεια να περιορισθεί η ενδονοσοκομειακή εξάπλωση του VRE έχουν προταθεί μέτρα (συστάσεις) που αφορούν την συμπεριφορά του ιατρικού και νοσηλευτικού προσωπικού (125, 153). Τα μέτρα αυτά εντοπίζονται σε 4 πεδία

1. ορθολογική χρήση της βανκομυκίνης
2. εκπαίδευση του προσωπικού των νοσοκομείων
3. συστηματική και αποτελεσματική χρήση των δεδομένων του μικροβιολογικού εργαστηρίου
4. εντατικοποίηση των ήδη γνωστών μέτρων περιορισμού των νοσοκομειακών λοιμώξεων, δηλαδή απομόνωση ασθενών, χρήση γαντιών και ιματισμού μιας χρήσεως, αποστείρωση ιατρικών και νοσηλευτικών οργάνων.

Η αυστηρότητα και η εντατικοποίηση των μέτρων σε κάθε νοσοκομείο διαφοροποιείται ανάλογα με την σοβαρότητα του προβλήματος στο δεδομένο νοσοκομείο. Διαμορφώνονται δηλαδή 3 δέσμες μέτρων για

- ✓ νοσοκομεία που δεν έχει ακόμα εντοπισθεί VRE
- ✓ νοσοκομεία με σποραδικά κρούσματα και χαμηλό επιπολασμό
- ✓ νοσοκομεία με υψηλό επιπολασμό (28, 47, 48).

### **10. 1. Ορθολογική χρήση βανκομυκίνης**

Η χρήση της βανκομυκίνης έχει ήδη προσδιορισθεί ως παράγοντας κινδύνου για αποικισμό και λοίμωξη από VRE (30, 143, 196, 218) και μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα ανάπτυξης στελεχών *Staphylococcus aureus* και *Staphylococcus epidermidis* με αντοχή στην βανκομυκίνη. Η παρουσία του αντιβιοτικού σε ένα περιβάλλον προσφέρει στο ανθεκτικό μικρόβιο ένα συγκριτικό πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι των ευαίσθητων και έτσι αυξάνεται ο αριθμός των ανθεκτικών στο πολλαπλάσιο (231). Έτσι προτείνεται η χρήση της βανκομυκίνης να γίνεται μόνο στις κάτωθι περιπτώσεις (48):

1. θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων που οφείλονται σε gram θετικούς μικροοργανισμούς με αντοχή στις β-λακτάμες

2. θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων που προκαλούνται από gram θετικά μικρόβια σε ασθενείς που είναι αλλεργικοί στις β-λακτάμες
3. σε περιπτώσεις κολίτιδας εξ αντιβιοτικών που δεν ανταποκρίθηκε στην μετρονιδαζόλη ή είναι απειλητική για την επιβίωση του ασθενούς
4. προφύλαξη για ενδοκαρδίτιδα σε ασθενείς υψηλού κινδύνου μετά από σοβαρές παρεμβάσεις
5. προφύλαξη σε μεγάλες χειρουργικές επεμβάσεις όπως, εμφύτευση προσθετικών υλικών ή συσκευών σε κέντρα με υψηλή αναλογία λοιμώξεων από ανθεκτικό στην μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA) ή *S. epidermidis* (MRSE). Αλλά και σ' αυτές τις περιπτώσεις μια δόση αμέσως πριν την έναρξη της επέμβασης και σε περίπτωση που η επέμβαση διαρκέσει περισσότερο από 6 ώρες μία δεύτερη δόση είναι αρκετές για προφύλαξη.

Ωστόσο επικρατεί σκεπτικισμός κατά πόσο ο περιορισμός στην χρήση της βανκομυκίνης μπορεί να συντελέσει στον περιορισμό εξάπλωσης του VRE, καθώς οι VRE είναι συνήθως πολυανθεκτικοί. Αντιφατικά είναι και τα αποτελέσματα από τον περιορισμό στην χρήση της βανκομυκίνης, καθώς άλλοι ερευνητές βρίσκουν σημαντική μείωση στον επιπολασμό του VRE (120), ενώ άλλοι όχι (147).

Αλλά και η χορήγηση ενός άλλου αντιβιοτικού μπορεί επίσης να συμβάλλει στην διασπορά του VRE (231). Είναι από καιρού γνωστό ότι η χρήση κεφαλοσπορινών τρίτης γενεάς αυξάνουν τον κίνδυνο εντεροκοκκικών λοιμώξεων γενικώς. Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι η χορήγηση κεφαλοσπορινών τρίτης γενεάς μαζί με αντιβιοτικά έναντι των αναεροβίων είναι παράγοντας κινδύνου για αποικισμό και λοίμωξη από VRE.

## **10. 2. Εκπαίδευση προσωπικού.**

Μέσα στα προγράμματα συνεχιζόμενης εκπαίδευσης του προσωπικού των νοσοκομείων πρέπει να συμπεριληφθούν και πληροφορίες σχετικές με την επιδημιολογία του VRE. Η εκπαίδευση αυτή θα πρέπει να απευθύνεται τόσο στο

ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό, όσο και σε άλλες ομάδες όπως σπουδαστές, προσωπικό φαρμακείου και μικροβιολογικού εργαστηρίου, εργαζόμενους στην καθαριότητα και κάθε άλλο πρόσωπο που σχετίζεται άμεσα με την φροντίδα των ασθενών. Πρέπει να περιλαμβάνονται πληροφορίες που αφορούν την επιδημιολογία του VRE αλλά και σχετικές με την δυνητική επίπτωση στην εξέλιξη της νόσου και το κόστος νοσηλείας των ασθενών.

### **10. 3. Συμβολή του μικροβιολογικού εργαστηρίου στην διάγνωση και τον έλεγχο του VRE.**

Αποτελεί βασική διαπίστωση το γεγονός ότι η έγκαιρη διάγνωση των ασθενών που είναι αποικισμένοι ή παρουσιάζουν λοίμωξη από VRE είναι ουσιαστική για την παρεμπόδιση της ενδονοσοκομειακής μετάδοσης (28). Όταν ο επιπολασμός του VRE σε ένα νοσοκομείο φτάσει σε υψηλά επίπεδα τότε ο περιορισμός του καθίσταται ακόμη πιο δύσκολος. Επομένως η δυνατότητα του μικροβιολογικού εργαστηρίου στην ταχεία και σωστή ταυτοποίηση των εντεροκόκκων και στην έγκυρη και έγκαιρη διάγνωση της αντοχής στην βανκομυκίνη αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας, ώστε να αποφευχθούν στην συνέχεια πιο πολύπλοκες, δαπανηρές και χρονοβόρες διαδικασίες, που απαιτούνται όταν η παρουσία του VRE αργήσει να εντοπισθεί (48, 100). Σε πολλά νοσοκομεία η παρουσία του VRE διαπιστώθηκε για πρώτη φορά όταν από κλινικά δείγματα ασθενών απομονώθηκαν στελέχη εντεροκόκκου με αντοχή στην βανκομυκίνη (122, 165). Σε αρκετά εργαστήρια υπήρχε η πρακτική να γίνεται πλήρης έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά μόνο σε εντεροκόκκους που απομονώνονταν από περιοχές του σώματος που όφειλαν να είναι στείρες π.χ. αίμα, ούρα, ενώ δεν γινόταν το ίδιο για εντεροκόκκους που απομονώνονταν από άλλα σημεία του σώματος. Μια τέτοια τακτική δεν πρέπει πια να εφαρμόζεται και ιδιαίτερα σε νοσοκομεία που βρίσκονται σε περιοχές όπου έχει διαπιστωθεί η παρουσία του VRE, αλλά να υποβάλλονται σε έλεγχο ευαισθησίας στα γλυκοπεπτίδια όλα τα στελέχη εντεροκόκκου που απομονώνονται (48).

Η ικανότητα των μεθόδων ελέγχου της αντοχής του εντεροκόκκου στα γλυκοπεπτίδια ετέθη και αυτή υπό έλεγχο. Η μέθοδος διάχυσης των δίσκων που είναι η συχνότερη μέθοδος ελέγχου της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά απεδείχθη ανεπαρκής να ανιχνεύσει όλες τις περιπτώσεις αντοχής (236, 300, 301, 302, 305). Το ίδιο διαπιστώθηκε και για κάποια από τα αυτοματοποιημένα συστήματα ελέγχου ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, ιδιαίτερα τα πιο παλαιά. Αντίθετα όλες οι μέθοδοι προσδιορισμού της MIC, καθώς και η μέθοδος E-test, απεδείχθησαν ικανοποιητικές (101, 162). Η δυσκολία αυτή είναι ακόμη μεγαλύτερη προκειμένου για τον τύπο VanB, όπου η MIC στην βανκομυκίνη μπορεί να μην είναι ιδιαίτερα υψηλή, αλλά να βρίσκεται κοντά στο κριτικό όριο αντοχής, καθώς και για τον διαχωρισμό του τύπου VanB από τους τύπους VanC1 και VanC2/C3 (101).

Όταν ανιχνευθεί αντοχή στην βανκομυκίνη με κάποια από τις προκαταρκτικές μεθόδους πρέπει να ειδοποιηθεί η κλινική και παράλληλα το εργαστήριο να προβεί σε επιβεβαίωση με κάποια από τις ακριβέστερες μεθόδους (48). Παράλληλα το εργαστήριο θα πρέπει να είναι σε θέση να χαρακτηρίσει τον τύπο αντοχής προσδιορίζοντας τα υπεύθυνα γονίδια με κάποια μέθοδο PCR (89, 166). Βέβαια ο φαινότυπος αντοχής στα γλυκοπεπτίδια μπορεί να καθοριστεί συνδυάζοντας μια πλήρη και σωστή ταυτοποίηση με τον προσδιορισμό της αντοχής σε βανκομυκίνη και τεϊκοπλανίνη. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να διαχωριστεί η φυσική αντοχή χαμηλού επιπέδου στην βανκομυκίνη των ειδών *E. gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens* από την επίκτητη αντοχή των άλλων ειδών. Ωστόσο περιπτώσεις VanB με αντοχή στην τεϊκοπλανίνη, καθώς και περιπτώσεις *E. gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens* με επίκτητη αντοχή τύπου VanA, ή VanB που έχουν αναφερθεί (42, 69, 88) καθιστούν δυσχερή τον χαρακτηρισμό του φαινότυπου αντοχής και επιβεβλημένη την χρήση μοριακών μεθόδων.

#### **10. 4. Εφαρμογή μέτρων ελέγχου λοιμώξεων**

Τα μέτρα απομόνωσης που προτείνονται από το HICPAC (Hospital Infection Control Practices Advisory Committee) των ΗΠΑ για να περιοριστεί η μετάδοση του VRE από ασθενή σε ασθενή είναι τα ακόλουθα:

1. απομόνωση των ασθενών η φορέων VRE σε ξεχωριστό δωμάτιο, ή έστω στο ίδιο δωμάτιο με άλλους ασθενείς που έχουν VRE (30).
2. το προσωπικό που προσέρχεται για νοσηλεία στους ασθενείς να φορά καθαρά, όχι κατ' ανάγκην αποστειρωμένα γάντια και να προβαίνει σε αλλαγή των γαντιών όταν αυτά έρχονται σε επαφή με υλικά που μπορεί να έχουν υψηλή συγκέντρωση VRE (30, 165, 196)
3. ένδυση με καθαρό, όχι κατ' ανάγκην αποστειρωμένο ιματισμό του προσωπικού που εισέρχεται σε δωμάτιο με VRE ιδιαίτερα όταν ο ασθενής λόγω της κατάστασής του (π.χ. διάρροια, κολοστομία, ειλεοστομία, παροχέτευση τραύματος) αποβάλλει στο περιβάλλον το μικρόβιο (30).
4. τα γάντια και ο ιματισμός πρέπει να βγαίνουν πριν από την έξοδο από το δωμάτιο της απομόνωσης και τα χέρια να πλένονται με αντισηπτικό, γιατί τα χέρια μπορεί να επιμολυνθούν κατά την αφαίρεση των γαντιών (41, 76, 83, 161, 173, 174, 242, 255).
5. διασφάλιση ώστε μετά την αφαίρεση των γαντιών και της μπλούζας και το πλύσιμο των χεριών δεν θα συμβεί άλλη επαφή στο δωμάτιο απομόνωσης (πόμολα, κουρτίνες) ικανή να προκαλέσει καινούργια επιμόλυνση (30,165).

Επιπρόσθετα στα ανωτέρω μέτρα, προτείνονται:

1. όργανα όπως, πιεσόμετρα, θερμόμετρα, στηθοσκόπια να αφιερώνονται αποκλειστικά σε ένα η περισσότερους ασθενείς με VRE και όταν αυτά τα όργανα εξέλθουν από το δωμάτιο απομόνωσης για να χρησιμοποιηθούν σε άλλους ασθενείς να πλένονται και να αποστειρώνονται καλά (196, 319).

2. σε κάθε νέο περιστατικό λοίμωξης, ή αποικισμού από VRE να ελέγχονται όλοι οι ασθενείς που συνευρέθηκαν στο ίδιο δωμάτιο. Επιπρόσθετος έλεγχος των υπολοίπων νοσηλευομένων του τμήματος μπορεί να γίνει κατά την κρίση του προσωπικού και της επιτροπής ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων
3. να καθιερωθούν κριτήρια για τον αποχαρακτηρισμό του ασθενούς και την λήξη της απομόνωσης. Δεδομένου ότι η παρουσία του VRE μπορεί να επιμένει χωρίς αυτό να ανιχνεύεται πάντα με τις καλλιέργειες, τα κριτήρια αυτά πρέπει να είναι αυστηρά π.χ. 3 καλλιέργειες αρνητικές για VRE με απόσταση τουλάχιστον μιας εβδομάδος και ο έλεγχος αποικισμού να αφορά πολλές περιοχές του σώματος όπως, έντερο, περιπρωκτική περιοχή, μασχάλες, ομφαλός, καθετήρες Foley, περιοχές κολοστομίας (143).
4. ένα σύστημα επισήμανσης των ασθενών και των φορέων VRE πρέπει να καθιερωθεί δεδομένου ότι οι ασθενείς μετά την έξοδό τους μπορεί να παραμείνουν επί μακρόν αποικισμένοι και σε μια καινούργια εισαγωγή να επανεισάγουν VRE στο νοσοκομείο. Αυτό το σύστημα επισήμανσης θα πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να γίνεται αμέσως αντιληπτό και ο ασθενής να ελέγχεται και να τίθεται σε απομόνωση αν χρειάζεται.

Το HICPAC δίνει κάποιες επιπρόσθετες συστάσεις για νοσοκομεία όπου ο VRE ενδημεί, ή τα αρχικά μέτρα δεν κατόρθωσαν να περιορίσουν την μετάδοση του VRE (48). Αυτά έχουν ως ακολούθως:

1. οι προσπάθειες ελέγχου πρέπει να επικεντρωθούν στις μονάδες εντατικής νοσηλείας και σε εκείνα τα τμήματα που η μετάδοση του VRE είναι μεγαλύτερη. Αυτές οι μονάδες λειτουργούν σαν εστίες μετάδοσης και διασποράς όταν οι ασθενείς μετακινούνται στο νοσοκομείο.
2. όπου είναι δυνατόν το προσωπικό νοσηλείας πρέπει να εκπαιδεύεται ώστε να ελαττώνεται στο ελάχιστο η παροχή φροντίδας από το ίδιο άτομο σε VRE θετικούς και VRE αρνητικούς ασθενείς
3. σε εξαιρετικές περιπτώσεις προτείνεται να γίνει έλεγχος του προσωπικού για χρόνια προβλήματα του δέρματος και των νυχιών. Σ' αυτές τις



περιπτώσεις πρέπει να γίνει έλεγχος αποικισμού στα χέρια και το έντερο και τα θετικά άτομα να απομακρυνθούν από την φροντίδα των VRE αρνητικών ασθενών έως ότου το πρόβλημα παρέλθει.

4. πολλές από τις επιδημιολογικές έρευνες που έγιναν για την διερεύνηση επιδημιών εντεροκόκκων στα νοσοκομεία έδειξαν τον ρόλο του περιβάλλοντος στην μετάδοση του εντεροκόκκου (30, 196). Επομένως τα νοσοκομεία που αντιμετωπίζουν πρόβλημα με τον VRE πρέπει να βεβαιωθούν ότι οι καθιερωμένες διαδικασίες καθαρισμού και αποστείρωσης των επιφανειών του περιβάλλοντος είναι επαρκείς και τηρούνται πιστά από το προσωπικό καθαρισμού. (30, 196).
5. στελέχη VRE πρέπει να διερευνηθούν με μοριακές μεθόδους για να προσδιορισθούν οι εστίες μόλυνσης και ο τρόπος μετάδοσης.

#### **10. 5. Καλλιέργειες προς επιτήρηση**

Κατά την διάρκεια επιδημιών, αλλά και καθ' όλη την προσπάθεια ελέγχου του VRE έχει αποδειχθεί συχνά ότι οι ειδικές καλλιέργειες επιτήρησης των ασθενών για ανεύρεση VRE που δεν απομονώνεται στις συνήθεις καλλιέργειες των κλινικών δειγμάτων μπορεί να αποδειχθούν πολύ χρήσιμες (29, 30, 48, 91, 165, 196, 224, 307). Τέτοιου είδους μελέτες επιπολασμού μπορεί να γίνουν σε περιορισμένη κλίμακα (π.χ. έλεγχος ασθενών που νοσηλεύονται στο ίδιο δωμάτιο με ασθενή πάσχοντα ή φορέα VRE), να επεκταθούν περισσότερο ( π. χ. σε όλους τους ασθενείς του τμήματος όπου εντοπίζεται περιστατικό VRE), να έχουν ένα περιοδικό χαρακτήρα ελέγχου σε τμήματα υψηλού κινδύνου (μονάδες εντατικής θεραπείας, αιματολογικές, ογκολογικές μονάδες), ή να πάρουν πιο γενικευμένο χαρακτήρα και να επεκταθούν σε περισσότερους χώρους σε περιπτώσεις επιδημιών (5, 29). Μια άλλη στρατηγική είναι να ελέγχονται για VRE όλα τα κόπρανα που στέλλονται στο εργαστήριο για *C. difficile*, ή να ελέγχονται συστηματικά όλοι οι νεοεισερχόμενοι ασθενείς που μεταφέρονται από μονάδες υψηλού κινδύνου σε άλλο τμήμα.

Ο έλεγχος αποικισμού συνήθως αφορά το γαστρεντερικό σύστημα και το υλικό που ελέγχεται είναι κόπρανα, ή πρωκτικά επιχρίσματα. Είναι δυνατόν

όμως να περιλαμβάνει το δέρμα (περιπρωκτική περιοχή, χέρια, περιοχή κολοστομίας) και το υλικό που ελέγχεται είναι επιχρίσματα δέρματος. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται γι' αυτές τις καλλιέργειες είναι εκλεκτικά υλικά που οφείλουν αφ' ενός μεν να ενισχύουν την ανάπτυξη του εντεροκόκκου αναστέλλοντας την ανάπτυξη άλλων μικροβίων, αφ' ετέρου δε να περιέχουν βανκομυκίνη ώστε να επιτρέπεται η ανάπτυξη στα ανθεκτικά στελέχη (79, 143, 163, 182, 224, 307, 322).

#### **10. 6. Προσπάθειες εκρίζωσης του VRE από το γαστρεντερικό**

Οποσδήποτε υπάρχει ενδιαφέρον για εκρίζωση του VRE από το γαστρεντερικό για τους εξής λόγους:

1. για να προστατευθεί ο ίδιος ο ασθενής από μια μελλοντική λοίμωξη.
2. για να μειωθεί η ενόχληση του ασθενούς και το κόστος που συνεπάγεται για το νοσοκομείο η εφαρμογή των μέτρων περιορισμού
3. για να εξαλειφθεί μια εστία διασποράς VRE στο νοσοκομειακό περιβάλλον.

Προς τον σκοπό αυτό έγιναν προσπάθειες και μελέτες. Χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός νοβοβιοκίνης-δοξυκυκλίνης ή τετρακυκλίνης, αλλά απέτυχε να εκριζώσει τον VRE από το γαστρεντερικό σε 7 από τους 8 ασθενείς (219). Πιο ενθαρρυντικά είναι τα αποτελέσματα με την χορήγηση βακιτρακίνης από του στόματος. Σε μία μελέτη με την χορήγηση βακιτρακίνης εκριζώθηκε ο VRE από τα κόπρανα σε 6 από τους 8 ασθενείς, αλλά με μία περίπτωση αναζωπύρωσης. Σε άλλη παρόμοια μελέτη ο VRE εκριζώθηκε και στους 8 ασθενείς που έλαβαν μέρος, αλλά με 2 υποτροπές (52, 248). Σε μια άλλη μελέτη με χορήγηση βακιτρακίνης-δοξυκυκλίνης από του στόματος, όλοι οι ασθενείς αρχικά κατέστησαν αρνητικοί για VRE, αλλά σε μια πιο παρατεταμένη παρακολούθηση μόνο το 33% αυτών παρέμειναν αρνητικοί, ποσοστό που είναι συγκρίσιμο με αυτό φορέων που δεν λαμβάνουν θεραπεία (MR Weinstein, J Bruton, I Cambell, et. al., Program Abstr. 36<sup>th</sup> Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. J10, 1996). Μολονότι φαίνεται ότι κάποιοι ασθενείς ανταποκρίνονται σ' αυτές τις προσπάθειες και απαλλάσσονται από τον VRE, εν τούτοις κανένα

θεραπευτικό σχήμα δεν έχει αποδειχθεί οριστικά αποτελεσματικό για την εκκρίωση του VRE από το έντερο (28). Μία επιπρόσθετη δυσκολία για την εκτίμηση αυτών των προσπαθειών είναι το γεγονός ότι όταν ο VRE βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση είναι δύσκολο να ανιχνευθεί. Χρειάζεται παρατεταμένη παρακολούθηση, τεχνικές καλλιέργειας με εμπλουτισμό, ή ακόμα και φαρμακευτική πρόκληση με χορήγηση γλυκοπεπτιδίων για να προσδιορισθεί με απόλυτη βεβαιότητα η εκκρίωση του VRE.

## **11. ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ VRE**

Ευθύς εξ αρχής, ως ανιχνεύθηκε η αντοχή του εντεροκόκκου στα γλυκοπεπτίδια, άρχισε και η διερεύνηση του μηχανισμού αντοχής με την χρήση μεθόδων μοριακής ανάλυσης (311, 187, 188). Η διερεύνηση αυτή οδήγησε στον προσδιορισμό των γονότυπων αντοχής και την αποκάλυψη της δομής τους, καθώς και την κατανόηση του τρόπου λειτουργίας τους και του τρόπου μεταφοράς και μεταβίβασης μεταξύ των στελεχών εντεροκόκκων, αλλά και άλλων gram θετικών βακτηριδίων (187, 188).

Έκτοτε οι μέθοδοι μοριακής ανάλυσης επιστρατεύθηκαν για να απαντήσουν κυρίως στα εξής ερωτήματα:

- χαρακτηρισμό του γονότυπου αντοχής απομονωθέντων στελεχών VRE, σε συνδυασμό με την ταυτοποίησή τους σε είδος
- αναζήτηση γενετικής συσχέτισης απομονωθέντων στελεχών VRE, κυρίως σε επιδημιολογικές μελέτες
- αναγνώριση και ταυτοποίηση νέων γονότυπων αντοχής στα γλυκοπεπτίδια, ή διαφορετικών υποτύπων στους ήδη γνωστούς γονότυπους

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν εκάστοτε διαφοροποιούνται ανάλογα με το ερώτημα που τίθεται προς διερεύνηση.

### Χαρακτηρισμός γονότυπου αντοχής

Εφ' όσον η αλληλουχία βάσεων (sequence) των ήδη γνωστών γονότυπων αντοχής έχει ταυτοποιηθεί, ο χαρακτηρισμός του γονότυπου αντοχής ενός απομονωθέντος VRE στελέχους μπορεί να γίνει με την χρήση της αλυσωτής αντίδρασης θερμοανθεκτικής πολυμεράσης (PCR). Με την χρήση ειδικών ζευγών εκκινήτων (primers) που έχουν καθορισμένη αλληλουχία βάσεων ώστε να συνδέονται σε συγκεκριμένη θέση του γονιδίου και να ξεκινά η αντίδραση διπλασιασμού του γενετικού υλικού (DNA, RNA), παράγονται προϊόντα (τμήματα γενετικού υλικού) με συγκεκριμένο μέγεθος και αλληλουχία βάσεων. Η παρουσία των προϊόντων αυτών αποκαλύπτεται με ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης και χαρακτηρίζει το γονίδιο-στόχο.

Η μέθοδος της αλυσωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction-PCR) δίνει την δυνατότητα με την χρήση των κατάλληλων primers να ανιχνευθούν τα χαρακτηριστικά για την κάθε περίπτωση γονίδια. Έτσι με την στόχευση γονιδίων χαρακτηριστικών του είδους μπορεί να γίνει ταυτοποίηση των εντεροκόκκων (262) σε επίπεδο είδους, ενώ με την στόχευση γονιδίων χαρακτηριστικών του τύπου αντοχής στην βανκομυκίνη μπορεί να γίνει ο χαρακτηρισμός αυτού σε μοριακό επίπεδο (5, 60, 270).

Επειδή συνήθως στοχεύουμε σε περισσότερα του ενός γονίδια και αναζητούμε απαντήσεις σε περισσότερα ερωτήματα, για λόγους ευχέρειας και συντομίας αναπτύχθηκαν μέθοδοι πολλαπλής αλυσωτής αντίδρασης θερμοανθεκτικής πολυμεράσης (multiplex PCR), ώστε να αναζητούνται ταυτόχρονα με την χρήση των ειδικών primers σε μία αντίδραση πολλά γονίδια (89, 284). Συνήθως οι ειδικοί primers που χρησιμοποιούνται στοχεύουν τα γονίδια *vanA*, *vanB* που είναι οι συχνότεροι επίκτητοι τύποι αντοχής, τα *vanC1*, *vanC2/C3*, που είναι χαρακτηριστικά των ειδών *E. gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens* αντίστοιχα και χαρακτηρίζουν την φυσική αντοχή των εν λόγω ειδών, καθώς και γονίδια χαρακτηριστικά για τα είδη *E. faecium*, *E. faecalis* που είναι τα συχνότερα είδη εντεροκόκκων με επίκτητο μηχανισμό αντοχής στα γλυκοπεπίδια.

Η ανάγκη να γίνεται ταυτόχρονα σε μία αντίδραση η αναζήτηση αυτών των πληροφοριών επιβάλλεται και από το γεγονός της ανεύρεσης στελεχών που πέραν της φυσικής τους αντοχής στα γλυκοπεπίδια έχουν αποκτήσει και επίκτητη αντοχή (88, 341, 67).

Ένα άλλο πεδίο εφαρμογής της PCR είναι η αναζήτηση του VRE σε υλικά ασθενών με χλωρίδα, π.χ. κόπρανα. Οι συμβατικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται απαιτούν το λιγότερο 4 μέρες για να ολοκληρωθούν (157). Σε περιπτώσεις επιδημιών που απαιτείται άμεση απομόνωση των φορέων, η ταχύτερη διάγνωση μπορεί να αποδώσει καλύτερα αποτελέσματα (270, 280, 284).

### **Γενετική συσχέτιση απομονωθέντων στελεχών VRE**

Η αναγκαιότητα της διερεύνησης της γενετικής συσχέτισης στελεχών VRE που είναι φαινοτυπικά όμοια, προκύπτει κυρίως για νοσοκομειακά στελέχη και αφορά νοσοκομειακές λοιμώξεις, καθώς τίθεται το ερώτημα της πιθανής διασποράς ενός ή περισσότερων κλώνων. Ειδικά για τον VRE το ερώτημα της επιδημιολογικής συσχέτισης των στελεχών τίθεται όχι μόνο για κλινικά στελέχη απομονωθέντα από ασθενείς μέσα και έξω από το νοσοκομειακό περιβάλλον (22, 23, 56, 78, 121, 144, 168, 169, 170, 204, 223, 337), αλλά δεδομένης της παρουσίας του VRE σε ζώα και τρόφιμα ζωικής προέλευσης διερευνάται και η επιδημιολογική συσχέτιση στελεχών ζωικής προέλευσης και κλινικών στελεχών με χρήση μοριακών μεθόδων ανάλυσης (139, 171, 172, 330, 334). Οι συμβατικές μέθοδοι, όπως βιοχημικό profile, οροτυπία, τυποποίηση με βακτηριοφάγους δεν είναι ικανές να απαντήσουν σ' αυτό το ερώτημα. Νεότερες μοριακές μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί προς αυτήν την κατεύθυνση είναι: πλασμιδιακό αποτύπωμα (plasmid fingerprinting) (177, 210, 303), ριβοτυπία (130, 177, 298), μέθοδοι που βασίζονται στην χρήση της PCR (312), amplified-fragment length polymorphism (AFLP) analysis (330) και η ανάλυση χρωμοσωμικού DNA με χρήση περιοριστικών ενζύμων και ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (pulsed-field gel electrophoresis-PFGE) (14, 177, 203, 234). Οι μέθοδοι αυτοί τίθενται σε διερεύνηση, καθώς πρέπει να

καθορισθούν τα κριτήρια για τον ορισμό της συγγένειας των στελεχών και του τρόπου αξιολόγησης των αποτελεσμάτων που προκύπτουν ( 226, 304).

Οι περισσότερες μελέτες συγκλίνουν στην διαπίστωση ότι η PFGE ανάλυση με χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *SmaI* αποτελεί την μέθοδο εκλογής για την επιδημιολογική διερεύνηση του εντεροκόκκου (33, 56, 234).

### **Αναγνώριση και ταυτοποίηση νέων γονοτύπων αντοχής και υποτύπων των ήδη γνωστών γονότυπων**

Η ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης του γονότυπου αντοχής επιβάλλεται όταν σε ένα στέλεχος με φαινοτυπική αντοχή στα γλυκοπεπτίδια δεν καθίσταται δυνατόν να χαρακτηριστεί ο γονότυπος αντοχής με χρήση PCR για τους ήδη γνωστούς γονότυπους. Τότε η διερεύνηση της γονιδιακής ακολουθίας των βάσεων (DNA sequencing) δυνατόν να οδηγήσει στην ταυτοποίηση ενός νέου τύπου αντοχής, όπως συνέβη με τους τύπους VanD και VanE (31, 32, 71, 112, 250).

Σε άλλες περιπτώσεις η διερεύνηση της ακολουθίας στο γονιδιακό σύμπλεγμα αποδεικνύει την ύπαρξη διαφοροποιήσεων που οδηγούν στην διαπίστωση της παρουσίας υποτύπων, όπως στην περίπτωση του *vanB* γονότυπου, ο οποίος διαχωρίζεται σε τρεις υποτύπους, *vanB1*, *vanB2* και *vanB3* (74, 254, 261).

## **12. ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Οι σοβαρές λοιμώξεις από εντερόκοκκο (π.χ. βακτηραιμία, ενδοκαρδίτις) πρέπει να θεραπεύονται με χορήγηση ενός βακτηριοκτόνου συνδυασμού αντιβιοτικών. Ένας τέτοιος συνδυασμός, που στο παρελθόν αποτελούσε θεραπεία πρώτης επιλογής, είναι ο συνδυασμός μιας πενικιλίνης (π.χ. πενικιλίνη G, αμπικιλίνη) και μιας αμινογλυκοσίδης. Όμως η ανάπτυξη αντοχής στην πενικιλίνη και η ανάπτυξη αντοχής υψηλού επιπέδου στις αμινογλυκοσίδες περιόρισε την δυνατότητα χορήγησης αυτού του συνδυασμού (150). Ο συνδυασμός της βανκομυκίνης με μια αμινογλυκοσίδα απεδείχθη

επίσης συνεργικός έναντι των εντεροκόκκων (324) και συνιστάται ως θεραπεία εκλογής σε περιπτώσεις αλλεργίας στην πενικιλίνη και στην θεραπεία ανθεκτικών στην πενικιλίνη και αμπικιλίνη εντεροκόκκων (150). Έτσι η βανκομυκίνη χρησιμοποιήθηκε πολύ στην καθ' ήμερα πράξη. Όμως η ανάπτυξη αντοχής υψηλού επιπέδου στις αμινογλυκοσίδες και η γρήγορη εξάπλωση της αντοχής στα γλυκοπεπτίδια έχουν πλέον περιορίσει τις θεραπευτικές επιλογές για τον εντερόκοκκο (180, 228, 230).

Έτσι οι θεραπείες των εντεροκοκκικών λοιμώξεων καθίσταται ιδιαίτερα προβληματική, ειδικά αν πρόκειται για *E. faecium* που είναι συνήθως ανθεκτικός σε πολλαπλά αντιβιοτικά. Ο *E. faecalis* παραμένει σε υψηλό ποσοστό ενδιάμεσα ευαίσθητος στην **αμπικιλίνη** γεγονός που επιτρέπει την θεραπευτική χορήγηση της αμπικιλίνης σε υψηλές δόσεις, μόνης, ή σε συνδυασμό με μια αμινογλυκοσίδα, εφ' όσον δεν υπάρχει υψηλού επιπέδου αντοχή στην αμινογλυκοσίδα και ο ασθενής δεν είναι αλλεργικός στην πενικιλίνη. Έτσι αν η αντοχή στην βανκομυκίνη αναπτυχθεί σε *E. faecalis* υπάρχει ενδεχομένως η δυνατότητα χορήγησης της αμπικιλίνης. Ατυχώς όμως η πλειονότητα των στελεχών του εντεροκόκκου που εμφανίζουν αντοχή στα γλυκοπεπτίδια ανήκει στο είδος *E. faecium* που στην πλειονότητα του εμφανίζεται πολύ πιο ανθεκτικό σε πενικιλίνη και αμπικιλίνη (231). Στις περιπτώσεις αυτές ζητείται από το μικροβιολογικό εργαστήριο να διερευνηθεί η ευαισθησία του στελέχους σε μια σειρά άλλων αντιβιοτικών, όπως τετρακυκλίνες, ερυθρομυκίνη, χλωραμφενικόλη, ριφαμικίνη, κινολόνες, νοβοβοκίνη και, προκειμένου για λοίμωξη του ουροποιητικού, νιτροφουραντοΐνη (231).

Η **χλωραμφενικόλη** είναι ένα από τα ελάχιστα αντιβιοτικά που παραμένουν δραστικά έναντι πολυανθεκτικών στελεχών εντεροκόκκων. Έχει χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία λοιμώξεων από VRE, αλλά με μικρή επιτυχία καθώς δεν οδήγησε σε μείωση της θνητότητας (320). Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με χλωραμφενικόλη μελετήθηκε αναδρομικά σε 16 ασθενείς με σοβαρές λοιμώξεις από VRE (βακτηραιμία, αποστήματα) σε ένα πανεπιστημιακό νοσοκομείο (245). Όλα τα απομονωθέντα στελέχη ήταν

ανθεκτικά σε πολλά αντιβιοτικά, αλλά ευαίσθητα στην χλωραμφενικόλη. Οκτώ (50%) από τους ασθενείς είχαν κάποια κλινική ανταπόκριση, ενώ 3 χαρακτηρίστηκαν σαν μικροβιολογική αποτυχία, μολονότι τα επίπεδα της χλωραμφενικόλης στον ορρό των ασθενών ήταν μέσα στα θεραπευτικά πλαίσια. Ένας θάνατος αποδόθηκε σε ανάπτυξη σήψης από VRE. Ωστόσο η συμβολή της χλωραμφενικόλης στην έκβαση των ασθενών ήταν δύσκολο να εκτιμηθεί, καθώς συνυπήρχαν στους ασθενείς ποικίλα άλλα ιατρικά προβλήματα που επηρέαζαν την έκβαση και ιατρικές θεραπευτικές παρεμβάσεις, όπως παροχετεύσεις αποστημάτων και χειρουργικοί καθαρισμοί φλεγμονών.

Η **ριφαμπικίνη** σαν μονοθεραπεία έχει πολύ περιορισμένη συμβολή στην θεραπεία των εντεροκοκκικών λοιμώξεων επειδή έχει μικρή βακτηριοκτόνο δράση και προκαλεί εύκολα την ανάπτυξη υποπληθυσμών από ανθεκτικά βακτήρια (216). Όμως καθώς η ριφαμπικίνη παραμένει δραστική έναντι πολλών πολυανθεκτικών εντεροκόκκων, ελέγχεται συχνά σε συνδυασμό με άλλα αντιβιοτικά.

Πολλά στελέχη VRE είναι ευαίσθητα στις **τετρακυκλίνες**. Η **δοξυκυκλίνη** και η **μινοκυκλίνη** έχουν χρησιμοποιηθεί στην θεραπεία λοιμώξεων από VRE συχνά σε συνδυασμό με άλλα αντιβιοτικά (50, 52, 176, 156).

Η **τεϊκοπλανίνη** φαίνεται να είναι δραστική *in vitro* στους εντεροκόκκους που έχουν VanB τύπο αντοχής. Σε πειραματικά μοντέλα ενδοκαρδίτιδας σε πειραματόζωα από VRE φάνηκε να έχει κάποια αποτελεσματικότητα σε συνδυασμό με αμινογλυκοσίδη και σε στελέχη που δεν είχαν υψηλού επιπέδου αντοχή. Όμως οι Hayden και συν περιέγραψαν την ανάπτυξη αντοχής *in vivo* στην τεϊκοπλανίνη σε στέλεχος *E. faecium* με τύπο αντοχής VanB (149).

Μια άλλη θεραπευτική προσέγγιση είναι η χρήση **συνδυασμών**. Σε πειραματικά μοντέλα ζώων χρησιμοποιήθηκαν συνδυασμοί όπως, β-λακτάμη με β-λακτάμη, β-λακτάμη με γλυκοπεπτίδιο και β-λακτάμη με κινολόνη (34, 43, 344). Σε κάθε όμως περίπτωση υπήρχαν περιορισμοί. Ο συνδυασμός ενός γλυκοπεπτιδίου με μια β-λακτάμη στηρίχθηκε στην παρατήρηση ότι μερικά στελέχη *E. faecium*, αν και ανθεκτικά στην αμικιλίνη και βανκομυκίνη,



μπορούσαν να ανασταλούν από τον συνδυασμό αυτών. Σε αυτά τα στελέχη η ελαχίστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) της αμπικιλίνης μειώνεται παρουσία της βανκομυκίνης. Αυτό συμβαίνει γιατί το μικροβιακό κύτταρο προκειμένου να συνθέσει το κυτταρικό του τοίχωμα παρουσία βανκομυκίνης αναγκάζεται να κάνει μεταστροφή προς την σύνθεση άλλων ενζύμων του κυτταρικού τοιχώματος (μεγάλου μοριακού βάρους PBPs) που μπορεί να αναστέλλονται ευκολότερα από την αμπικιλίνη (4, 231). Το εργαστήριο μπορεί να προσδιορίσει τα στελέχη που δίνουν αυτό το φαινόμενο διαμορφώνοντας τον έλεγχο ευαισθησίας στην αμπικιλίνη με την μέθοδο διάχυσης των δίσκων ταυτόχρονα σε υλικό με βανκομυκίνη και χωρίς αυτήν. Δυστυχώς πολλά VRE στελέχη δεν παρουσιάζουν αυτήν την συνέργεια, αλλά και τα στελέχη που την παρουσιάζουν αναπτύσσουν εύκολα αντοχή μόλις εκτεθούν στον συνδυασμό (231). Ο συνδυασμός κεφτριαξόνης-βανκομυκίνης-γενταμικίνης βρέθηκε πιο αποτελεσματικός από τον συνδυασμό πενικιλίνης-βανκομυκίνης-γενταμικίνης ή πενικιλίνης-τεϊκοπλανίνης-γενταμικίνης στην θεραπεία πειραματικών μοντέλων με ενδοκαρδίτιδα από *E. faecium* ανθεκτικό σε πενικιλίνη και γλυκοπεπτιδία (43). Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις τα στελέχη είχαν αντοχή χαμηλού επιπέδου στις αμινογλυκοσίδες. Παρόμοια αποτελέσματα δεν θα ήταν δυνατόν να ληφθούν με στελέχη που έχουν αντοχή υψηλού επιπέδου στις αμινογλυκοσίδες καθώς αυτές είναι απαραίτητες για την επίτευξη κάποιου βαθμού βακτηριοκτονίας. Άλλοι όμως ερευνητές σε παρόμοια πειράματα δεν βρήκαν αυτήν την συνέργεια καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι το φαινόμενο εξαρτάται μάλλον από την ιδιοσυστασία των στελεχών (49, 118, 141, 148). Επίσης έχουν ερευνηθεί συνδυασμοί δύο β-λακταμών και ο συνδυασμός αμπικιλίνης με ιμιπενέμη βρέθηκε αποτελεσματικός σε πειραματικά μοντέλα ενδοκαρδίτιδας σε κουνέλια (34).

Οι **κινολόνες**, όπως σιπροφλοξασίνη, οφλοξασίνη, νορφλοξασίνη και ενοξασίνη έχουν περιορισμένη δραστηριότητα έναντι των εντεροκόκκων. Η βακτηριοκτονία με αυτά τα αντιβιοτικά εξαρτάται από την πυκνότητα του εναιωρήματος και για να επιτευχθεί απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις του φαρμάκου τέτοιες που είναι δύσκολο να επιτευχθούν με τις συνήθεις δοσολογίες

που δίνονται στην κλινική χρήση (111, 281). Έτσι, αποτελεσματική θεραπεία με κινολόνες μπορεί να γίνει μόνο σε λοιμώξεις του ουροποιητικού (229, 230). Ωστόσο η σιπροφλοξασίνη έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλα αντιβιοτικά σε ερευνητικό επίπεδο. Σε πειραματική ενδοκαρδίτιδα σε ποντίκια βρέθηκε συνέργεια σιπροφλοξασίνης με γενταμικίνη, σιπροφλοξασίνης-ριφαμπικίνης και σιπροφλοξασίνης-γενταμικίνης-ριφαμπικίνης τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* έναντι στελεχών *E. faecium* ανθεκτικών στη βανκομυκίνη και ανθεκτικών επίσης σε καθένα από τα ανωτέρω αντιβιοτικά μεμονωμένα. Ιδιαίτερα το τριπλό σχήμα σιπροφλοξασίνης-γενταμικίνης-ριφαμπικίνης αποδείχθηκε το πιο αποτελεσματικό στην αποστείρωση των εκβλαστήσεων (325). Μολονότι η σιπροφλοξασίνη σε σταθερά υψηλές συγκεντρώσεις έχει βρεθεί αποτελεσματική στην θεραπεία εντεροκοκκικής ενδοκαρδίτιδας σε ποντίκια, οι συγκεντρώσεις που μπορούν να επιτευχθούν στον ορρό ασθενών δεν είναι αρκετές για να επιφέρουν θεραπευτικό αποτέλεσμα (93, 97, 111).

Πρόσφατα, έχουν δημιουργηθεί νεώτερες κινολόνες με μεγαλύτερη δραστηριότητα έναντι των gram θετικών μικροβίων. Οι εντερόκοκκοι είναι γενικώς από τα λιγότερο ευαίσθητα στις κινολόνες μικρόβια, με τον *E. faecium* να είναι γενικώς πιο ανθεκτικός από τον *E. faecalis*. Όμως κάποιες από τις νεώτερες κινολόνες σε συγκέντρωση 1μg/ml ή και λιγότερο βρέθηκαν ανασταλτικές για το 90% των εντεροκόκκων (258). Η **κλιναφλοξασίνη** είναι η πιο δραστική από τις αυτές. Ο συνδυασμός αμπικιλίνης σε συγκέντρωση 20μg/ml και κλιναφλοξασίνης σε 1 μg/ml έδωσε βακτηριοκτόνο δράση έναντι ανθεκτικών στελεχών εντεροκόκκου και τα επίπεδα αυτά του φαρμάκου είναι εύκολο να επιτευχθούν στο ορρό των ασθενών (39).

Η ανάγκη θεραπευτικής αντιμετώπισης των λοιμώξεων από VRE οδήγησε στην αναζήτηση νέων αντιβιοτικών ικανών να δράσουν αποτελεσματικά έναντι αυτών.

Η **dalfopristin-quinupristin** είναι μία στρεπτογραμίνη που έχει μελετηθεί στην θεραπεία λοιμώξεων από βανκομυκίνη ανθεκτικό *E. faecium*. Το αντιβιοτικό αυτό έχει βακτηριοστατική δράση έναντι αυτού του είδους αλλά δεν έχει καμιά δράση έναντι του *E. faecalis*. Δεν δίνει διασταυρούμενη αντοχή με

κανένα από τα μέχρι τώρα γνωστά αντιβιοτικά (195). Όταν όμως χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά υπάρχει κίνδυνος είτε να αναπτυχθεί επιλοίμωξη από *E. faecalis* (54), είτε να προκαλέσει ανάπτυξη αντοχής σε στελέχη *E. faecium* (55).

Έχει γίνει επίσης πολύ σημαντική προσπάθεια να αναπτυχθούν εναλλακτικά αντιβιοτικά στην ομάδα των γλυκοπεπτιδίων είτε σαν καινούργια συνθετικά μόρια είτε σαν τροποποιημένα μόρια προερχόμενα από την βανκομυκίνη ή την τεϊκοπλανίνη. Η **νταπτομυκίνη (daptomycin)** είναι ένα λιποπεπτίδιο, που αποδείχθηκε αποτελεσματικό *in vitro* (98). Παρουσίασε χαμηλές MICs σε όλα τα είδη του εντεροκόκκου, αποτελεσματική βακτηριοκτονία μόνο του και δεν έδωσε διασταυρούμενες αντοχές με την βανκομυκίνη και την τεϊκοπλανίνη (21, 212, 336). Όμως τα πρώτα αποτελέσματα σε κλινικές δοκιμές ήταν απογοητευτικά. Το φάρμακο αποδείχθηκε αναποτελεσματικό σε κλινικές δοκιμές για την θεραπεία σταφυλοκοκκικής σηψαιμίας (126). Αυτό πιθανόν οφείλεται στην πολύ υψηλή (>90%) σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, οπότε απαιτούνται πιο υψηλές δόσεις για την επίτευξη θεραπευτικού αποτελέσματος (179, 274). Δυστυχώς όμως η υψηλότερη δοσολογία σχετίζεται με τοξικότητα στον άνθρωπο, γι' αυτό και το φάρμακο αποσύρθηκε (15).

Η **ραμοπλανίνη (ramoplanin)** είναι ένα λιπογλυκοπεπτίδιο που είναι ακόμη πιο δραστικό. Αποδείχθηκε δραστική έναντι όλων των στελεχών που εξετάστηκαν από όλα τα είδη με εύρος MICs 0,25-1,6 μg/ml (15, 66, 212). Η προσθήκη ανθρώπινου ορρού προκάλεσε αύξηση της MIC στο τετραπλάσιο. Όμως η ραμοπλανίνη από τα πρώτα κιάλας πειράματα έδειξε να μην γίνεται ανεκτή κατόπιν ενδοφλέβιας και ενδομυϊκής χορήγησης. Έτσι αποδείχθηκε ακατάλληλη για συστηματική χρήση, παραμένει όμως καλή για τοπική χρήση (336).

Η **λινεζολίδα (Linezolid)** ανήκει σε μια καινούργια κατηγορία συνθετικών αντιβιοτικών, τις οξαζολιδινόνες (oxazolidinones), που η δράση τους ασκείται με την αναστολή του σχηματισμού του αρχικού συμπλέγματος που απαιτείται για την πρωτεϊνοσύνθεση των βακτηριδίων (82, 327). Το

αντιμικροβιακό εύρος δράσης της λινεζολίδης περιλαμβάνει κατ' εξοχήν gram θετικούς κόκκους, όπως ανθεκτικό στην μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA), κοαγκουλάση αρνητικούς σταφυλοκόκκους (CNS), *Streptococcus pneumoniae* ευαίσθητους και ανθεκτικούς στην πενικιλίνη και εντεροκόκκους, ιδιαίτερα στελέχη ανθεκτικά στην αμπικιλίνη και βανκομυκίνη (11, 227, 327). Στις μελέτες αυτές οι εντερόκοκκοι εμφανίζονται ευαίσθητοι στην λινεζολίδα. Ωστόσο σε κλινικές δοκιμές σε ασθενείς που έλαβαν παρατεταμένη θεραπεία με λινεζολίδα απομονώθηκαν στελέχη εντεροκόκκων ανθεκτικών στη λινεζολίδα (127). Στις περισσότερες περιπτώσεις η αντοχή αυτή χαρακτηρίζεται από ενδιάμεσα επίπεδα (MIC, 8-16μg/ml) και σχετίζεται με μετάλλαξη σε 23S rRNA.

## ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Η θεραπευτική αντιμετώπιση των λοιμώξεων από VRE παρά την εμφάνιση νέων αντιβιοτικών παραμένει ακόμη προβληματική. Οι προσπάθειες περιορισμού της διασποράς του μικροβίου εξακολουθούν ακόμη να αποτελούν την αιχμή του δόρατος στην αντιμετώπιση του προβλήματος. Η αποτελεσματικότητα των μέτρων ελέγχου διασποράς του VRE αποτελεί και αυτή αντικείμενο μελέτης. Οι Montecalvo και συν (221) αναφέρουν ότι η εφαρμογή των προτεινόμενων μέτρων ελέγχου της διασποράς, σε συνδυασμό με περιορισμό της χρήσης των αντιβιοτικών, οδήγησε σε κατά 50% μείωση του αποικισμού και κατά 4,7 φορές μείωση των βακτηριαμιών από VRE σε μία ογκολογική μονάδα, όπου ενδημούσε. Ομοίως οι Bodnar και συν (23) αναφέρουν μια νέα στρατηγική χρησιμοποίησης των μεθόδων μοριακής επιδημιολογικής ανάλυσης προκειμένου να περιορισθεί η παρουσία του VRE που είχε ενδημικό χαρακτήρα. Με αυτήν την μελέτη κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός των αθροισμάτων που οφείλονταν σε έναν κλώνο. Έτσι, 12 ασθενείς που φαινομενικά ήταν άσχετοι μεταξύ τους, αλλά μολύνθηκαν από τον ίδιο κλώνο, υποβλήθηκαν σε βαθύτερη επιδημιολογική διερεύνηση και κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός της επιδημιολογικής αλυσίδας. Επιπρόσθετα μέτρα ελήφθησαν και ελέγχθηκε η περαιτέρω διασπορά.

Οι επιδημιολογικές μελέτες που αποσκοπούν στην κατανόηση του τρόπου διασποράς και επέκτασης του VRE αποτελούν σημαντικό εργαλείο για την λήψη μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων από VRE που αποτελούν σοβαρή απειλή για την έκβαση της πορείας ασθενών του νοσοκομείου που είναι επιρρεπείς σε λοιμώξεις και έχουν μειωμένη ικανότητα αντιμετώπισης αυτών.

## **ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ**

### **ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

- A. Σχεδιασμός και οργάνωση μελέτης**
- B. Μεθοδολογία μελέτης επιπολασμού του VRE στο γαστρεντερικό ασθενών νοσηλευομένων στο ΠΑΓΝΗ**
- Γ. Μεθοδολογία πολυκεντρικής μελέτης επιπολασμού του VRE στο γαστρεντερικό ασθενών νοσηλευομένων σε 13 Ελληνικά νοσοκομεία**
- Δ. Καταγραφή και μελέτη περιστατικών λοίμωξης από VRE στο ΠΑΓΝΗ**
- Ε. Μέθοδοι ελέγχου της ευαισθησίας των απομονωθέντων στελεχών VRE στα αντιβιοτικά**
- ΣΤ. Χαρακτηρισμός του γονότυπου αντοχής στην βανκομυκίνη των απομονωθέντων στελεχών VRE με την μέθοδο της πολλαπλής αλυσωτής αντίδρασης με θερμοανθεκτική πολυμεράση (multiplex polymerase chain reaction-PCR)**
- Z. Ανάλυση απομονωθέντων στελεχών VRE με την μέθοδο ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed-Field Gel Electrophoresis-PFGE).**

## **A. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΜΕΛΕΤΗΣ**

### **A.1. Πρώτη εμφάνιση του VRE στο ΠΑΓΝΗ**

Στο τέλος του έτους 2000, οι ανθεκτικοί στην βανκομυκίνη εντερόκοκκοι, που περιγράφηκαν για πρώτη φορά στο Ηνωμένο Βασίλειο το 1988 (311), παρουσιάζουν ευρεία παγκόσμια διασπορά. Αναφορές, που δεν είχαν ακόμη δημοσιευθεί, έκαναν γνωστή την εμφάνιση VRE σε ελληνικά νοσοκομεία. Η εμφάνισή του στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου (ΠΑΓΝΗ) ήταν απλώς θέμα χρόνου και το μικροβιολογικό εργαστήριο βρισκόταν σε ετοιμότητα για την έγκαιρη ανίχνευση στελεχών εντεροκόκκου ανθεκτικών στα γλυκοπεπτίδια.

Στις 18-12-2000 απομονώθηκε από το πλευριτικό υγρό ασθενούς στέλεχος *E. faecium* με αντοχή στην βανκομυκίνη και διαγνώσθηκε το πρώτο για το νοσοκομείο μας περιστατικό λοίμωξης από VRE.

Ως τις 19-1-2001 ( μέσα σε διάστημα ενός μήνα ), διαγνώστηκαν άλλα 4 περιστατικά λοίμωξης από VRE. Αυτή η χρονική συρροή κρουσμάτων προσέδιδε τον χαρακτήρα επιδημίας και τα 5 αυτά περιστατικά μελετήθηκαν επιδημιολογικά. Παράλληλα, από την στιγμή που διαγνώστηκε το πρώτο περιστατικό, κινητοποιήθηκε η επιτροπή ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων προς λήψη μέτρων ελέγχου και περιορισμού της διασποράς VRE, στα πλαίσια της οποίας έλαβε χώρα και η επιδημιολογική διερεύνηση των 5 πρώτων περιστατικών.

### **A. 2. Μέτρα ελέγχου και περιορισμού της διασποράς του VRE**

Τα μέτρα που εφαρμόστηκαν ήταν τα προτεινόμενα από το HICPAC (Hospital Infection Control Advisory Committee) των ΗΠΑ για νοσοκομεία όπου πρωτοεμφανίζεται ο VRE. Τα εν λόγω μέτρα έχουν περιγραφεί αναλυτικά στο πρώτο μέρος (ΕΝΟΤΗΤΑ 10), όμως αναφέρονται συνοπτικά στην παρούσα παράγραφο:

- Απομόνωση ασθενών και φορέων σε ξεχωριστό από τους άλλους ασθενείς δωμάτιο νοσηλείας.

- Αλλαγή ιματισμού, γαντιών κ.τ.λ. κατά την είσοδο και την έξοδο από τον θάλαμο νοσηλείας από το νοσηλευτικό, ιατρικό προσωπικό και τους συνοδούς.
- Όργανα (πιεσόμετρα, θερμομέτρα, στηθοσκόπια) αφιερωμένα αποκλειστικά στους ασθενείς με VRE.
- Έλεγχος όλων των ασθενών των νοσηλευομένων στην κλινική (νεφρολογική-αιματολογική) όπου εντοπίστηκε το πρώτο περιστατικό.
- Ετοιμότητα και επαγρύπνηση του μικροβιολογικού εργαστηρίου για έγκαιρη διάγνωση της αντοχής στα γλυκοπεπτίδια, καθώς και διερεύνηση των ανθεκτικών στελεχών.
- Άμεση κινητοποίηση της νοσηλεύτριας ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων σε κάθε νέο περιστατικό VRE, ώστε να ενημερωθεί η κλινική και να ληφθούν τα κατάλληλα μέτρα.
- Διοργάνωση συναντήσεων των διαφορετικών ομάδων εργαζομένων στο νοσοκομείο (ιατρών, νοσηλευτών, τεχνολόγων εργαστηρίων, υπαλλήλων καθαριότητας) προς ενημέρωση για την ύπαρξη του προβλήματος και τα μέτρα αντιμετώπισής του.
- Συστάσεις για περιορισμό στην χρήση των γλυκοπεπτιδίων.
- Διενέργεια μελέτης επιπολασμού του VRE στο γαστρεντερικό σύστημα των νοσηλευομένων ασθενών.

### **A. 3. Διεξαγωγή πρώτης μελέτης επιπολασμού του VRE στο γαστρεντερικό σύστημα ασθενών νοσηλευομένων στο ΠΑΓΝΗ**

Καθώς η αρχική διερεύνηση των πρώτων 5 περιστατικών λοίμωξης από VRE που αναδύθηκαν με μορφή χρονικής συρροής κρουσμάτων, έδειξε ότι δεν πρόκειται για πραγματική επιδημία αφού οφείλονταν σε διαφορετικά στελέχη και δεν υπήρχε συσχέτιση των περιστατικών μεταξύ τους τέτοια που να αποδεικνύει την μεταξύ τους μετάδοση του VRE, κατέστη προφανές ότι υπήρχε μια ευρύτερη διασπορά VRE μέσα στο νοσοκομείο που για κάποιους λόγους έδωσε αυτήν την χρονική συσσώρευση κρουσμάτων.



Είναι γνωστό, από προηγηθείσες διεθνώς μελέτες, ότι ο χώρος εγκατάστασης και διασποράς του VRE είναι το έντερο ασθενών, αλλά και υγιών φορέων της κοινότητας.

Για να διερευνηθεί η έκταση της διασποράς, αλλά και για να καταστεί δυνατή η λήψη αποτελεσματικών μέτρων ελέγχου, αποφασίστηκε από την επιτροπή ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων να διεξαχθεί μελέτη επιπολασμού του ανθεκτικού στην βανκομυκίνη εντεροκόκκου στο γαστρεντερικό σύστημα των νοσηλευομένων στο νοσοκομείο ασθενών.

Ένα τέτοιο εγχείρημα απαιτούσε τον συντονισμό πολλών ενεργειών και αρχικά την ενημέρωση των εμπλεκόμενων φορέων.

Σε προγραμματισμένες συναντήσεις ενημερώθηκαν ομάδες εργαζομένων για την σημασία αυτού του ελέγχου, για τον τρόπο που έπρεπε να συνεργαστούν, αλλά και για την εν γένει στάση τους στο πρόβλημα με ψυχραιμία και νηφαλιότητα.

Ως ημέρα διεξαγωγής της μελέτης ορίστηκε η 1<sup>η</sup> Φεβρουαρίου 2001.

Ιδιαίτερη σημασία είχε η επιλογή της κατάλληλης μεθοδολογίας για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων. Το πρώτο σημαντικό στοιχείο ήταν να εξασφαλισθεί η αντιπροσωπευτικότητα του δείγματος των ασθενών που θα υποβάλλονταν σε έλεγχο. Έτσι αποφασίστηκε να ελεγχθεί το σύνολο των ασθενών (100%) στα τμήματα που, όπως προέκυπτε από την διεθνή βιβλιογραφία, μπορούσαν να χαρακτηρισθούν ως υψηλού κινδύνου, και το 25% των νοσηλευομένων σε όλα τα υπόλοιπα τμήματα, με τυχαία δειγματοληψία.

Το δεύτερο σημαντικό στοιχείο της μελέτης ήταν η επιλογή της μεθοδολογίας. Επιλέξαμε την μέθοδο εμπλουτισμού σε ζωμό (157) και την χρήση καλλιεργητικών υλικών με συγκέντρωση βανκομυκίνης λίγο πάνω από το όριο ευαισθησίας, επειδή η εν λόγω μέθοδος έχει μεγαλύτερη ευαισθησία.

Σκοπός αυτής της μελέτης, πέρα από τον προσδιορισμό της έκτασης της διασποράς του VRE στο ΠΑΓΝΗ, ήταν και να προσδιορισθούν παράγοντες κινδύνου για αποικισμό του εντέρου από VRE. Για τον λόγο αυτό καταρτίστηκε ειδικό ερωτηματολόγιο που περιελάμβανε ερωτήματα ικανά να οδηγήσουν στον καθορισμό παραγόντων κινδύνου και το οποίο συμπληρώνονταν την ημέρα της

δειγματοληψίας από την ομάδα που καταρτίστηκε στα πλαίσια της επιτροπής ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων με σκοπό την διεξαγωγή της μελέτης.

#### **A. 4. Διεξαγωγή πολυκεντρικής μελέτης επιπολασμού του VRE στο γαστρεντερικό σύστημα ασθενών νοσηλευομένων σε 13 Ελληνικά νοσοκομεία**

Στο υπόλοιπο διάστημα του έτους 2001 και στο πρώτο εξάμηνο του 2002 εμφανίζονται στο νοσοκομείο 4 σποραδικά κρούσματα λοίμωξης από VRE. Εξ' αυτών, τα δύο οφείλονται σε στελέχη *E. gallinarum* που παρουσιάζουν συστασιακή, μη επαγωγίμη χαμηλού επιπέδου αντοχή στην βανκομυκίνη και ως εκ τούτου θεωρούνται ήσσονος σημασίας και τα άλλα δύο αναφέρονται σε ασθενείς μεταφερόμενους από άλλα νοσηλευτικά κέντρα (ο ένας από νοσοκομείο των Αθηνών και ο άλλος από ιδιωτικό νοσηλευτήριο της πόλης μας).

Όμως πυκνώνουν οι πληροφορίες και οι ανακοινώσεις για έντονη παρουσία του VRE σε Ελληνικά νοσοκομεία (77, 202, 259). Με σκοπό να προσδιορισθεί το μέγεθος του προβλήματος σε ευρύτερη κλίμακα αποφασίζεται η διενέργεια πολυκεντρικής μελέτης επιπολασμού της μικροβιοφορίας του VRE μεταξύ νοσηλευομένων ασθενών. Τα νοσοκομεία που λαμβάνουν μέρος είναι διασκορπισμένα σε όλη την ελληνική επικράτεια. Δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στην εφαρμογή της ίδιας ακριβώς μεθοδολογίας η οποία είναι η ίδια με την μεθοδολογία της πρώτης επιδημιολογικής μελέτης του ΠΑΓΝΗ καθώς και στη ταυτόχρονη διενέργεια της μελέτης σε όλα τα νοσοκομεία. Ως ημέρα διεξαγωγής της πολυκεντρικής μελέτης ορίζεται η 1<sup>η</sup> Νοέμβριου 2002.

Η αρχική φάση της μελέτης διεξάγεται επί τόπου σε κάθε νοσοκομείο ξεχωριστά. Η περαιτέρω διερεύνηση των απομονωθέντων στελεχών γίνεται στο μικροβιολογικό εργαστήριο του ΠΑΓΝΗ. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται και η ομοιόμορφη εργαστηριακή διερεύνηση όλων των στελεχών

## **A. 5. Καταγραφή και μελέτη περιστατικών λοίμωξης από VRE στο ΠΑΓΝΗ**

Η περίοδος ύφεσης, που διαδέχθηκε την αρχική εμφάνιση λοιμώξεων από VRE στο ΠΑΓΝΗ με μορφή χρονικής συσσώρευσης κρουσμάτων, δεν συνεχίστηκε για πολύ. Αμέσως μετά την δεύτερη μελέτη επιπολασμού που έγινε στα πλαίσια της πολυκεντρικής μελέτης, ακολουθεί εμφάνιση νέων κρουσμάτων λοίμωξης από VRE, επιβεβαιώνοντας έτσι τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την δεύτερη μελέτη επιπολασμού και το γεγονός της ενδημίας στελεχών VRE στο νοσοκομείο. Τα κρούσματα αυτά εμφανίζονται άλλοτε μεμονωμένα, και άλλοτε κατά μικρή συρροή σε κάποιες κλινικές. Σε ορισμένες περιπτώσεις βρίσκεται επιδημιολογική συσχέτιση μεταξύ κάποιων κρουσμάτων και σε άλλες περιπτώσεις όχι.

Καταγράφονται και μελετώνται τα δεδομένα όλων των περιστατικών λοίμωξης από VRE που σημειώθηκαν στο νοσοκομείο από την αρχική εμφάνιση μέχρι το τέλος του έτους 2004. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στα επιδημιολογικά στοιχεία των περιστατικών αυτών με σκοπό να διερευνηθεί η διασπορά και ο τρόπος ενδημίας του VRE στο νοσοκομείο, οι χώροι με την μεγαλύτερη επιβάρυνση, οι πιθανοί δρόμοι μετάδοσης, παράγοντες που ευνοούν την ανάπτυξη λοίμωξης. Παράλληλα εφαρμόζονται μέτρα περιορισμού και διερευνούνται οι τρόποι παρέμβασης και η αποτελεσματικότητά τους.

## **A. 6. Μέθοδοι ελέγχου της ευαισθησίας των απομονωθέντων στελεχών VRE στα αντιβιοτικά**

Κομβικό σημείο στην μελέτη της αντοχής των εντεροκόκκων στα γλυκοπεπτίδια είναι ο έλεγχος ευαισθησίας αυτών στα αντιβιοτικά. Μέχρι την δεκαετία του '80, οπότε και διαπιστώθηκε η παρουσία των ανθεκτικών στα γλυκοπεπτίδια εντεροκόκκων, οι εντερόκοκκοι θεωρούνταν εξ ορισμού ευαίσθητοι στη βανκομυκίνη και ο έλεγχος αυτών για αντοχή στο εν λόγω αντιβιοτικό δεν ήταν επιβεβλημένος στην καθ' ημέρα πράξη.

Αλλά και όταν διαπιστώθηκε η ύπαρξη αντοχής, αρκετές δυσκολίες εντοπίστηκαν στην δυνατότητα των εργαστηρίων να ανιχνεύουν τα ανθεκτικά στελέχη στην καθ' ημέρα πράξη (92, 282, 301, 302). Ιδιαίτερα τα αυτοματοποιημένα συστήματα ελέγχου της ευαισθησίας αποδείχθηκαν περισσότερο ανέτοιμα να ανιχνεύσουν την αντοχή στα γλυκοπεπίδια (305). Έτσι η αναγκαιότητα καθορισμού μεθόδων ελέγχου της αντοχής των εντεροκόκκων στα γλυκοπεπίδια που να είναι εύχρηστοι και εφαρμόσιμοι σε κάθε μικροβιολογικό εργαστήριο κατέστη απόλυτα επιβεβλημένη (300, 301).

Ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά με την μέθοδο της διάχυσης του αντιβιοτικού σε δίσκους δεν είναι αρκετή για να ανιχνεύσει την αντοχή στα γλυκοπεπίδια, ιδιαίτερα όταν αυτή είναι οριακή (302). Καθίσταται επιβεβλημένο ο έλεγχος να συμπληρωθεί, είτε με την μέθοδο agar screening test (300), είτε με προσδιορισμό της ελαχίστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) με την μέθοδο των αραιώσεων σε ζωμό ή άγαρ (236). Συγκρίσιμη με αυτές τις μεθόδους είναι και ο προσδιορισμός της MIC με την μέθοδο E-test (92, 293).

Παράλληλα η ανάγκη θεραπευτικής αντιμετώπισης των λοιμώξεων από VRE με την χρήση αντιβιοτικών καθιστά απαραίτητη την διερεύνηση της ευαισθησίας αυτών σε περισσότερα αντιβιοτικά, άλλα των οποίων είναι ήδη γνωστά και ευρέως χρησιμοποιούμενα και άλλα νέα, που επέβαλλε η θεραπευτική αναγκαιότητα. Ο έλεγχος ευαισθησίας στα εν λόγω αντιβιοτικά είναι χρήσιμος για την πρόιμη ανίχνευση νέων αντοχών.

#### **A. 7. Χαρακτηρισμός του γονότυπου αντοχής στην βανκομυκίνη με την μέθοδο multiplex PCR)**

Η ευρεία εφαρμογή μοριακών μεθόδων στη διαγνωστική των λοιμώξεων δεν θα μπορούσε να εξαιρέσει τον εντερόκοκκο και μάλιστα τον ανθεκτικό στην βανκομυκίνη.

Ευθύς ως εντοπίστηκαν τα πρώτα ανθεκτικά στελέχη επιστρατεύτηκαν μέθοδοι μοριακής βιολογίας για την βαθύτερη κατανόηση του μηχανισμού αντοχής σε μοριακό επίπεδο (186).

Κομβικά σημεία στην διαγνωστική των VRE είναι η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός του τύπου αντοχής, καθώς αυτά είναι αλληλένδετα μεταξύ τους και καθορίζουν την επιδημιολογική σημασία του στελέχους. Βασικό στοιχείο της ταυτοποίησης είναι ο διαχωρισμός των ειδών: *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, και *E. flavescens* από τα υπόλοιπα είδη καθώς αυτά διαθέτουν μηχανισμό συστασιακής αντοχής χαμηλού επιπέδου στην βανκομυκίνη και είναι πολύ σημαντικό να διαχωριστεί η αντοχή αυτού του τύπου από την αντοχή τύπου Van-B, που συνήθως εκφράζεται με οριακές, ή ενδιάμεσες τιμές MIC στην βανκομυκίνη (8-32μg/ml) και με ευαισθησία στην τεϊκοπλανίνη.

Οι αναφορές για στελέχη που διαθέτουν ταυτόχρονα συστασιακή και επίκτητη αντοχή στην βανκομυκίνη (88) κατέστησαν απαραίτητο τον χαρακτηρισμό του τύπου αντοχής παράλληλα με την ταυτοποίηση.

Οι συμβατικές μέθοδοι που διαθέτουμε για να απαντήσουμε σ' αυτά τα ερωτήματα υπόκεινται σε περιορισμούς χρόνου, πολυπλοκότητας και ακρίβειας (81, 106). Η ταυτοποίηση των ειδών μπορεί να ολοκληρώνεται με δοκιμασίες που ενέχουν και τον υποκειμενικό χαρακτήρα, όπως η δοκιμασία παραγωγής χρωστικής για την ταυτοποίηση των κινητών εντεροκόκκων. Συστήματα φαινοτυπικής ταυτοποίησης βάσει βιοχημικών δοκιμών, όπως το API 20STREP, δυσκολεύονται να διαχωρίσουν το είδος *E. gallinarum* από το είδος *E. faecium* χωρίς την χρήση της δοκιμασίας κινητικότητας (132, 239).

Ο φαινότυπος αντοχής μπορεί να χαρακτηριστεί με βάση την δοκιμασία ευαισθησίας στα γλυκοπεπτίδια (βανκομυκίνη και τεϊκοπλανίνη) με την μέθοδο της διάχυσης του αντιβιοτικού σε δίσκους, ή καλύτερα με τον προσδιορισμό της MIC στα εν λόγω αντιβιοτικά. Όμως η ανεύρεση στελεχών VRE τύπου Van-B που εκφράζεται με αντοχή στην τεϊκοπλανίνη σε κάποιες περιπτώσεις, μειώνει την δυνατότητα αυτή (149).

Η μέθοδος της αλυσωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction-PCR) δίνει την δυνατότητα με την χρήση των κατάλληλων primers να ανιχνευθούν τα χαρακτηριστικά για την κάθε περίπτωση γονίδια. Έτσι με την στόχευση γονιδίων χαρακτηριστικών του είδους μπορεί να γίνει ταυτοποίηση των εντεροκόκκων σε επίπεδο είδους (262), ενώ με την στόχευση γονιδίων

χαρακτηριστικών του τύπου αντοχής στην βανκομυκίνη μπορεί να γίνει ο χαρακτηρισμός αυτού σε μοριακό επίπεδο (5, 60, 270).

Επειδή συνήθως στοχεύουμε σε περισσότερα του ενός γονίδια και αναζητούμε απαντήσεις σε περισσότερα ερωτήματα, για λόγους ευχέρειας και συντομίας αναπτύχθηκαν πολύ σύντομα μέθοδοι multiplex PCR, ώστε να αναζητούνται ταυτόχρονα με την χρήση των ειδικών primers σε μία αντίδραση πολλά γονίδια (89, 284). Συνήθως οι ειδικοί primers που χρησιμοποιούνται στοχεύουν τα γονίδια *vanA*, *vanB* που είναι οι συχνότεροι επίκτητοι τύποι αντοχής, τα *vanC1*, *vanC2/C3*, που είναι χαρακτηριστικά των ειδών *E. gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens* αντίστοιχα και χαρακτηρίζουν την φυσική αντοχή των εν λόγω ειδών, καθώς και γονίδια χαρακτηριστικά για τα είδη *E. faecium*, *E. faecalis* που είναι τα συχνότερα είδη εντεροκόκκων με επίκτητο μηχανισμό αντοχής στα γλυκοπεπτίδια.

Η ανάγκη να γίνεται ταυτόχρονα σε μία αντίδραση η αναζήτηση αυτών των πληροφοριών επιβάλλεται και από το γεγονός της ανεύρεσης στελεχών που πέραν της φυσικής τους αντοχής στα γλυκοπεπτίδια έχουν αποκτήσει και επίκτητη αντοχή (88, 341, 67).

### **A. 8. Ανάλυση απομονωθέντων στελεχών VRE με την μέθοδο ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed-Field Gel Electrophoresis-PFGE).**

Η απομόνωση στελεχών που είναι φαινοτυπικά όμοια, ιδιαίτερα όταν αυτό συμβαίνει στο νοσοκομειακό περιβάλλον και αφορά νοσοκομειακές λοιμώξεις, θέτει το ερώτημα της συσχέτισης αυτών και της πιθανής διασποράς ενός ή περισσότερων κλώνων. Η κλινική μικροβιολογία συχνά καλείται να δώσει απάντηση σε αυτό το ερώτημα. Οι συμβατικές μέθοδοι, όπως βιοχημικό profile, οροτυπία, τυποποίηση με βακτηριοφάγους δεν είναι ικανές να απαντήσουν σ' αυτό το ερώτημα. Γι' αυτό έχουν επιστρατευθεί νεότερες μοριακές μέθοδοι, όπως plasmid fingerprinting (177, 210, 303), ριβοτυπία (130, 177, 298), μέθοδοι που βασίζονται στην χρήση της PCR (312), amplified-fragment length

polymorphism (AFLP) analysis (330) και η ανάλυση χρωμοσωμικού DNA με χρήση περιοριστικών ενζύμων και ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (pulsed-field gel electrophoresis-PFGE) (14, 177, 203, 234). Οι μέθοδοι αυτοί τίθενται σε διερεύνηση, καθώς πρέπει να καθορισθούν τα κριτήρια για τον ορισμό της συγγένειας των στελεχών και του τρόπου αξιολόγησης των αποτελεσμάτων που προκύπτουν ( 226, 304).

Προς το παρόν η PFGE φαίνεται να ικανοποιεί καλύτερα την αναγκαιότητα επιδημιολογικής διερεύνησης VRE στελεχών.

Η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε είχε ως αναφορά προγενέστερες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία στην μελέτη του εντεροκόκκου (277, 310).

## **B. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ ΤΟΥ VRE ΣΤΟ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟ ΤΩΝ ΝΟΣΗΛΕΥΟΜΕΝΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΤΟΥ ΠΑΓΝΗ**

### **B. 1. Δειγματοληψία**

Προκειμένου να εξασφαλισθεί η κατά το δυνατόν μεγαλύτερη αντιπροσωπευτικότητα του δείγματος, αλλά και να εντοπισθεί όσο γίνεται μεγαλύτερος αριθμός φορέων, αποφασίστηκε ο αριθμός των εξετασθέντων ασθενών να είναι αρκετά μεγάλος.

#### Πληθυσμός εξετασθέντων

α) 100% των ασθενών στις ειδικές μονάδες υψηλού κινδύνου

- ΜΕΘ (Μονάδα Εντατικής Νοσηλείας)
- ΜΕΠΚ (Μονάδα Εντατικής Περιθαλψης Καρδιοπαθών)
- ΜΤΝ (Μονάδα Τεχνητού Νεφρού)
- ΜΣΦΠΚ (Μονάδα Συνεχούς Φορητής Περιτοναϊκής Κάθαρσης)
- ΝΕΟΓΝΑ (Μονάδα Εντατικής Νοσηλείας Νεογνών)

β) 25% των νοσηλευομένων ασθενών σε όλες τις κλινικές.

Η επιλογή των ασθενών έγινε με την μέθοδο της τυχαίας δειγματοληψίας (ένας στους τέσσερις). Η αφετηρία σε κάθε κλινική από την λίστα των ασθενών ήταν ένας αριθμός από το 1 ως το 4 και από εκεί ανεβαίνοντας ανά 4 αριθμούς επιλέγονταν ο τέταρτος. Κάθε ασθενής που επιλέγονταν ελέγχονταν σε συνεργασία με τον κλινικό γιατρό ώστε να αποκλεισθεί το ενδεχόμενο μιας πραγματικής λοίμωξης από VRE.

#### Τρόπος δειγματοληψίας :

1. δείγμα κοπράνων (σε περίπτωση αδυναμίας λήψεως δείγματος κοπράνων γινόταν λήψη του δείγματος με στυλεό).
2. παραπεμπτικό με την ένδειξη : καλλιέργεια για VRE
3. συμπλήρωση ερωτηματολογίου.

Το ειδικό ερωτηματολόγιο προέβλεπε την δυνατότητα συσχέτισης μιας σειράς παραγόντων για τον προσδιορισμό παραγόντων κινδύνου για αποικισμό του εντέρου από VRE.



## B. 2. ΕΙΔΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΟΠΡΑΝΩΝ ΓΙΑ VRE

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ .....

ΗΛΙΚΙΑ .....

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ..... ΤΗΛΕΦΩΝΟ .....

ΚΛΙΝΙΚΗ ..... ΘΑΛΑΜΟΣ ..... ΚΡΕΒΑΤΙ .....

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΨΗΣ ΚΟΠΡΑΝΩΝ .....

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΙΣΟΔΟΥ ΣΤΟ ΠΑΓΝΗ .....

ΔΙΑΚΙΝΗΣΗ ΣΕ ΑΛΛΕΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ

1. ....

2. ....

3. ....

4. ....

ΠΡΟΣΦΑΤΗ (1 μήνα πριν) ΝΟΣΗΛΕΙΑ ΣΕ ΑΛΛΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑ

1. ....

2. ....

ΚΥΡΙΑ ΝΟΣΟΣ .....

.....

ΑΛΛΕΣ ΝΟΣΟΙ

.....

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΠΟΥ ΧΟΡΗΓΗΘΗΚΑΝ  
( το τελευταίο 10ήμερο)

1. ....

2. ....

3. ....

4. ....

ΑΛΛΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

(ανοσοκατασταλτικά )

1. ....

2. ....

3. ....

4. ....

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑ .....

Χορήγηση αυξητικών παραγόντων σε ζώα      ΝΑΙ                      ΟΧΙ

ΣΗΜΕΙΩΣΤΕ + ΑΝ ΕΧΕΙ ΓΙΝΕΙ (τον τελευταίο μήνα)

- Γαστροσκόπηση
- Κολονοσκόπηση
- Τραχειοτομή
- Αναπνευστήρας
- Κεντρικός φλεβοκαθετήρας
- Ουροκαθετήρας
- ERCP
- Τεχνητός νεφρός
- Περιτοναϊκή κάθαρση
- Χειρουργική επέμβαση → ΕΙΔΟΣ

### **B. 3. Μέθοδος καλλιέργειας κοπράνων για απομόνωση VRE**

✓ Ποσότητα κοπράνων (περίπου 1 γραμμάριο) εμβολιάζεται σε ζωμό Enterococci broth ( Chromocult, Merck, Darmstadt, Germany) περιέχοντα vancomycin ( Eli Lilly & Co., Indianapolis, USA) σε συγκέντρωση 6μg/ml.

✓ Επώαση στους 37° C για 24-48 h.

✓ Οι θετικοί για εντερόκοκκο ζωμοί ανακαλλιεργούνται σε ένα τρυβλίο Columbia αιματούχο colistin nalidixic acid agar και ένα τρυβλίο bile esculin azide agar (Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, France) περιέχον vancomycin σε συγκέντρωση 6μg/ml.

✓ Επώαση στους 37° C για 24-48h.

✓ Οι αποικίες που αναπτύσσονται τυποποιούνται προκαταρκτικά ως εντερόκοκκοι, ώστε να αποκλεισθούν άλλα μικρόβια (γαλακτοβάκιλλοι, Leuconostoc, κ.λ.π.) που έχουν φυσική αντοχή στην βανκομυκίνη.

✓ Οι αποικίες του εντεροκόκκου ελέγχονται για αντοχή στην βανκομυκίνη και τεϊκοπλανίνη με την μέθοδο διάχυσης των δίσκων και E-test.

✓ Οι ανθεκτικοί στην βανκομυκίνη εντερόκοκκοι τυποποιούνται περαιτέρω ως προς το είδος με συμβατικές μεθόδους και ελέγχονται για ευαισθησία στα αντιβιοτικά με πλήρες αντιβιογράμμα.

### **B. 4. Ταυτοποίηση εντεροκόκκων**

Οι αποικίες που αναπτύσσονται στο bile esculin azide agar (BEA) και περιβάλλονται από μαύρη άλω, όπως συμβαίνει με τους εντεροκόκκους, τυποποιούνται αρχικά ως εντερόκοκκοι με βάση την μορφολογία στην gram χρώση, την απουσία παραγωγής καταλάσης και την παρουσία του αντιγόνου ομάδος D κατά Lancefield ώστε να αποκλεισθούν εξ αρχής άλλα μικρόβια που έχουν φυσική αντοχή στην βανκομυκίνη και προσομοιάζουν με τον εντερόκοκκο. Τέτοια μικρόβια είναι οι γαλακτοβάκιλλοι, τα Leuconostoc, και Pediococcus (107).

Μολονότι η ανάπτυξη στο υλικό παρουσία βανκομυκίνης σε συγκέντρωση 6μg/ml (κριτικό όριο αντοχής στην βανκομυκίνη 4μg/ml) ήταν ενδεικτική της αντοχής του εντεροκόκκου στην βανκομυκίνη, εν τούτοις αυτό έπρεπε να επιβεβαιωθεί με έναν προκαταρκτικό έλεγχο του απομονωθέντος στελέχους στα γλυκοπεπτίδια. Αυτός ο έλεγχος γίνεται με την μέθοδο διάχυσης των δίσκων (disk diffusion method) σύμφωνα με τις οδηγίες του NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) και με προσδιορισμό MIC με την μέθοδο E-test για τα δύο γλυκοπεπτίδια, βανκομυκίνη και τεϊκοπλανίνη (236, 237).

Μετά την επιβεβαίωση της αντοχής ακολουθεί πλήρης ταυτοποίηση του στελέχους σε επίπεδο είδους με συμβατικές μεθόδους (106) : ανάπτυξη σε θερμοκρασίες 10° C και 45° C, ανάπτυξη παρουσία χολής, NaCl, βιοχημικές δοκιμές με την βοήθεια του API 20 STREP (Biomerieux, Marcy l' Etoile, France), δοκιμασίες κινητικότητας και παραγωγής χρωστικής.

### **B. 5. Διερεύνηση απομονωθέντων στελεχών VRE.**

Όλα τα απομονωθέντα στελέχη υποβλήθηκαν σε έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά και σε χαρακτηρισμό του γονότυπου αντοχής στα γλυκοπεπτίδια με μεθόδους που περιγράφονται αναλυτικά στις παρακάτω ενότητες: E. Μέθοδοι ελέγχου της ευαισθησίας των απομονωθέντων στελεχών VRE στα αντιβιοτικά, και ΣΤ. Χαρακτηρισμός του γονότυπου αντοχής στην βανκομυκίνη των απομονωθέντων στελεχών VRE με την μέθοδο της πολλαπλής αλυσωτής αντίδρασης με θερμοανθεκτική πολυμεράση (multiplex polymerase chain reaction-PCR). Επιπρόσθετα τα απομονωθέντα VRE στελέχη που έφεραν VanA ή VanB τύπο αντοχής διερευνήθηκαν επιδημιολογικά με την μέθοδο pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) που περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα: Z. Ανάλυση απομονωθέντων στελεχών VRE με την μέθοδο ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed-Field Gel Electrophoresis-PFGE).

## **B. 6. Επιδημιολογική διερεύνηση**

Ο σκοπός της επιδημιολογικής διερεύνησης ήταν να προσδιορισθούν παράγοντες κινδύνου για τον αποικισμό του εντέρου νοσηλευόμενων ασθενών από VRE. Εκπονήθηκε ένα ειδικό πρωτόκολλο που περιελάμβανε δημογραφικά χαρακτηριστικά και κλινικά δεδομένα όλων των ασθενών που έλαβαν μέρος στην μελέτη. Προς τον σκοπό αυτό καταρτίστηκε και το ειδικό ερωτηματολόγιο που προέβλεπε όλους τους πιθανούς παράγοντες κινδύνου λαμβάνοντας υπ' όψιν την διεθνή εμπειρία, αλλά και την εμπειρία από άλλες ανάλογες επιδημιολογικές μελέτες. Καταρτίστηκε ένα ειδικό πρόγραμμα σε ηλεκτρονικό υπολογιστή χρησιμοποιώντας την βάση δεδομένων του προγράμματος “ErI-info 6.0b” με σκοπό την επεξεργασία και ανάλυση των δεδομένων.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα δεδομένα που καταγράφηκαν στο ερωτηματολόγιο και καταχωρήθηκαν στη βάση δεδομένων, οι ακόλουθοι παράγοντες μελετήθηκαν τελικά ως παράγοντες κινδύνου : φύλο, ηλικία, διάρκεια νοσηλείας, προηγηθείσα αντιμικροβιακή θεραπεία (γενικά και κατά ομάδες αντιβιοτικών), προηγηθείσα χειρουργική επέμβαση (μέχρι ένα μήνα πριν) και η υποβολή του ασθενούς σε διεισδυτικούς ιατρικούς χειρισμούς (τραχειοστομία, διασωλήνωση, μηχανική υποστήριξη αναπνοής, χρήση κεντρικών φλεβοκαθετήρων, χρήση ουροκαθετήρων, υποβολή σε νεφρική κάθαρση και ενδοσκοπήσεις, όπως γαστροσκόπηση-κολονοσκόπηση).

## **Γ. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΟΛΥΚΕΝΤΡΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ ΤΟΥ VRE ΣΤΟ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟ ΑΣΘΕΝΩΝ ΝΟΣΗΛΕΥΟΜΕΝΩΝ ΣΕ 13 ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑ**

### **Γ. 1. Νοσοκομεία που συμμετείχαν**

Στην πολυκεντρική μελέτη έλαβαν μέρος 13 νοσοκομεία.

Για λόγους μεθοδολογίας διακρίνονται σε πανεπιστημιακά και γενικά (5 πανεπιστημιακά και 8 γενικά).

Αναφορικά με την γεωγραφική διασπορά κατανέμονται:

- 7 στην Βόρειο Ελλάδα (2 πανεπιστημιακά, 5 γενικά)
- 3 στην Κεντρική Ελλάδα (2 πανεπιστημιακά, 1 γενικό)
- 3 στην Νότια νησιωτική Ελλάδα, Κρήτη (1 πανεπιστημιακό, 2 γενικά)

Τα νοσοκομεία και ο αριθμός εξετασθέντων από κάθε ένα από αυτά παρουσιάζονται στον πίνακα Γ1.

Στην πολυκεντρική μελέτη το ΠΑΓΝΗ αναφέρεται με τον κωδικό ΗΡΑ-1. Στην τρέχουσα ενότητα, αλλά και σε όσες ενότητες αναφέρονται στην πολυκεντρική μελέτη, θα αναφέρεται με αυτήν την κωδική ονομασία.

### **Γ. 2. Δειγματοληψία**

Η δειγματοληψία (πληθυσμός εξετασθέντων, τρόπος λήψης δειγμάτων), συμπλήρωση του ειδικού κοινού ερωτηματολογίου, καλλιέργεια για απομόνωση VRE, προκαταρκτική τυποποίηση εντεροκόκκων και έλεγχος ευαισθησίας στα γλυκοπεπίδια έγιναν σε κάθε νοσοκομείο με την ίδια ακριβώς μεθοδολογία που έχει ήδη περιγραφεί και που εφαρμόστηκε στην πρώτη μελέτη για επιπολασμό του VRE στο ΠΑΓΝΗ. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην αυστηρή τήρηση του κοινού πρωτοκόλλου.

Η δειγματοληψία έγινε σε όλα τα νοσοκομεία την ίδια μέρα ( 1<sup>η</sup> Νοεμβρίου 2002).

**ΠΙΝΑΚΑΣ Γ1.**

**ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑ ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΞΕΤΑΣΘΕΝΤΩΝ  
ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΟΛΥΚΕΝΤΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΓΙΑ  
ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟ ΑΠΟ VRE.**

<b>ΠΑΝ/ΚΑ</b>	<b>ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ</b>	<b>ΣΥΜΒΟΛΟ</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΞΕΤΑΣ ΘΕΝΤΩΝ</b>
	ΑΧΕΠΑ Θεσ/κης	ΘΕΣ-1	128
	ΠΑΓΝ Ηρακλείου	ΗΡΑ-1	204
	ΠΑΓΝ Πάτρας	ΠΤ-1	126
	ΠΑΓΝ Αλεξ/λης	ΑΛ-1	100
	ΠΑΓΝ Ιωαννίνων	ΙΩ-1	119
<b>ΓΕΝΙΚΑ</b>	ΓΚΝ Βενιζέλειο	ΗΡΑ-2	149
	ΓΝ Χαλκίδος	ΧΛ-1	29
	ΓΝ Χανίων	ΧΑ-1	54
	ΓΝ Κομοτινής	ΚΟ-1	19
	ΓΝ Ξάνθης	ΞΑ-1	68
	ΓΝ Καβάλας	ΚΑ-1	45
	Παπανικολάου Θεσ/κης	ΘΕΣ-2	186
	ΓΝ Διδυμοτείχου	ΔΙ-1	19
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>			<b>1246</b>

**Γ. 3. Επιδημιολογική διερεύνηση-παράγοντες κινδύνου**

Η αναζήτηση των παραγόντων κινδύνου έγινε με την ίδια μεθοδολογία που διεξήχθη και η πρώτη μελέτη επιπολασμού του VRE στο ΠΑΓΝΗ. Χρησιμοποιήθηκε το ίδιο ερωτηματολόγιο και τα δεδομένα καταγράφηκαν στο ίδιο πρόγραμμα με την ίδια βάση δεδομένων.

Για την καλύτερη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων οι ασθενείς κατανεμήθηκαν στους κάτωθι τομείς: παθολογικός, χειρουργικός, ΜΕΘ ενηλίκων, ΜΕΘ νεογνών και μονάδες τεχνητού νεφρού.

Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι η επιδημιολογική σημασία των στελεχών που διαθέτουν συστασιακή (φυσική) αντοχή είναι εντελώς

διαφορετική από εκείνων που διαθέτουν επίκτητο και επαγωγίμο μηχανισμό αντοχής. Για τον λόγο αυτών τα στελέχη με επίκτητο τύπο αντοχής και οι ασθενείς που έφεραν αυτά τα στελέχη διαχωρίστηκαν και απετέλεσαν ξεχωριστή ομάδα μελέτης. Κατά την ανάλυση των παραγόντων κινδύνου για αποικισμό από VRE, μόνο οι ασθενείς που ήταν αποικισμένοι από στελέχη με επίκτητο τύπο αντοχής στα γλυκοπεπίδια (Van-A, Van-B) μελετήθηκαν σαν θετικοί. Όσοι βρέθηκαν αποικισμένοι από στελέχη με φυσική αντοχή (VanC1, VanC2/C3) δεν συμπεριελήφθησαν στου θετικούς, αφού η επιδημιολογική σημασία αυτών των τύπων είναι εντελώς διαφορετική.

Για την διερεύνηση των παραγόντων κινδύνου εφαρμόστηκε η μέθοδος ανάλυσης μιας μεταβλητής (univariate), καθώς και η μέθοδος ανάλυσης πολλαπλών μεταβλητών (multivariate) και τα αποτελέσματα αυτών τέθηκαν σε σύγκριση.

#### **Γ. 4. Διερεύνηση απομονωθέντων στελεχών**

Τα απομονωθέντα στελέχη εστάλησαν ακολούθως στο εργαστήριο του ΠΑΓΝΗ όπου διερευνήθηκαν ως ακολούθως:

- επιβεβαίωση της προκαταρκτικής τυποποίησης με συμβατικές και μοριακές μεθόδους
- επιβεβαίωση της αντοχής στα γλυκοπεπίδια με συμβατικές μεθόδους και προσδιορισμός του φαινότυπου αντοχής
  - έλεγχος ευαισθησίας των στελεχών στα αντιβιοτικά
  - χαρακτηρισμός του τύπου αντοχής στα γλυκοπεπίδια με μοριακές μεθόδους (multiplex PCR)
- διερεύνηση των στελεχών με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (pulse field gel electrophoresis, PFGE)

## **Δ. ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ VRE ΣΤΟ ΠΑΓΝΗ**

### **Δ. 1. Καταγραφή ασθενών**

Όλοι οι νοσηλευόμενοι ασθενείς στο ΠΑΓΝΗ που ανέπτυξαν λοίμωξη από VRE μέχρι το τέλος του 2004, συμπεριλαμβανομένων και των πρώτων 5 κρουσμάτων, αποτέλεσαν αντικείμενο καταγραφής και μελέτης.

Τα στοιχεία των ασθενών που καταγράφηκαν και μελετήθηκαν μπορούν να διακριθούν σε:

- Δημογραφικά στοιχεία (ηλικία, φύλο)
- Κλινικά στοιχεία (θέση λοίμωξης, κύρια νόσος – αιτία εισόδου, συμπαρομαρτούντες νόσοι, σχέση της κύριας νόσου με την λοίμωξη από VRE, προηγηθείσες χειρουργικές επεμβάσεις κατά την διάρκεια του προηγούμενου εξαμήνου, προηγηθείσες παρεμβατικές κατά τις τελευταίες 30 ημέρες, χορήγηση αντιβιοτικών κατά τις τελευταίες 30 ημέρες, τελική έκβαση)
- Επιδημιολογικά στοιχεία (κλινική όπου διαγνώστηκε η λοίμωξη, ημέρα νοσηλείας, προηγηθείσες νοσηλείες σε άλλα νοσοκομεία κατά την διάρκεια του τελευταίου εξαμήνου, προηγηθείσες νοσηλείες στην ίδια ή σε άλλες κλινικές του ΠΑΓΝΗ κατά την διάρκεια του τελευταίου εξαμήνου, διακίνηση του ασθενούς κατά την διάρκεια της παρούσης νοσηλείας προ και μετά την διάγνωση της λοίμωξης από VRE, προηγηθείσα απομόνωση VRE στην εν λόγω κλινική, πιθανή συσχέτιση με άλλα κρούσματα λοίμωξης ή αποικισμού από VRE, έλεγχος του ιδίου του ασθενούς για αποικισμό του εντέρου, έλεγχος των άλλων ασθενών του θαλάμου για αποικισμό του εντέρου)
- Μικροβιολογικά δεδομένα (συμμετοχή και άλλων μικροβίων στη λοίμωξη, χαρακτηρισμός της λοίμωξης ως καθαρά VRE λοίμωξη, ή ως πολυμικροβιακή, καταγραφή των άλλων μικροβίων που συμμετείχαν στην λοίμωξη)



## **Δ. 2. Καταγραφή στελεχών**

Τα μικροβιακά στελέχη που μελετούνται στην παρούσα ενότητα είναι στελέχη VRE που απομονώθηκαν από ασθενείς με λοίμωξη κατά το χρονικό διάστημα που προαναφέρθηκε. Σε αρκετές περιπτώσεις από τον ίδιο ασθενή έχουν απομονωθεί περισσότερα του ενός στελέχη. Διακρίνουμε τις εξής περιπτώσεις:

- διαφορετικά στελέχη απομονωθέντα ταυτόχρονα από το ίδιο δείγμα
- στελέχη απομονωθέντα από διαφορετικές εντοπίσεις στον ίδιο ασθενή.
- για στελέχη απομονωθέντα από την ίδια θέση λοίμωξης του ασθενούς σε διαφορετικές όμως χρονικές στιγμές.

Τα δεδομένα των απομονωθέντων στελεχών που μελετήθηκαν στην παρούσα ενότητα είναι:

- Ταυτοποίηση απομονωθέντων στελεχών σε είδος εντεροκόκκου
- Φαινότυπος αντοχής στα γλυκοπεπίδια
- Φαινότυπος αντοχής σε άλλα αντιβιοτικά
- Πολλαπλές απομονώσεις VRE από τον ίδιο ασθενή

## **Δ. 3. Κατανομή σε χρονικές περιόδους**

Το υλικό της μελέτης στην παρούσα ενότητα κατανεμήθηκε σε τρεις περιόδους ανισόμετρες χρονικά, που οριοθετούνται από την διενέργεια των δύο μελετών επιπολασμού. Αυτή η κατανομή έχει κυρίως επιδημιολογική αξία γιατί προσφέρει την δυνατότητα εκτίμησης των ευρημάτων σε σχέση με τα ευρήματα των μελετών επιπολασμού, αλλά και επειδή προκύπτει σαφής διαφοροποίηση των ευρημάτων μεταξύ των τριών περιόδων.

- Α΄ περίοδος, από 18-12-2000 έως 1-2-2001 που χαρακτηρίζεται από την αρχική εμφάνιση των πρώτων 5 κρουσμάτων λοίμωξης
- Β΄ περίοδος, από 2-2-2001 έως και 1-11-2002 που χαρακτηρίζεται ως το μεσοδιάστημα των δύο μελετών επιπολασμού και χαρακτηρίζεται

ως περίοδος ύφεσης, αφού στο διάστημα των 21 μηνών που διαρκεί σημειώθηκαν 4 μεμονωμένα περιστατικά λοίμωξης από VRE.

- Γ' περίοδος, από 2-11-2002 έως το τέλος του 2004 που χαρακτηρίζεται ως περίοδος που επακολούθησε την δεύτερη μελέτη επιπολασμού και απεικονίζει καλύτερα την τάση που επικράτησε εφ' εξής.

## Ε. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

### Ε. 1. Υλικό

Ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά περιέλαβε στελέχη VRE που απομονώθηκαν:

- από παθολογικά δείγματα ασθενών από τον Δεκέμβριο του 2000 ως το τέλος του 2004 και προκάλεσαν λοίμωξη.
- από φορείς στα πλαίσια σποραδικών ελέγχων κατά το ίδιο χρονικό διάστημα.
- από φορείς που εντοπίστηκαν στο ΠΑΓΝΗ κατά τις δύο μελέτες επιπολασμού.
- από φορείς που εντοπίστηκαν σε 7 άλλα νοσοκομεία στα πλαίσια της πολυκεντρικής μελέτης.

Η προέλευση των στελεχών κατά είδος παρουσιάζεται στους πίνακες Ε1-Ε4.

### ΠΙΝΑΚΑΣ Ε1. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *E. FAECIUM*

ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ	ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΑ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΕΙΣ No	ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΑ ΑΠΟ ΦΟΡΕΙΣ No	Σ
ΗΡΑ-1	46	51	97 (66)
ΗΡΑ-2		14	14 (9,5)
ΠΤ-1		29	29 (19,7)
ΘΕΣ-1		3	3 (2)
ΘΕΣ-2		2	2 (1,4)
ΙΩ-1		2	2 (1,4)
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>46</b>	<b>101</b>	<b>147 (100)</b>

**ΠΙΝΑΚΑΣ Ε2. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *E. GALLINARUM***

ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ	ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΑ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΕΙΣ No	ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤ Α ΑΠΟ ΦΟΡΕΙΣ No	ΣΥΝΟΛ Ο No (%)
ΗΡΑ-1	7	53	60 (34,5)
ΗΡΑ-2		59	59 (33,9)
ΧΑ-1	1	7	8 (4,6)
ΠΤ-1		5	5 (2,9)
ΘΕΣ-1		31	31 (17,8)
ΘΕΣ-2		1	1 (0,6)
ΧΛ-1		10	10 (5,7)
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>8</b>	<b>166</b>	<b>174 (100)</b>

**ΠΙΝΑΚΑΣ Ε3. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *E. CASSELI FLAVUS/FLAVESCENS***

ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ	ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤ Α ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΕΙΣ No	ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤ Α ΑΠΟ ΦΟΡΕΙΣ No	ΣΥΝΟΛΟ No (%)
ΗΡΑ-1	2	9	11 (40,1)
ΗΡΑ-2		7	7 (25,9)
ΧΑ-1	1	0	1 (3,7)
ΠΤ-1		2	2 (7,4)
ΘΕΣ-1		2	2 (7,4)
ΘΕΣ-2		1	1 (3,7)
ΙΩ-1		1	1 (3,7)
ΧΛ-1		2	2 (7,4)
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>3</b>	<b>24</b>	<b>27 (100)</b>

**ΠΙΝΑΚΑΣ Ε4. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *E. FAECALIS* ΚΑΙ  
ΑΛΛΑ ΕΙΔΗ**

ΕΙΔΟΣ	ΗΡΑ-1 No		ΗΡΑ-2 No	ΠΤ-1 No	ΘΕΣ-1 No	ΣΥΝΟΛΟ No
	Ασθενείς	Φορείς	Φορείς	Φορείς	Φορείς	
<i>E. faecalis</i>	8	6	3	1	1	19 (76)
<i>E. avium</i>		4				4 (16)
<i>E. hirae</i>		1		1		2 (8)
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>25 (100)</b>

## **E. 2. Έλεγχος ευαισθησίας με την μέθοδο διάχυσης των αντιβιοτικών σε δίσκους.**

Η μέθοδος εφαρμόστηκε σύμφωνα με τις προδιαγραφές του NCCLS (236).

- Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν Mueller-Hinton agar εμπλουτισμένο με αίμα προβάτου σε συγκέντρωση 5%.
- Το μικροβιακό εναιώρημα που εμβολιάστηκε στα τρυβλία είχε τελική συγκέντρωση ισοδύναμη με  $5 \times 10^5$  cfu/ml.
- Τα τρυβλία επώασθηκαν σε 35°C σε κανονική ατμόσφαιρα για 18-24 ώρες.
- Η αξιολόγηση ευαισθησίας έγινε με βάση τα κριτικά όρια (break points) που καθόρισε το NCCLS (237).

## **E. 3. Μέθοδος προσδιορισμού της ελαχίστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) των αντιβιοτικών με την μέθοδο E-test.**

Η μέθοδος εφαρμόστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

- Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν Mueller-Hinton agar εμπλουτισμένο με αίμα προβάτου σε συγκέντρωση 5%.
- Το μικροβιακό εναιώρημα που εμβολιάστηκε στα τρυβλία είχε τελική συγκέντρωση ισοδύναμη με  $5 \times 10^5$  cfu/ml.
- Τα τρυβλία επώασθηκαν σε 35°C σε κανονική ατμόσφαιρα για 18-24 ώρες.
- Ο προσδιορισμός της ελαχίστης ανασταλτικής συγκέντρωσης για κάθε αντιβιοτικό έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Η αξιολόγηση της ευαισθησίας έγινε με βάση τα κριτικά όρια του κατασκευαστή που όμως ήταν σε συμφωνία με αυτά που καθόρισε το NCCLS (237).

#### **E. 4. Αντιβιοτικά.**

Τα αντιβιοτικά που συμπεριελήφθησαν στον έλεγχο ευαισθησίας ήταν τα ακόλουθα:

1. Penicillin
2. Ampicillin
3. Streptomycin (υψηλού επιπέδου αντοχή, HLR)
4. Gentamicin (υψηλού επιπέδου αντοχή, HLR)
5. Tetracycline
6. Rifampicin
7. Chloramphenicol
8. Erythromycin
9. Norfloxacin
10. Ciprofloxacin
11. Imipenem
12. Vancomycin
13. Teicoplanin
14. Linezolid

#### **E. 5. Χαρακτηρισμός φαινότυπου αντοχής στα γλυκοπεπτίδια.**

Ο χαρακτηρισμός του φαινότυπου αντοχής στα γλυκοπεπτίδια έγινε με βάση την ταυτοποίηση του στελέχους σε είδος και την τιμή ελαχίστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) σε βανκομυκίνη και τεϊκοπλανίνη, όπως προτείνουν οι Arthur-Courvalin (5). Βάσει αυτού του σχήματος:

- ο φαινότυπος VanA χαρακτηρίζεται από τιμές ελαχίστης ανασταλτικής συγκέντρωσης και για τα δύο γλυκοπεπτίδια  $\geq 8\mu\text{g/ml}$ , συνήθως όμως οι τιμές MIC της βανκομυκίνης είναι πολύ υψηλές ( $>64\mu\text{g/ml}$ )
- ο φαινότυπος VanB χαρακτηρίζεται από αντοχή στην βανκομυκίνη ( $\text{MIC} \geq 8\mu\text{g/ml}$ ) και ευαισθησία στην τεϊκοπλανίνη ( $\text{MIC} < 8\mu\text{g/ml}$ ) με την προϋπόθεση ότι δεν πρόκειται για κανένα από τα είδη *E.*

*gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens* που ως γνωστό διαθέτουν φυσική αντοχή χαμηλού επιπέδου στην βανκομυκίνη

- ο φαινότυπος VanC αφορά τα είδη *E. gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens* εφ' όσον διαθέτουν την φυσική τους αντοχή στα γλυκοπεπτίδια, η οποία εκφράζεται με ευαισθησία στην τεϊκοπλανίνη και αντοχή χαμηλού επιπέδου στην βανκομυκίνη (MIC 4-16μg/ml).

## **ΣΤ. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΑ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΑΛΥΣΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ (MULTIPLEX PCR)**

### **ΣΤ. 1. Υλικό**

Όλα τα στελέχη που περιγράφονται στην ενότητα Ε και εξετάστηκαν ως προς την ευαισθησία τους στα αντιβιοτικά απετέλεσαν αντικείμενο μελέτης και σε αυτήν την ενότητα. Πρόκειται για 373 στελέχη που η προέλευσή τους παρουσιάζεται στους πίνακες Ε1-Ε4.

### **ΣΤ. 2. Περιγραφή μεθόδου**

Η αλυσωτή αντίδραση θερμοανθεκτικής πολυμεράσης (polymerase chain reaction-PCR) αποτελεί μία μοριακή τεχνική υψηλής ευαισθησίας με την οποία μικρές ποσότητες από ειδικές ακολουθίες DNA, ή RNA αναπαράγονται με την βοήθεια ενζύμων, ώστε να φθάσουν σε επίπεδα ανιχνεύσιμα. Βασικό σημείο της μεθόδου είναι η επιλογή του κατάλληλου ζεύγους εκκινήτων (primers), που αποτελούν ειδικές αλληλουχίες βάσεων ώστε να στοχεύεται και να αναπαράγεται εκάστοτε ένα τμήμα του γενετικού υλικού που χαρακτηρίζει το αναζητούμενο γονίδιο.

Η multiplex PCR αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών γονιδίων σε μία αντίδραση με την χρήση των αντίστοιχων ζευγών primers.

Η μέθοδος multiplex PCR που εφαρμόστηκε για τον χαρακτηρισμό του γονότυπου αντοχής στα γλυκοπεπτίδια βασίστηκε σε προγενέστερες μελέτες (166, 254, 270, 280, 284). Η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε τελικά είναι η περιγραφείσα από τους Kariyama και συν (166) με τροποποιήσεις που αφορούν την φάση εξαγωγής του DNA, τους ειδικούς primers για τους γονότυπους *vanA* και *vanB*, καθώς και τις συγκεντρώσεις των ειδικών primers. Οι ειδικοί primers για τα γονίδια *vanC1*, *vanC2/C3*, *ddl<sub>E. faecium</sub>*, *ddl<sub>E. faecalis</sub>*, *rrs* ήταν ίδιοι με αυτούς



που περιγράφηκαν από τους Kariyama και συν (166). Οι ειδικοί primers για τα γονίδια *vanA*, *vanB* σχεδιάστηκαν με βάση την ήδη γνωστή αλληλουχία βάσεων των γονιδίων και η ταυτότητα των τμημάτων DNA που προέκυψαν από την PCR πιστοποιήθηκε με προσδιορισμό της ακολουθίας των βάσεων με Thermo Sequenase Kit (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA) και την χρήση του BLAST software (<http://www.ncbi.nih.gov>). Η σύνθεση των ειδικών εκκινητών, τα γονίδια που στοχεύουν και το μέγεθος των προϊόντων που παράγονται με την εφαρμογή της PCR παρουσιάζονται στον Πίνακα ΣΤ1.

**ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΤ1. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ PRIMERS ΤΗΣ  
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ MULTIPLEX PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ  
ΤΩΝ VRE**

<b>ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ</b>	<b>ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΖΕΥΓΟΥΣ</b>	<b>ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ PCR (bp)</b>
<i>VanA</i>	5'-AAAGGAGACAGGAGCATG-3' 5'-TTACATACGTCGGGTTTCC-3'	1727
<i>VanB</i>	5'-ATGAATAGAATAAAAGTCGC-3' 5'-TTATCACCTCCTTTAACGCC-3'	1032
<i>vanC1</i>	5'-GGTATCAAGGAAACCTC-3' 5'-CTTCCGCCATCATAGCT-3'	822
<i>vanC2/C3</i>	5'-CGGGGAAGATGGCAGTAT-3' 5'-CGCAGGGACGGTGATTTT-3'	484
<i>E. faecalis</i>	5'-ATCAAGTACATTAGTCTTTATTAG-3' 5'-ACGATTCAAAGCTAACTGAATCAGT-3'	941
<i>E. faecium</i>	5'-TTGAGGCAGACCAGATTGACG-3' 5'-TATGACAGCGACTCCGATTCC-3'	658
<i>rrs (16S rRNA)</i>	5'-GGATTAGATACCCTGGTAGTCC-3' 5'-TCGTTGCGGGACTTAACCCAAC-3'	320

### **ΣΤ. 3. Εξαγωγή του DNA-Μέθοδος φαινόλης**

Η διαδικασία εξαγωγής DNA έγινε ως ακολούθως:

#### **Αρχική κατεργασία με λυσοζύμη και πρωτεΐνάση K**

A. Ανακαλλιέργεια στελεχών σε τρυβλία με Brain Heart infusion agar

Επώαση τρυβλίων σε 35° C για 18h.

B. Περίπου 10 αποικίες διαλύονται σε

- 300μl από 200mM Tris/Cl ph 8,
- 10 μl από διάλυμα λυσοζύμης 30μg/ml, ώστε τελική συγκέντρωση λυσοζύμης 1μg/ml

- 75μl από διάλυμα 400μg/ml RNAase A, ώστε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml

Επώαση 37° C για 30 min.

Γ. Προσθήκη 18 μl από διάλυμα 10% SDS, ώστε τελική συγκέντρωση περίπου 45%.

Δ. Προσθήκη 1,8μl από διάλυμα 20 mg/ml proteinase K, ώστε τελική συγκέντρωση 89 μg/ml.

E. Επώαση σε 56° C για 2 h.

#### **Φάση εκχύλισης με φαινόλη**

Προσθήκη ίσου όγκου (405 μl) διαλύματος phenol-chloroform-isoamylalcohol (25-24-1).

- Ελαφρά ανακίνηση για 10-15 min.
- Φυγοκέντρηση 7min σε 12000 rpm.
- Προσεκτική συλλογή υπερκείμενου (υδατική φάση).

Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος phenol-chloroform-isoamylalcohol (25-24-1).

- Ήπια ανακίνηση για 10-15 min.

- Φυγοκέντρηση 7min σε 12000 rpm.
- Προσεκτική συλλογή υπερκείμενου.

Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος chloroform-isoamylalcohol.

- Ήπια ανακίνηση για 10-15 min.
- Προσεκτική συλλογή υπερκείμενου.

### **Φάση Καθίζησης με αιθανόλη**

- Προσθήκη 1/10 του όγκου του υπερκείμενου 3M οξικού Na pH 5,2 και 2 όγκοι καθαρής αιθανόλης.
- Παραμονή για 20-30 min σε  $-80^{\circ}$  C.
- Φυγοκέντρηση για 15 min σε 12000 rpm.
- Απόρριψη υπερκείμενου.
- Προσθήκη στο ίζημα 0,5 ml ψυχρής αιθανόλης 70%.
- Επαναδιάλυση με 200μl TE 1X pH 8.0.

### **ΣΤ. 4. Πολλαπλή αλυσωτή αντίδραση θερμοανθεκτικής πολυμεράσης (multiplex PCR)**

Η αντίδραση έλαβε χώρα σε ένα τελικό όγκο 50μl που περιείχε:

- 20 mM Tris-HCl (pH 8,3)
- 100 mM KCl
- 3 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,4 mM από ένα έκαστο των τριφωσφορικών

δεοξυνουκλεοτιδίων –dNTPs, (dATP, dCTP, dGTP και dTTP).

- 1 μονάδα *Taq* DNA πολυμεράσης (Qiagen)
- 5 μl προϊόν εξαγωγής του DNA
- primers στις ακόλουθες ποσότητες:

1. *vanC1*, 7,5 pmol
2. *vanC2/C3*, 7,5 pmol

3. *E. faecalis*, 5 pmol
4. *E. faecium*, 1,25 pmol
5. *rrs*, 1,25 pmol
6. *vanA*, 10 pmol
7. *vanB*, 7,5 pmol

Η ειδική σύνθεση των 7 ζευγών primers φαίνεται στον Πίνακα E1.

Το πρόγραμμα για τον πολλαπλασιασμό του DNA έχει ως ακολούθως:

94° C για 5 min

94° C για 1 min	}	30 κύκλοι
54° C για 1 min		
72° C για 1 min		

72° C για 10 min

Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 1% σε 1X TAE buffer.

Το gel αγαρόζης χρωματίστηκε με ethidium bromide και φωτογραφήθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία.

## **Z. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΕΣΗΣ ΣΕ ΠΑΛΛΟΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ (PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS-PFGE)**

### **Z. 1. Περιγραφή μεθόδου**

Η PFGE ανάλυση αποτελεί μοριακή μέθοδο επιδημιολογικής διερεύνησης μικροβιακών στελεχών. Η βασική αρχή της μεθόδου είναι η διάσπαση του DNA με την χρήση ειδικών ενζύμων, τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες (restriction endonucleases). Κατά την διαδικασία της μεθόδου τα μικροβιακά κύτταρα ενσωματώνονται σε αγαρόζη όπου και υφίστανται την διαδικασία της λύσης, και το χρωμοσωμικό DNA επωάζεται με περιοριστικές ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων και διασπών το DNA σε κομμάτια. Στην συνέχεια φέτες από αγαρόζη που περιέχουν τα θραύσματα του DNA εισάγονται σε πηγαδάκια-υποδοχείς μέσα σε gel αγαρόζης ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε συσκευή που εναλλάσσει την κατεύθυνση του ρεύματος σύμφωνα με προκαθορισμένο σχέδιο. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι τα θραύσματα του DNA να αναλυθούν και να δώσουν διακριτές ταινίες. Συγκρίνοντας την εικόνα που δίνουν τα διαφορετικά στελέχη μεταξύ τους μετά την ανάλυση αυτή, καθορίζεται και η συσχέτιση αυτών μεταξύ τους καθώς και προς πρότυπα στελέχη (304).

Η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε είχε ως αναφορά προγενέστερες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία στην μελέτη του εντεροκόκκου (277, 310). Η περιοριστική ενδονουκλεάση *SmaI* είναι το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την κατάτμηση του χρωμοσωμικού DNA, καθώς είναι το καταλληλότερο ένζυμο για την ανάλυση του εντεροκόκκου (όπως και άλλων gram θετικών μικροβίων). Προκύπτουν 15-20 θραύσματα DNA μεγέθους 5-400kb (234, 277, 304, 310).

## Z. 2. Υλικό

Με σκοπό την επιδημιολογική συσχέτιση, 120 στελέχη που έφεραν γονότυπο αντοχής *vanA* ή *vanB* αναλύθηκαν με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE).

Η προέλευση αυτών των στελεχών και η κατανομή τους κατά είδος και τύπο αντοχής παρουσιάζεται στον πίνακα Z1.

Αυτό το υλικό μπορεί επίσης να ταξινομηθεί και με ένα διαφορετικό τρόπο που αποδίδει τον επιδημιολογικό χαρακτήρα αυτών των στελεχών και την σχέση τους με την χρονολογική εξέλιξη των γεγονότων.

Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει 9 στελέχη *E. faecium vanA* και 1 στέλεχος *E. faecium vanB* προερχόμενα από το νοσοκομείο HPA-1 (ΠΑΓΝΗ), που ανήκουν στην πρώτη επιδημιολογική περίοδο, δηλαδή είναι στελέχη που απομονώθηκαν από ασθενείς με λοίμωξη από VRE, που συγκαταλέγονται στα πρώτα συσσωρευμένα κρούσματα και από ασθενείς νοσηλευόμενους στο νοσοκομείο που βρέθηκαν αποικισμένοι από VRE κατά την πρώτη μελέτη επιπολασμού. Πρόκειται δηλαδή για στελέχη που απομονώθηκαν σε χρονικό διάστημα 45 ημερών (από 18/12/2000 έως 1/2/2001).

Η δεύτερη ομάδα, που είναι και η μεγαλύτερη, περιλαμβάνει 85 στελέχη απομονωθέντα από ασθενείς νοσηλευόμενους σε 6 νοσοκομεία που βρέθηκαν αποικισμένοι από VRE στα πλαίσια της πολυκεντρικής μελέτης. Τα στελέχη αυτά είναι διαφορετικά ως προς το είδος και τον γονότυπο αντοχής στα γλυκοπεπίδια, αλλά έχουν το κοινό χαρακτηριστικό ότι απομονώθηκαν την ίδια ακριβώς χρονική στιγμή (1/11/2002).

Στην τρίτη ομάδα περιλαμβάνονται 25 στελέχη *E. faecium vanA* που απομονώθηκαν από ασθενείς νοσηλευόμενους στο νοσοκομείο HPA-1 (ΠΑΓΝΗ) κατά το 15μηνο που ακολούθησε μετά την πολυκεντρική μελέτη (1/11/2002-31/1/2004) και που για το εν λόγω νοσοκομείο ήταν η δεύτερη μελέτη επιπολασμού από VRE.

**ΠΙΝΑΚΑΣ Ζ1. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ  
ΚΑΤΑ ΕΙΔΟΣ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΟ ΑΝΤΟΧΗΣ**

<b>ΕΙΔΟΣ</b>	<b>ΗΡΑ -1</b>	<b>ΗΡΑ -2</b>	<b>ΠΤ -1</b>	<b>ΘΕ Σ-1</b>	<b>ΘΕΣ -2</b>	<b>ΙΩ- 1</b>	<b>ΣΥΝ</b>
<i>E. faecium vanA</i>	49	13	29	3	2	2	98
<i>E. faecium vanB</i>	10	1					11
<i>E. faecalis vanA</i>	1	1	1		1		4
<i>E. gallinarum vanA</i>			1				1
<i>E. casseliflavus vanA</i>			1				1
<i>E. avium vanA</i>	4						4
<i>E. hirae vanA</i>	1						1
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	65	15	32	3	3	2	120



### Z. 3. Μέθοδος εξαγωγής DNA

#### Προετοιμασία μικροβιακών κυττάρων

- καλλιέργεια των στελεχών σε ζωμό Brain Heart Infusion για 24 ώρες
- φυγοκέντρηση 1 ml καλλιεργήματος σε 3400rpm για 10 min
- πλύσιμο του μικροβιακού ιζήματος με Cell Suspension Buffer (CBS), του οποίου η σύνθεση έχει ως ακολούθως: 50mM Tris-Cl pH 8,0, 50mM EDTA pH 8,0
- το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων επαναιωρείται σε 150μl CBS που περιέχει Lysozyme (2,5mg/ml), Lysostaphin (75μg/ml), Proteinase K (1,5mg/ml)
- επώαση σε 37° C για 10 min

#### Ενσωμάτωση σε αγαρόζη

- 150μl (ίσος όγκος με το μικροβιακό εναιώρημα) λιωμένης αγαρόζης 1,2% Sea Gold (FMC BioProducts, Rockland, ME, USA) που περιέχει 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) αναμειγνύεται με το παρασκευασθέν μικροβιακό εναιώρημα και μεταφέρεται στα ειδικά διαμορφωμένα εκμαγεία (CHEF plug molds από Bio-Rad)
- το μείγμα παραμένει για να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min

#### Λύση βακτηριακών κυττάρων

- κάθε δισκίο αγαρόζης μεταφέρεται σε 4 ml λυτικού Buffer (Cell Lysis Buffer) που η σύνθεσή του έχει ως ακολούθως:
  1. 50mM Tris-Cl pH 8,0
  2. 50mM EDTA pH 8,0
  3. 1% Sarkosyl
  4. 400μg/ml Proteinase K)

- επώαση σε 55° C για 2 ώρες
- πλύσιμο των δισκίων αγαρόζης με απιονισμένο και στείρο νερό για 3 φορές επί 10 min κάθε φορά
- πλύσιμο των δισκίων αγαρόζης με TE (10mMTris-Cl, 1mM EDTA pH 8,0) σε 50° C για 10 min επί 3 φορές

#### **Z. 4. Μέθοδος εφαρμογής του περιοριστικού ενζύμου SmaI**

##### Επώαση με περιοριστικό ένζυμο

- ένα λεπτό τεμάχιο του δίσκου επωάζεται εκ των προτέρων σε 1x restriction buffer solution σε 30° C για 15 min
- προσθήκη 30U του περιοριστικού ενζύμου SmaI (Invitrogen)
- επώαση σε 30° C για 4 ώρες

##### Ηλεκτροφόρηση

- 1% Pulse Field Certified αγαρόζη (Bio-Rad)
- συσκευή CHEF DR-III (Bio-Rad)
- χρόνοι 5s ως 25s για 19h στο block 1 και 5s ως 10s για 3h στο block 2
- τάση ηλεκτροφόρησης 6V/ml
- θερμοκρασία 14° C
- buffer 0,5xTBE (Invitrogen)

##### Χρωματισμός

- 0,5μg/ml ethidium bromide για 10 min

##### Αποχρωματισμός

- ddH<sub>2</sub>O για 45-60 min

##### Φωτογράφιση

- σε DC290 Zoom Digital Camera (Kodak)
- σε UV ακτινοβολία

## **Z. 5. Μέθοδος εκτίμησης των ευρημάτων**

Για να μεταφράσουμε τις εικόνες (patterns) που προέκυψαν από τα θραύσματα του DNA μετά από την PFGE και να τα μετατρέψουμε σε πληροφορίες αξιολογήσιμες επιδημιολογικά χρησιμοποιήσαμε τα κριτήρια που περιγράφονται από τους Tenover και συν (304).

**Ταυτόσημα γενετικά** χαρακτηρίστηκαν τα στελέχη που έδωσαν τον ίδιο αριθμό γραμμών (bands) και στην ίδια ακριβώς θέση, δηλαδή την ίδια εικόνα (pattern) μετά από την PFGE ανάλυση, γεγονός που ανάγει στην διάσπαση του DNA αυτών στον ίδιο αριθμό θραυσμάτων του ίδιου μεγέθους. Αυτά τα στελέχη μπορούν να θεωρηθούν ως ανήκοντα στον ίδιο κλώνο.

**Στενή γενετική συγγένεια** χαρακτηρίζει δύο στελέχη συγκρινόμενα μεταξύ τους όταν η διαφορά τους αποδίδεται σε ένα και μοναδικό γενετικό γεγονός (π.χ. σημειακή μετάλλαξη, εισαγωγή ή αποκοπή τμήματος DNA). Αυτό το γεγονός στην εικόνα (pattern) της PFGE ανάλυσης θα μεταφραστεί σε διαφορά κατά 2-3 γραμμές (bands), αφού μπορεί να οδηγήσει στην εξαφάνιση, στην προσθήκη, ή στην μετακίνηση μιας θέσης αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου και έτσι στην εξαφάνιση δύο μικρών θραυσμάτων και στην εμφάνιση ενός μεγαλύτερου, στην εξαφάνιση ενός μεγάλου θραύσματος και στην εμφάνιση δύο μικρότερων, ή στην αντικατάσταση ενός θραύσματος από άλλο διαφορετικού μεγέθους.

**Πιθανή γενετική συγγένεια** χαρακτηρίζει δύο στελέχη που η διαφορά τους αποδίδεται σε 2 ξεχωριστά γενετικά γεγονότα και μεταφράζεται στην εικόνα της PFGE ανάλυσης σε διαφορά 4-6 γραμμών.

**Μη σχετιζόμενα γενετικά** χαρακτηρίζονται στελέχη που η εικόνα με την PFGE ανάλυση διαφέρει κατά 7 και άνω γραμμές και κατά κανόνα αυτό το εύρημα μεταφράζεται σε ομοιότητα των θραυσμάτων DNA <50%, δηλαδή λιγότερα από τα μισά θραύσματα είναι κοινά και στις δύο εικόνες (patterns).

## **ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ**

### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

- A:** Συρροή κρουσμάτων λοίμωξης από VRE στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου.
- B:** Επιδημιολογική μελέτη επιπολασμού για αποικισμό του εντέρου ασθενών του νοσοκομείου από VRE.
- Γ:** Πολυκεντρική επιδημιολογική μελέτη επιπολασμού για αποικισμό του εντέρου νοσοκομειακών ασθενών από VRE σε 13 ελληνικά νοσοκομεία.
- Δ:** Λοιμώξεις από VRE με μορφή σποραδικών κρουσμάτων
- Ε:** Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά απομονωθέντων στελεχών
- ΣΤ:** Διερεύνηση του τύπου αντοχής στην βανκομυκίνη με την μέθοδο multiplex PCR
- Z:** Διερεύνηση των απομονωθέντων στελεχών με την μέθοδο ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο πεδίο (PFGE)

## **A. ΣΥΡΡΟΗ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ VRE ΣΤΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ**

### **A. 1. Διάγνωση της πρώτης για το νοσοκομείο λοίμωξης από VRE**

#### **Περιστατικό Α**

Το πρώτο περιστατικό λοίμωξης από εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη αφορά γυναίκα 78 χρονών πάσχουσα από χρόνια νεφρική ανεπάρκεια.

#### **Αιτία εισόδου**

Επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας.

#### **Παρούσα νόσος**

Εισάγεται στην νεφρολογική κλινική στις 5/11/00 λόγω επιβάρυνσης της κατάστασής της. Η νόσος αντιμετωπίζεται με περιτοναϊκή κάθαρση και κατά διαστήματα υποβάλλεται και σε τεχνητό νεφρό. Μεταφέρεται άλλοτε στην μονάδα συνεχούς φορητής περιτοναϊκής κάθαρσης (ΜΣΦΠΚ) και άλλοτε στην μονάδα τεχνητού νεφρού (MTN) προκειμένου να υποβληθεί στην ανάλογη θεραπεία.

Στις 10/11/00 (5<sup>η</sup> ημέρα νοσηλείας) τοποθετείται μόνιμος περιτοναϊκός καθετήρας. Παρουσίασε όμως προβλήματα στην λειτουργία του και γι' αυτό έγιναν αλλαγές και παράλληλα καλύπτεται με αντιβίωση προληπτικά λόγω αυξημένου κινδύνου ανάπτυξης λοιμώξεων. Αρχικά χορηγείται ceftriaxone (4<sup>η</sup> μέρα νοσηλείας) και αργότερα (7<sup>η</sup> μέρα ) προστίθεται και clindamycin.

Παρά την αντιμικροβιακή αγωγή αναπτύσσει λοίμωξη αναπνευστικού που αποδίδεται σε εισρόφηση (12<sup>η</sup> ημέρα) και γι' αυτό αντικαθίσταται η αντιμικροβιακή αγωγή από vancomycin και netilmicin. Βαθμηδόν αναπτύσσει πλευριτική συλλογή και η αντιμικροβιακή θεραπεία τροποποιείται. Διακόπτεται το σχήμα vancomycin-netilmicin και αντικαθίσταται από ceftazidime (25<sup>η</sup> μέρα), αλλά λόγω επιδείνωσης της κατάστασης της ασθενούς αντικαθίσταται και αυτό από vancomycin-impipenem (30<sup>η</sup> μέρα).

Κατά την 34<sup>η</sup> μέρα γίνεται παρακέντηση του πλευριτικού υγρού, τοποθετείται Billow και αποστέλλεται στο μικροβιολογικό εργαστήριο δείγμα πλευριτικού υγρού

προς καλλιέργεια. Η καλλιέργεια απέβη στείρα μικροβίων. Παράλληλα λόγω της βαρύτητας της ασθενούς και της έλλειψης βακτηριολογικής διάγνωσης της λοίμωξης χορηγείται και rifampicin.

Κατά την 42<sup>η</sup> ημέρα λόγω της ραγδαίας επιδείνωσης της λοίμωξης της ασθενούς προστίθενται στην αγωγή amikacin και fluconazole (αντιμυκητιασική θεραπεία) και την επομένη (43<sup>η</sup> ημέρα) αποστέλλεται εκ νέου δείγμα πλευριτικού υγρού στο μικροβιολογικό εργαστήριο προς καλλιέργεια.

Το πλευριτικό υγρό καλλιεργήθηκε σε στερεά θρεπτικά υλικά (αιματούχο, σοκολατόχρωμο) αερόβια και αναερόβια, αλλά εμβολιάσθηκε και σε εμπλουτιστικό θρεπτικό ζωμό κατάλληλο για αιμοκαλλιέργειες στο αυτοματοποιημένο σύστημα αιμοκαλλιιεργειών Bact-Alert (Organon Teknica). Η καλλιέργεια απέβη θετική σε όλα τα υλικά μέσα σε 24 ώρες. Απομονώθηκε κόκκος gram θετικός που ταυτοποιήθηκε ως *Enterococcus faecium*. Ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά έδειξε αντοχή σε πενικιλίνη και αμπικιλίνη, υψηλού επιπέδου αντοχή στις αμινογλυκοσίδες (στρεπτομυκίνη, καναμικίνη, γενταμικίνη), αντοχή σε (MLS) μακρολίδες-λινκοζαμίνες-συνεργιστίνες (ερυθρομυκίνη, κλινδαμυκίνη, πριστιναμικίνη), αντοχή σε κινολόνες, ριφαμπικίνη, μιπενέμη και ευαισθησία σε τετρακυκλίνη και χλωραμφενικόλη. Το σημαντικό όμως ήταν ότι ανευρέθη αντοχή και στα γλυκοπεπτίδια με την μορφή αντοχής στην βανκομυκίνη και ευαισθησίας στην τεϊκοπλανίνη (φαινότυπος Van-B).

Η ασθενής τέθηκε αμέσως σε απομόνωση, η βανκομυκίνη αντικαταστάθηκε από τεϊκοπλανίνη, αλλά η κατάσταση της ασθενούς ήταν ήδη βεβαρημένη και απεβίωσε την επόμενη μέρα σε σηπτική κατάσταση μετά από 46 ημέρες νοσηλείας.

Με σκοπό την αποτροπή διασποράς VRE στο νοσοκομείο, η επιτροπή ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων σε συνεργασία με το ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό της κλινικής έλαβε μέτρα απομόνωσης της ασθενούς, απολύμανσης του θαλάμου νοσηλείας της μετά την αποβίωσή της και έλεγχο όλων των νοσηλευομένων ασθενών της κλινικής (24 ασθενείς) για αποικισμό του εντέρου από VRE.

## A. 2. Επιδημιολογική διερεύνηση του πρώτου κρούσματος

Η διάγνωση του πρώτου για το νοσοκομείο περιστατικού λοίμωξης από VRE κινητοποίησε την επιτροπή ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων που εκτός από τα μέτρα περιορισμού –απομόνωσης της ασθενούς και απολυμάνσεων, αποφάσισε και τον έλεγχο όλων των ασθενών της κλινικής για αποικισμό του εντέρου από VRE. Μαζί με τους ασθενείς της νεφρολογικής κλινικής ελέγχθηκαν και οι ασθενείς της αιματολογικής κλινικής που νοσηλεύονται στον ίδιο χώρο.

Συνολικά ελέγχθηκαν 24 ασθενείς. Εξ αυτών, 4 ασθενείς της αιματολογικής κλινικής βρέθηκαν αποικισμένοι από *E. faecium* με αντοχή στην βανκομυκίνη φαινοτύπου Van-B.

### ΠΙΝΑΚΑΣ Α1. ΦΟΡΕΙΣ VRE ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΘΗΚΕ ΤΟ ΠΡΩΤΟ ΚΡΟΥΣΜΑ.

ΦΟΡΕΑΣ	Η/α	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΚΛΙΝΙΚΗ	ΕΙΔΟΣ	ΤΥΠΟΣ
ΦΟΡ Α	22/12/00	KP28510	ΑΙΜ	<i>E. faecium</i>	Van-B
ΦΟΡ Β	22/12/00	KP28512	ΑΙΜ	<i>E. faecium</i>	Van-B
				<i>E. gallinarum</i>	Van-C1
ΦΟΡ Γ	22/12/00	KP28513	ΑΙΜ	<i>E. faecium</i>	Van-B
ΦΟΡ Δ	4/1/00	KP295	ΑΙΜ	<i>E. faecium</i>	Van-B

### **Α. 3. Ανάδυση του προβλήματος με την μορφή χρονικής συρροής κρουσμάτων**

#### **Περιστατικό Β**

Το δεύτερο περιστατικό λοίμωξης από VRE σημειώθηκε 13 ημέρες μετά την διάγνωση του πρώτου. Αφορά άνδρα ηλικίας 36 ετών με ιστορικό παραπληγίας από 14ετίας. Λόγω της νόσου του έχει πολλαπλές εισαγωγές και νοσηλείες σε άλλα νοσηλευτικά ιδρύματα της χώρας και έχει υποστεί πολλαπλές χειρουργικές επεμβάσεις.

#### **Παρούσα νόσος**

Ο ασθενής εισάγεται στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου στις 21/12/00 και νοσηλεύεται στην ορθοπεδική κλινική. Είναι παραπληγικός με μόνιμο ουροκαθετήρα, ακρωτηριασμένο το αριστερό κάτω άκρο και ο λόγος της εισαγωγής του είναι η χαλαρωμένη προσθία σπονδυλοδεσία και η πιθανότητα φλεγμονής της σπονδυλικής στήλης.

Στις 29/12/00 (9<sup>η</sup> μέρα νοσηλείας) μεταφέρεται στην αγγειοχειρουργική κλινική λόγω ισχαιμίας του δεξιού κάτω άκρου.

Στις 2/1/01 (13<sup>η</sup> μέρα νοσηλείας) υφίσταται χειρουργικό καθαρισμό των κατακλίσεων του και δείγμα πύου από αυτές αποστέλλεται προς καλλιέργεια στο μικροβιολογικό εργαστήριο. Την ίδια μέρα ο ασθενής μεταφέρεται και πάλι στην ορθοπεδική κλινική αφού το πρόβλημα ισχαιμίας του δεξιού κάτω άκρου δεν θεωρείται σοβαρό. Τα αντιβιοτικά που του χορηγήθηκαν στην διάρκεια της νοσηλείας του ήταν norfloxacin, ceftriaxone, και doxycycline.

Από το πύο των κατακλίσεων απομονώνεται *E. faecium* με αντοχή στην βανκομυκίνη τύπου Van-B.

Ο έλεγχος για αποικισμό του εντέρου από VRE απέβη αρνητικός.

Ο ασθενής τίθεται σε απομόνωση, οι κατακλίσεις του αντιμετωπίζονται με τοπική θεραπεία και εξέρχεται σε σταθερή κατάσταση μετά από 29 ημέρες νοσηλείας συνολικά.



## Περιστατικό Γ

Το τρίτο περιστατικό αφορά γυναίκα ηλικίας 70 ετών που εισάγεται στο νοσοκομείο στις 26/12/00 σε επείγουσα κατάσταση και αντιμετωπίζεται χειρουργικά

### **Αιτία εισόδου**

Μεταφέρεται με έντονο κοιλιακό άλγος και λευκοκυττάρωση. Εισάγεται στην χειρουργική ογκολογική όπου τοποθετείται κεντρικός φλεβοκαθετήρας στην υποκλείδιο φλέβα.

### **Παρούσα νόσος**

Στις 30/12/00 (5<sup>η</sup> ημέρα νοσηλείας) εισάγεται επειγόντως στο χειρουργείο με εικόνα οξείας κοιλίας για ερευνητική λαπαροτομία. Διαπιστώνεται διάτρηση ανιόντος και κατιόντος κόλου σε έδαφος ισχαιμίας. Γίνεται ειλεοστομία και κολοστομία στο κατιόν μετά από εκτεταμένη κολεκτομή.

Μετά το χειρουργείο μεταφέρεται στην μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) και λόγω της σηπτικής κατάστασης που βρίσκεται χορηγείται αντιμικροβιακή αγωγή με την μορφή τριπλού σχήματος αποτελούμενο από ciprofloxacin, vancomycin, και συνδυασμό piperacillin/tazobactam.

Στις 1/1/01 ( 7<sup>η</sup> ημέρα νοσηλείας / 3<sup>η</sup> μετεγχειρητική) εισάγεται και πάλι στο χειρουργείο όπου αφαιρείται και πάλι τμήμα του κατιόντος κόλου.

Στις 4/1/01 (10<sup>η</sup> ημέρα νοσηλείας / 6<sup>η</sup> μετεγχειρητική) λόγω της σηπτικής κατάστασης της ασθενούς προστίθεται και fluconazole στην αγωγή της.

Στις 5/1/01 ( 11<sup>η</sup> ημέρα νοσηλείας / 7<sup>η</sup> μετεγχειρητική) αποστέλλεται υγρό από την παροχέτευση της περιτοναϊκής κοιλότητας προς καλλιέργεια στο μικροβιολογικό εργαστήριο. Το αποτέλεσμα της καλλιέργειας είναι η ανάπτυξη και απομόνωση ενός βακτηρίδιο αρνητικού κατά gram που ταυτοποιήθηκε ως *Acinetobacter baumannii* και ενός κόκκου θετικού κατά gram που ταυτοποιήθηκε ως *Enterococcus faecium*. Ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά έδειξε ότι υπήρχε αντοχή στα γλυκοπεπτίδια, τόσο στην βανκομυκίνη όσο και στην τεϊκοπλανίνη (φαινότυπος Van-A).

Στις 11/1/01 (17<sup>η</sup> ημέρα νοσηλείας /13<sup>η</sup> μετεγχειρητική) εισάγεται στο χειρουργείο για πλύση της περιτοναϊκής κοιλότητας και τροποποιείται η αντιμικροβιακή αγωγή λόγω των αποτελεσμάτων της καλλιέργειας. Διακόπτονται vancomycin,

piperacillin/tazobactam, fluconazole, και προστίθενται meropenem, chloramphenicol, rifampicin.

Στις 17/1/01 (23<sup>η</sup> ημέρα νοσηλείας / 19<sup>η</sup> μετεγχειρητική) υποβάλλεται και πάλι σε πλύση της περιτοναϊκής κοιλότητας. Η κατάσταση της παραμένει βαριά και σηπτική.

Στις 6/2/01 (43<sup>η</sup> ημέρα νοσηλείας / 39<sup>η</sup> μετεγχειρητική η ασθενής κατέληξε με εικόνα βαριάς σήψης.

Από 5/1/01 και ως το τέλος άλλα 3 δείγματα περιτοναϊκού υγρού και ένα δείγμα κοπράνων απέβησαν θετικά για εντερόκοκκο ανθεκτικό στην βανκομυκίνη.

Τα ευρήματα από τις καλλιέργειες των δειγμάτων της ασθενούς παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα Α2.

### **Περιστατικό Δ**

Το τέταρτο περιστατικό αφορά άνδρα ηλικίας 52 χρόνων που πάσχει από τετραπληγία λόγω εγκεφαλικής αιμορραγίας, διαγιγνώσκεται στις 8/1/01, 21 μέρες μετά την διάγνωση του 1<sup>ου</sup> περιστατικού

**Αιτία εισόδου:** επιδείνωση της κατάστασής του, εμπύρετο.

**Ιστορικό:** στις 9/10/00 ο ασθενής μεταφέρεται στο ΠΑΓΝΗ σε κωματώδη κατάσταση με εικόνα αιμορραγίας του εγκεφαλικού στελέχους και περιεστιάκo οίδημα.

Εισάγεται στην ΜΕΘ όπου διασωληνώνεται και υφίσταται υποστήριξη των ζωτικών του λειτουργιών ως τις 24/10/00.

Στις 24/10/00 (15<sup>η</sup> μέρα νοσηλείας) μεταφέρεται στην νευρολογική κλινική. Βρίσκεται σε κωματώδη κατάσταση, έχει τραχειοστομία, κεντρικό φλεβικό καθετήρα, ουροκαθετήρα Folley, καθετήρα τύπου Levin, και είναι χωρίς κατακλίσεις.

Στις 28/11/00 (50<sup>η</sup> μέρα νοσηλείας) φέρει μεγάλη κατάκλιση στην οσφυο-ιερά χώρα και υφίσταται χειρουργικό καθαρισμό.

Στις 23/12/00 (75<sup>η</sup> μέρα) εξέρχεται του νοσοκομείου χωρίς ουσιαστική βελτίωση της κατάστασής του.

**Παρούσα νόσος:** στις 5/1/01 ( μετά από 13 μέρες παραμονή στο σπίτι) μεταφέρεται λόγω εμπυρέτου και επιδείνωσης της κατάστασής του και εισάγεται στην Γενική Παθολογική κλινική.

Στις 8/1/01 (3<sup>η</sup> μέρα της νέας νοσηλείας του/78<sup>η</sup> από αρχική) υφίσταται χειρουργικό καθαρισμό της κατάκλισής του και δείγμα πύου αποστέλλεται προς καλλιέργεια στο μικροβιολογικό εργαστήριο.

Από την καλλιέργεια αναπτύσσονται και απομονώνονται:

1. *Morganella morganni*
2. *Esherichia coli*
3. *Enterococcus faecium*

Ο έλεγχος ευαισθησίας του εντεροκόκκου έδειξε ότι ήταν ανθεκτικός στα γλυκοπεπτίδια, και στην βανκομυκίνη και την τεϊκοπλανίνη (φαινότυπος Van-A)

Ο έλεγχος για αποικισμό του εντέρου του ασθενούς από VRE απέβη θετικός. Το στέλεχος που απομονώθηκε από τα κόπρανα ήταν *E. faecalis* με φαινότυπο Van-A.

Ο ασθενής εξέρχεται στις 24/1/01 (19 μέρες νέας νοσηλείας/94 μέρες συνολικά) σε σταθερή κατάσταση.

Κατά την διάρκεια της νοσηλείας του έλαβε τα εξής αντιβιοτικά:

Ampicillin, Ceftriaxone, Vancomycin, Piperacillin/tazobactam, Imipenem, και Meropenem.

### **Περιστατικό Ε**

Το πέμπτο κατά σειρά περιστατικό λοίμωξης από VRE ήταν και το τελευταίο σ' αυτό το άθροισμα κρουσμάτων και διαγνώστηκε 31 μέρες μετά την διάγνωση του 1<sup>ου</sup> περιστατικού. Αφορούσε άνδρα ηλικίας 70 ετών νοσηλευόμενο στην ΜΕΘ

**Αιτία εισόδου :** ο ασθενής μεταφέρεται στο νοσοκομείο στις 27/12/00 με σύνδρομο καταπλάκωσης εξ αιτίας τροχαίου ατυχήματος.

#### **Παρούσα νόσος**

Η κατάστασή του είναι βαριά, φέρει πολλαπλές κακώσεις στο θώρακα, κατάγματα κλείδας και πλευρών, και διαγιγνώσκεται πνευμοθώρακας .

Τοποθετείται Billow στο δεξιό ημιθώρακιο, κεντρικός φλεβοκαθετήρας και ουροκαθετήρας.

Στις 7/1/01 (11<sup>η</sup> μέρα νοσηλείας) υφίσταται καθαρισμό εκτεταμένων κατακλίσεων που φέρει σε γλουτούς, κόκκυγα και πλάτη.

Στις 19/1/01 (23<sup>η</sup> μέρα νοσηλείας) διαπιστώνεται ρήξη της χοληδόχου κύστης και εισάγεται στο χειρουργείο όπου υφίσταται χολοκυστεκτομή, εξωτερική χολοκυστοστομία και παροχέτευση. Το πύο της χοληδόχου κύστης αποστέλλεται στο μικροβιολογικό εργαστήριο για καλλιέργεια.

Στην καλλιέργεια αναπτύσσεται και απομονώνεται *E. faecium* ανθεκτικός στην βανκομυκίνη (VRE) με φαινότυπο Van-B.

Ο ασθενής νοσηλεύεται σε βαριά κατάσταση ως τις 30/1/01 (34<sup>η</sup> μέρα νοσηλείας) οπότε και κατέληξε.

Από την ημέρα της πρώτης απομόνωσης ως το τέλος άλλα δύο δείγματα του υλικού της παροχέτευσης εστάλησαν προς καλλιέργεια στο μικροβιολογικό εργαστήριο. Και στα δύο αναπτύχθηκε και απομονώθηκε *E. faecium* με αντοχή στην βανκομυκίνη τύπου Van-B.

Ο έλεγχος για αποικισμό του εντέρου από VRE απέβη αρνητικός.

Στην διάρκεια της νοσηλείας του έλαβε τα εξής αντιβιοτικά: Amoxicillin/clavulanic, Ticarcillin/clavulanic, Vancomycin, Ciprofloxacin, και Imipenem.

Τα κλινικά και επιδημιολογικά δεδομένα των 5 ασθενών παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα A3. Τα βακτηριολογικά δεδομένα των απομονωθέντων στελεχών VRE συνοψίζονται στον Πίνακα A4.

**ΠΙΝΑΚΑΣ Α2: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ ΠΕΡ Γ.**

Η/Α	ΚΩΔ. ΔΕΙΓΜ	ΔΕΙΓΜΑ	ΕΙΔΗ
5/1/01	ΠΥ438	περιτοναϊκό	<i>A. baumannii</i> <i>E. faecium</i> (VRE)
9/1/01	ΠΥ686	περιτοναϊκό	<i>A. baumannii</i> <i>E. durans</i> <i>E. gallinarum</i> (VRE) <i>E. faecium</i> (VRE)
12/1/01	ΠΥ1045	περιτοναϊκό	<i>A. baumannii</i> <i>E. faecium</i> (VRE)
18/1/01	ΠΥ1516	περιτοναϊκό	ΣΤΕΙΡΑ
24/1/01	ΠΥ2020	περιτοναϊκό	<i>A. baumannii</i>
31/1/01	ΠΥ2579	περιτοναϊκό	<i>S. maltophilia</i> <i>C. tropicalis</i> <i>E. faecium</i> (VRE)
31/1/01	ΚΡ2632	κόπρανα	<i>E. faecium</i> (VRE)
2/2/01	ΠΥ2861	περιτοναϊκό	<i>S. maltophilia</i> <i>A. baumannii</i>

**ΠΙΝΑΚΑΣ Α3. ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΤΩΝ 5 ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΠΟ VRE**

ΑΣΘΕΝΗΣ	Η/Α ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΤΜΗΜΑ	ΗΜΕΡΑ ΝΟΣΗΛΕΙΑΣ	ΠΡΟΗΓΗΘΕΙΣΑ ΝΟΣΗΛΕΙΑ	ΘΕΣΗ ΛΟΙΜΩΞΗΣ	ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΠΡΙΝ	ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΜΕΤΑ	ΕΚΒΑΣΗ
ΠΕΡ Α	18-12-00	Θ	78	ΝΕΦΡ	43 <sup>H</sup>		ΠΛΕΥΡΙΚ. ΥΓΡΟ	Cefuroxime Clindamycin Vancomycin Netilmicin Ceftazidime Imipenem Rifampicin Amikacin Fluconazole	Teicoplanin	ΚΑΤΕΛΗΞΕ
ΠΕΡ Β	2-1-01	Α	36	ΟΡΘ	11 <sup>H</sup>	ΝΟΣΟΚ. ΡΙΟΥ Θ.Α.Κ.	ΕΛΚΗ ΚΑΤΑΚΛΙΣΕΩΝ	Norfloracin Ceftriaxone	Doxycyclin	ΕΞΗΛΘΕ
ΠΕΡ Γ	5-1-01	Θ	70	ΜΕΘ	10 <sup>H</sup>	ΧΟΓΚ	ΠΕΡΙΤΟΝ. ΥΓΡΟ	Ciprofloxacin Vancomycin Ticarc/clavulanic	Vancomycin Fluconazole Meropenem Chloramphenicol Rifampicin	ΚΑΤΕΛΗΞΕ
ΠΕΡ Δ	8-1-01	Α	52	ΠΑΘ	78 <sup>H</sup>	ΝΕΥΡ	ΕΛΚΗ ΚΑΤΑΚΛΙΣΕΩΝ	Vancomycin Piperac/tazobact. Imipenem Meropenem	Ceftriaxone Ampicillin Vancomycin	ΕΞΗΛΘΕ
ΠΕΡ Ε	19-1-01	Α	70	ΜΕΘ	23 <sup>H</sup>		ΠΕΡΙΤΟΝ. ΥΓΡΟ	Amoxic/clavulan Vancomycin Ciprofloxacin Ticarcil/clavulan Imipenem		ΚΑΤΕΛΗΞΕ

ΠΙΝΑΚΑΣ Α4. ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Ασθενής	Κωδικός	Δείγμα	Ημ/α	Είδος	Τύπος	Pen	Str	Gen	Te	Ra	Chl	Ery	Nor	Imp	Va	Tec
ΠΕΡ Α	28223	ΠΛΕΥ	18/12/00	<i>E. faecium</i>	Van-B	R	HLR	HLR	S	HR	S	HR	R	R	R	S
ΠΕΡ Β	93	ΚΑΤΑΚΛ	2/1/01	<i>E. faecium</i>	Van-B	R	HLR	LLR	S	HR	S	IR	R	R	R	S
ΠΕΡ Γ	438	ΠΕΡΙΤΟΝ	5/1/01	<i>E. faecium</i>	Van-A	R	HLR	HLR	S	LR	S	HR	R	R	R	R
	686/1	ΠΕΡΙΤΟΝ	9/1/01	<i>E. gallinarum</i>	Van-C1	S	LLR	LLR	LR	S	S	S	S	S	R	S
	686/2	ΠΕΡΙΤΟΝ	9/1/01	<i>E. faecium</i>	Van-A	R	HLR	HLR	R	LR	IR	HR	S	R	R	R
	1045	ΠΕΡΙΤΟΝ	11/1/01	<i>E. faecium</i>	Van-A	R	LLR	LLR	S	LR	S	HR	R	R	R	R
	2579	ΠΕΡΙΤΟΝ	31/1/01	<i>E. faecium</i>	Van-A	R	HLR	LLR	HR	HR	R	HR	R	R	R	R
	2632	ΚΟΠΡΑΝ	31/1/01	<i>E. faecium</i>	Van-A	R	HLR	HLR	HR	HR	R	HR	S	R	R	R
ΠΕΡ Δ	610	ΠΕΡΙΤΟΝ	8/1/01	<i>E. faecium</i>	Van-A	R	HLR	LLR	S	S	S	HR	R	R	R	R
	1909	ΚΟΠΡΑΝ	23/1/01	<i>E. faecalis</i>	Van-A	S	HLR	HLR	HR	S	S	HR	R	R	R	R
ΠΕΡ Ε	1646	ΠΕΡΙΤΟΝ	19/1/01	<i>E. faecium</i>	Van-B	R	LLR	LLR	LR	LR	IR	HR	R	R	R	S

#### **A. 4. Συσχέτιση περιστατικών**

Μετά από την προσεκτική καταγραφή των 5 περιστατικών λοίμωξης από VRE στο ΠΑΓΝΗ ακολούθησε η αναζήτηση πιθανής συσχέτισης αυτών. Η διακίνηση των ασθενών στις κλινικές παρουσιάζεται σχηματικά στο ΣΧΗΜΑ Α2.

Η ασθενής ΠΕΡ Α, που αποτελεί το πρώτο στο ΠΑΓΝΗ περιστατικό δεν φαίνεται να σχετίζεται με κανένα από τα επόμενα περιστατικά. Η εισαγωγή αυτών των ασθενών στο ΠΑΓΝΗ έγινε αφού η ασθενής ΠΕΡ Α είχε αποβιώσει. Αλλά και κανένα από τα επόμενα κρούσματα δεν σημειώθηκε στην ίδια κλινική.

Ο ασθενής ΠΕΡ Β νοσηλεύτηκε σε δύο κλινικές, όμως σε καμία από αυτές δεν νοσηλεύτηκε κανένας άλλος από τους υπόλοιπους τέσσερις ασθενείς. Στις 2/1/01 ο εν λόγω ασθενής υφίσταται χειρουργικό καθαρισμό των κατακλίσεών του.

Σαφής συσχέτιση φαίνεται μεταξύ των ασθενών ΠΕΡ Γ και ΠΕΡ Ε. Αμφότεροι νοσηλεύτηκαν στην μονάδα εντατικής νοσηλείας (ΜΕΘ) και για 32 μέρες (το μεγαλύτερο διάστημα της νοσηλείας τους κατά την διάρκεια του οποίου σημειώθηκε και η λοίμωξη από VRE) βρέθηκαν στον ίδιο χώρο νοσηλείας. Η ασθενής ΠΕΡ Γ στις 30/1/00 υπέστη εκτεταμένη εντερεκτομή λόγω διάτρησης του εντέρου, στις 1/1/01 συμπληρωματική εντερεκτομή, και στις 11/1/01 και 17/1/01 περιτοναϊκές πλύσεις λόγω σηπτικής κατάστασης. Επομένως όλα τα χειρουργεία της ήταν σηπτικά. Ο ασθενής ΠΕΡ Ε στις 7/1/01 υπέστη χειρουργικό καθαρισμό κατακλίσεων και στις 19/1/01 χολοκυστεκτομή λόγω ρήξης της χοληδόχου κύστης.

Αυτό που διαφοροποιεί τα δύο περιστατικά είναι το γεγονός ότι τα στελέχη που απομονώθηκαν διαθέτουν διαφορετικό τύπο αντοχής στα γλυκοπεπτίδια και εν τέλει είναι διαφορετικά μεταξύ τους (*vanA* στην ασθενή ΠΕΡ Γ και *vanB* στον ασθενή ΠΕΡ Ε).

Ο ασθενής ΠΕΡ Δ δεν νοσηλεύτηκε παράλληλα με κανέναν από τους προηγούμενους ασθενείς. Ωστόσο, σε προγενέστερη εισαγωγή του νοσηλεύτηκε στην ΜΕΘ (2 μήνες πριν εμφανιστούν τα κρούσματα λοίμωξης από VRE) και υπέστη χειρουργικό καθαρισμό των κατακλίσεών του 20 ημέρες πριν από την εμφάνιση του πρώτου κρούσματος.



### **A. 5. Συσχέτιση του πρώτου περιστατικού λοίμωξης με τους φορείς VRE που εντοπίστηκαν αμέσως στην ίδια κλινική.**

Στο Σχήμα A1 και στον Πίνακα A5 παρουσιάζεται η χωροταξική κατανομή των φορέων και του περιστατικού λοίμωξης κατά την διάρκεια της νοσηλείας τους στην κλινική. Η ασθενής με την λοίμωξη και ένας από τους φορείς είχαν νοσηλευθεί σε δύο θαλάμους, ενώ οι άλλοι τρεις φορείς είχαν νοσηλευτεί διαδοχικά σε τρεις θαλάμους. Κανένας δηλαδή από τους 5 ασθενείς δεν περάτωσε την νοσηλεία του σε ένα θάλαμο.

Όλοι οι ασθενείς με VRE είχαν νοσηλευθεί στον ίδιο θάλαμο με άλλον έναν ή δύο από τους θετικούς για VRE ασθενείς. Είναι σαφές ότι υφίσταται χωροταξική συσχέτιση μεταξύ τους, όμως οι πολλές μετακινήσεις δεν μας επέτρεψαν να προσδιορίσουμε τον τρόπο διασποράς του VRE μέσα στην κλινική.

### **A. 6. Συμπεράσματα**

- Οι λοιμώξεις από VRE πρωτοεμφανίστηκαν στο ΠΑΓΝΗ με την μορφή χρονικής συρροής κρουσμάτων
- Μόνο δύο από τα πέντε περιστατικά παρουσιάζουν τοπική συσχέτιση λόγω παράλληλης νοσηλείας στον ίδιο χώρο για 32 μέρες
- Κοινό χαρακτηριστικό των 4 από τους ασθενείς ήταν η παρουσία κατακλίσεων
- Τα απομονωθέντα από τους ασθενείς στελέχη παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία και διαφέρουν σαφώς μεταξύ τους. Ανήκουν σε διαφορετικά είδη (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*), παρουσιάζουν διαφορετικούς τύπους αντοχής στην βανκομυκίνη (*vanA*, *vanB*, *vanC1*), έχουν διαφορετική εικόνα αντοχής στα άλλα αντιβιοτικά που ελέγχθηκαν και κατά την PFGE ανάλυση (Ενότητα Z)

κατατάχθηκαν σε διαφορετικές ομάδες. Επομένως τα κρούσματα αυτά δεν μπορούν να αποδοθούν σε ένα στέλεχος.

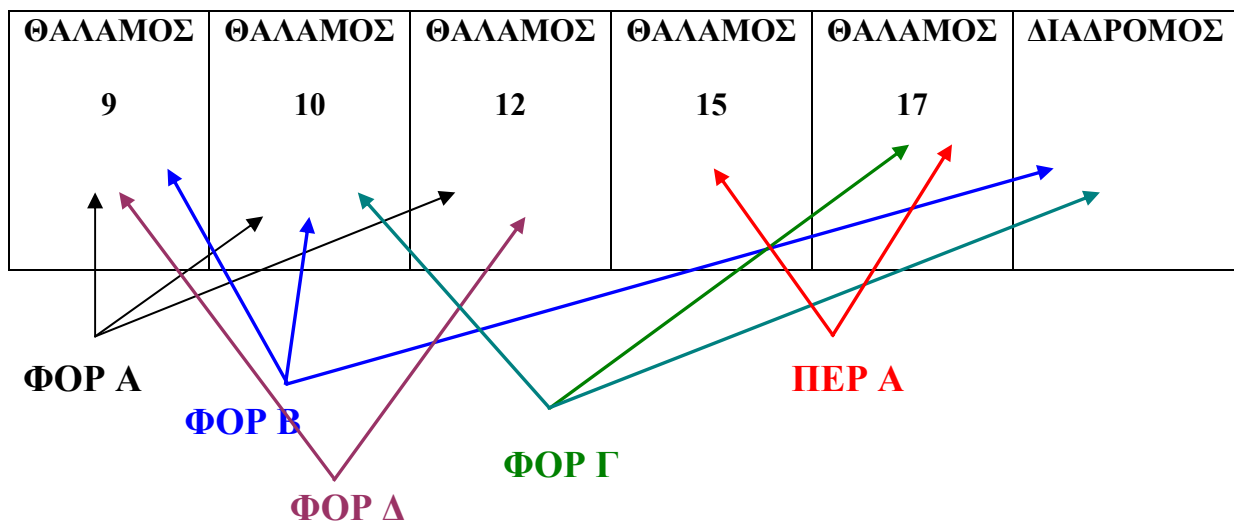
- Από την ασθενή ΠΕΡ Γ απομονώθηκαν 7 διαφορετικά στελέχη και από τον ασθενή ΠΕΡ Δ 2 διαφορετικά στελέχη. Οι διαφορές τους αφορούσαν το είδος, τους φαινοτυπικούς χαρακτήρες, την εικόνα αντοχής στα αντιβιοτικά και με την ανάλυση PFGE κατετάγησαν σε διαφορετικές ομάδες.
- Παρά την χρονική συρροή των πρώτων πέντε κρουσμάτων, η απουσία τοπικής συσχέτισης των ασθενών και κυρίως η έλλειψη συσχέτισης των στελεχών μεταξύ τους δεν επιτρέπουν το χαρακτηρισμό αυτών ως επιδημία.

## ΠΙΝΑΚΑΣ Α5.

ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ 1<sup>ΟΥ</sup> ΚΡΟΥΣΜΑΤΟΣ (ΠΕΡ Α) ΚΑΙ ΤΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΤΟΥΣ ΘΑΛΑΜΟΥΣ

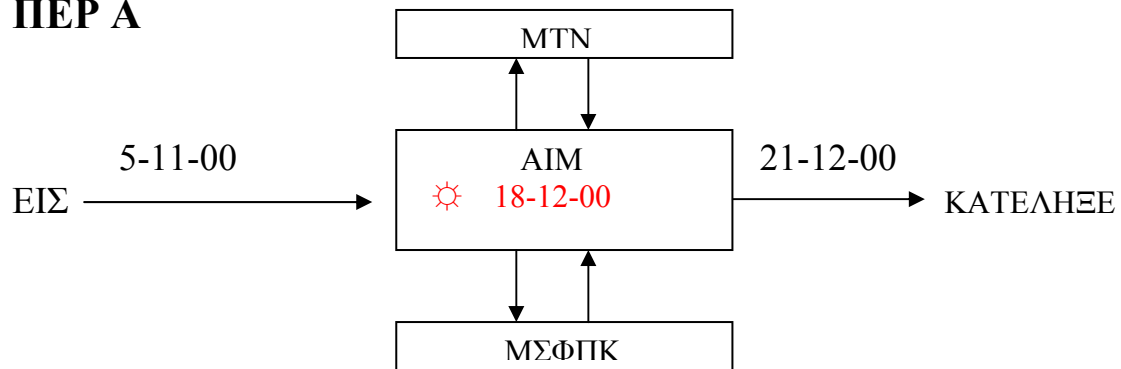
ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΑΛ. 9	ΘΑΛ. 10	ΘΑΛ. 12	ΘΑΛ. 15	ΘΑΛ. 17	ΔΙΑΔΡ.
ΠΕΡ Α				▲	▲	
ΦΟΡ Α	Α	Α	Α			
ΦΟΡ Β	Β	Β				Β
ΦΟΡ Γ		Γ			Γ	
ΦΟΡ Δ	Δ		Δ			

## ΣΧΗΜΑ Α1.

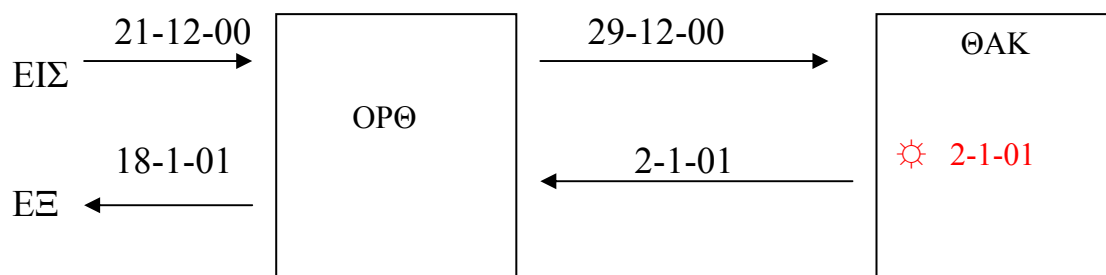
ΧΩΡΟΤΑΞΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ 1<sup>ΟΥ</sup> ΚΡΟΥΣΜΑΤΟΣ (ΠΕΡ Α) ΚΑΙ ΤΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ

## ΣΧΗΜΑ Α2. Συσχέτιση περιστατικών

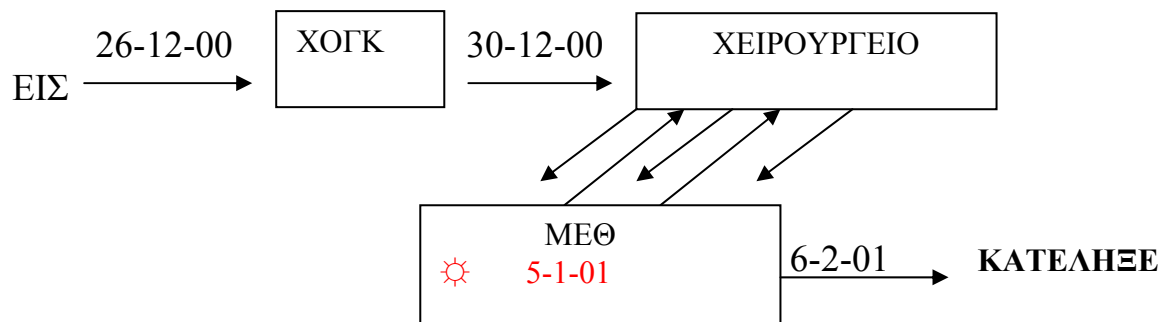
### ΠΕΡ Α



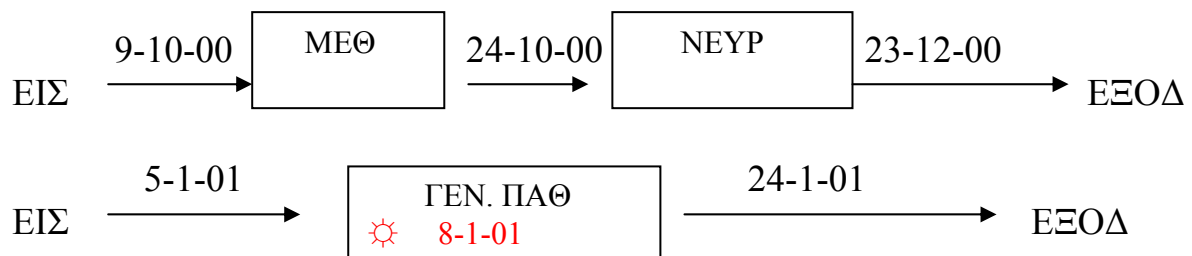
### ΠΕΡ Β



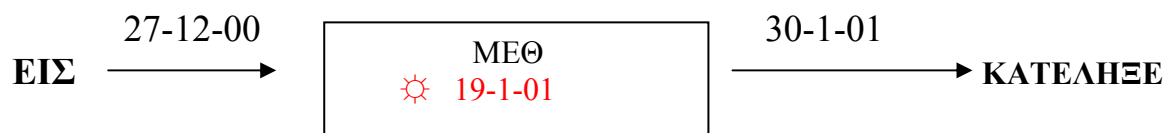
### ΠΕΡ Γ



### ΠΕΡ Δ



### ΠΕΡ Ε



## **B. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ ΓΙΑ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ ΑΣΘΕΝΩΝ ΤΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ ΑΠΟ VRE**

### **B. 1. Επιπολασμός του αποικισμού του γαστρεντερικού συστήματος των νοσηλευομένων ασθενών από VRE**

Την ημέρα διεξαγωγής της έρευνας (1<sup>η</sup> Φεβρουαρίου 2001) νοσηλεύονταν 98 συνολικά ασθενείς στα τμήματα υψηλού κινδύνου, όπου και εξετάστηκε το 100% των ασθενών. Στα υπόλοιπα τμήματα του νοσοκομείου νοσηλεύονταν συνολικά 465 ασθενείς. Με την μεθοδολογία που έχει ήδη περιγραφεί επελέγησαν 120 (25,8%) εξ' αυτών. Έτσι εξετάστηκαν συνολικά 218 ασθενείς. Από αυτούς 41(18,8%) ασθενείς βρέθηκαν αποικισμένοι και απομονώθηκαν 42 στελέχη εντεροκόκκου με αντοχή στην βανκομυκίνη (ένας ασθενής έφερε δύο διαφορετικά στελέχη VRE).

Ο αριθμός των νοσηλευομένων σε κάθε κλινική, ο αριθμός των εξετασθέντων εξ' αυτών καθώς και ο αριθμός των αποικισμένων, με κατανομή κατά φαινότυπο αντοχής παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα B1.

Σε όλες τις μονάδες υψηλού κινδύνου (ΜΕΘ, ΜΕΠΚ, ΜΤΝ, ΜΣΦΠΚ, ΜΟΝΑΔΑ ΝΕΟΓΝΩΝ) εντοπίστηκαν αποικισμένοι ασθενείς (ΠΙΝΑΚΑΣ Β2). Συνολικά βρέθηκαν 25 αποικισμένοι ασθενείς από τους 98 νοσηλευόμενους (συχνότητα επιπολασμού 25,5%). Η υψηλότερη συχνότητα προσδιορίστηκε στην μονάδα εντατικής θεραπείας όπου οι 2 από τους 4 νοσηλευόμενους βρέθηκαν αποικισμένοι. Υψηλή συχνότητα επιπολασμού βρέθηκε στην μονάδα τεχνητού νεφρού, όπου οι 21/72(29,2%) αιμοκαθαιρόμενοι ήταν φορείς VRE.

Στα υπόλοιπα τμήματα του νοσοκομείου εντοπίστηκαν 16 (13,3%) φορείς από τους 120 νοσηλευόμενους που ελέγχθηκαν. Όταν οι συχνότητες επιπολασμού προσδιορίστηκαν συνολικά και κατανεμήθηκαν σε παθολογικές, χειρουργικές και παιδιατρικές κλινικές (ΠΙΝΑΚΑΣ Β3), η υψηλότερη τιμή επιπολασμού προσδιορίστηκε στις παθολογικές κλινικές (15,9%), χωρίς όμως να υπάρχει διαφορά στατιστικά σημαντική μεταξύ παθολογικών, χειρουργικών και παιδιατρικών κλινικών.

Συσχετίζοντας την κατανομή των φορέων VRE στα τμήματα του νοσοκομείου, με την εντόπιση των περιστατικών λοίμωξης από VRE που μέχρι τότε είχαν διαγνωστεί, παρατηρούμε ότι στα 3 από τα 4 τμήματα (ΜΕΘ, νεφρολογική και ορθοπεδική κλινική), όπου είχαν σημειωθεί περιστατικά λοίμωξης, βρέθηκαν και φορείς. Στην γενική παθολογική κλινική, όπου επίσης είχε εντοπισθεί περιστατικό λοίμωξης, δεν βρέθηκαν φορείς. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί, ότι ο ασθενής που διαγνώστηκε με λοίμωξη VRE στην κλινική αυτή είχε προηγουμένως νοσηλευθεί σε άλλα δύο τμήματα του νοσοκομείου (ΜΕΘ και Νευρολογική κλινική).

Από την μελέτη της κατανομής των φαινοτύπων βρέθηκε ότι στελέχη με φαινότυπο VanA εντοπίστηκαν μόνο στην μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) και στην μονάδα τεχνητού νεφρού (MTN). Στελέχη με φαινότυπο VanB παρουσιάζουν ευρύτερη διασπορά. Εντοπίστηκαν από ένα σε ΜΕΘ, MTN και μονάδα εντατικής περίθαλψης καρδιοπαθών (ΜΕΠΚ), καθώς και 2 στην καρδιολογική, 1 στην αιματολογική και 1 στην ορθοπεδική κλινική. Τέλος στελέχη με VanC φαινότυπο εντοπίστηκαν στις περισσότερες από τις κλινικές χωρίς να εμφανίζονται σημαντικές διακυμάνσεις στην συχνότητα μεταξύ των κλινικών.

Όταν μελετήθηκε ο επιπολασμός για κάθε φαινότυπο ξεχωριστά βρέθηκε ότι ο φαινότυπος VanA εντοπίστηκε σε 4/218 ασθενείς (επιπολασμός: 1,8%), ο φαινότυπος VanB σε 7/218 ασθενείς (επιπολασμός: 3,2%), ο φαινότυπος VanC1 σε 24/218 (επιπολασμός: 11%) και ο φαινότυπος VanC2/C3 σε 6/218 (επιπολασμός: 2,8%). Αν εξαιρεθούν οι φαινότυποι VanC1 και VanC2/C3 που αποτελούν φυσική συστασιακή μη επαγώγιμη αντοχή και εμφανίζουν διαφορετική επιδημιολογική σημασία, και υπολογισθούν μόνο τα στελέχη με VanA και VanB φαινότυπο, που αποτελούν επίκτητη επαγώγιμη και μεταφερόμενη αντοχή με ιδιαίτερη επιδημιολογική βαρύτητα, τότε ο επιπολασμός είναι 11/218 ασθενείς (5%).

## **B. 2. Ταυτοποίηση στελεχών**

Με την χρήση των συμβατικών μεθόδων ταυτοποίησης όλα τα απομονωθέντα στελέχη πλην δύο ταυτοποιήθηκαν με επιτυχία σε επίπεδο είδους και η ταυτοποίηση αυτή επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα που έδωσε ο έλεγχος με την αντίδραση multiplex PCR. Δύο στελέχη μολονότι φαινοτυπικά έμοιαζαν με *E.*

*gallinarum*, ήταν ακίνητα, δεν παρήγαγαν χρωστική και ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά έδειξε αντοχή μετρίου επιπέδου στην βανκομυκίνη (MIC, 6μg/ml) και ευαισθησία στην τεϊκοπλανίνη. Αυτά τα δύο στελέχη στην αντίδραση PCR έδωσαν προϊόντα που αντιστοιχούσαν σε παρουσία του γονιδίου *van-C1* και κατά η συνέπεια η τυποποίησή τους ήταν *E. gallinarum*.

Η κατανομή σε είδη των 42 απομονωθέντων στελεχών έχει ως ακολούθως : 11(27%) *E. faecium*, 1(2%) *E. faecalis*, 24 (57%) *E. gallinarum* και 6 (14%) *E. casseliflavus/flavescens*.

### **B. 3. Ευαισθησία στα αντιβιοτικά**

Τα αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας στα αντιβιοτικά με την μέθοδο διάχυσης του αντιβιοτικού σε δίσκους, προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) με την μέθοδο E-test ήταν απόλυτα συμβατά με την μέθοδο αναφοράς προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης με την μέθοδο των αραιώσεων σε άγαρ, μολονότι οι τιμές MIC που προσδιορίζονται με την μέθοδο E-test τείνουν να είναι ελαφρώς χαμηλότερες από αυτές που προσδιορίζονται με την μέθοδο αναφοράς. Αυτό όμως δεν επηρέασε την τελική αξιολόγηση με βάση τα κριτικά όρια όπως έχουν καθορισθεί από το NCCLS (237).

Τα αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας για τα στελέχη που έχουν φαινότυπο αντοχής Van-A η Van-B φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα Β5.

Όλα τα στελέχη *E. gallinarum* και *E. casseliflavus/flavescens*, με φαινότυπο αντοχής VanC1 και VanC2/C3 αντίστοιχα, βρέθηκαν ευαίσθητα σε αμπικιλίνη, πενικιλίνη και ιμιπενέμη, παρουσίαζαν δε φυσική αντοχή χαμηλού επιπέδου σε γενταμικίνη και στρεπτομυκίνη πλην ενός στελέχους *E. gallinarum* που παρουσίαζε αντοχή υψηλού επιπέδου στην στρεπτομυκίνη.

### **B. 4. Ανάλυση με την μέθοδο multiplex PCR**

Η μέθοδος περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα ΣΤ.

Περιληπτικά αναφέρεται στην τρέχουσα ενότητα ότι τα 7 ζεύγη των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν, ειδικά για τους γόνους *rrs*, *vanC2/C3*, *ddl<sub>E. faecium</sub>*, *vanC1*, *ddl<sub>E. faecalis</sub>*, *vanB* και *VanA* έδωσαν τα αναμενόμενα προϊόντα μεγέθους 320, 484, 658,

822, 941, 1032, και 1727bp αντίστοιχα. Τρεις ξεχωριστές ζώνες έδωσαν τα στελέχη *E. faecium* και *E. faecalis*, μία που αντιστοιχούσε στην παρουσία του γονιδίου *rrs*, μία που αντιστοιχούσε στο είδος (*ddl<sub>E. faecium</sub>*, *ddl<sub>E. faecalis</sub>*) και μία που αντιστοιχούσε στην παρουσία του γονιδίου αντοχής (*vanA*, *vanB*). Τα στελέχη *E. gallinarum* και *E. casseliflavus/flavescens* έδωσαν δύο ζώνες, μία για τον γόνο *rrs* και μία χαρακτηριστική του είδους που είναι ταυτόχρονα και χαρακτηριστική του τύπου αντοχής (*vanC1* και *vanC2/C3* αντίστοιχα).

Τα δύο στελέχη για τα οποία η ταυτοποίηση με συμβατικές μεθόδους ήταν ασαφής έδωσαν προϊόντα αντιστοιχούντα σε *E. gallinarum* (*rrs*, *vanC1*).

## **B. 5. Παράγοντες κινδύνου για αποικισμό από VRE**

Το φύλο, η ηλικία και η προηγηθείσα διάρκεια νοσηλείας δεν βρέθηκαν να έχουν συσχέτιση στατιστικά σημαντική με τον αποικισμό από VRE. (ΠΙΝΑΚΑΣ Β6). Η χορήγηση αντιβιοτικών γενικά δεν παρουσίασε και αυτή συσχέτιση με αποικισμό. Όμως όταν η κάθε ομάδα αντιβιοτικών μελετήθηκε ξεχωριστά βρέθηκε ότι η χορήγηση γλυκοπεπτιδίων παρουσίαζε συσχέτιση στατιστικά σημαντική ( $p$  value =0.041).

Η παρουσία κεντρικού φλεβοκαθετήρα και η υποβολή σε τεχνητό νεφρό αναδείχθηκαν επίσης ως παράγοντες κινδύνου ( $p$  value=0,003 και 0,004 αντίστοιχα). Όταν όμως οι παράγοντες υποβλήθηκαν σε παλίνδρομη λογιστική ανάλυση μόνο η χορήγηση γλυκοπεπτιδίων βρέθηκε να σχετίζεται σημαντικά και ανεξάρτητα με τον αποικισμό (odds ratio 3,2  $p=0.0374$  C95%=0.07-9,56).

Τα δεδομένα του φαρμακείου έδειξαν ότι η χρήση της βανκομυκίνης στην ΜΕΘ αυξήθηκε από 137 Defined Daily Doses (DDD)/ 1000 patient-day το 1998 και 143 DDT/1000 patient-days το 1999 σε 271 DDD/ 1000 patient-day το 2000.



## B. 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η μελέτη που διεξήχθη στο νοσοκομείο στις 1 Φεβρουαρίου 2001 ήταν μία σημειακή μελέτη επιπολασμού του ανθεκτικού στην βανκομυκίνη εντεροκόκκου (VRE) στο γαστρεντερικό σύστημα των νοσηλευομένων εκείνη την ημέρα. Παρόλο που δεν εξετάστηκε το σύνολο των νοσηλευομένων το μέγεθος του δείγματος και η τυχαία δειγματοληψία καθιστούν το δείγμα αντιπροσωπευτικό του συνόλου.
- Ασθενείς αποικισμένοι από VRE ανιχνεύθηκαν στα περισσότερα τμήματα του νοσοκομείου. Ο επιπολασμός του VRE προσδιορίστηκε στο 18,8% των ασθενών.
- Αποικισμένοι από VRE ασθενείς βρέθηκαν σε 3 από τα 4 τμήματα του νοσοκομείου, όπου πρόσφατα είχαν εντοπισθεί περιστατικά λοίμωξης από VRE.
- Εξετάζοντας όμως τα αποτελέσματα κατά τύπο αντοχής διαπιστώνουμε ότι στελέχη εντεροκόκκου με αντοχή τύπου VanA εντοπίστηκαν μόνο στην ΜΕΘ και στην ΜΤΝ.
- Στελέχη με αντοχή τύπου VanB εντοπίστηκαν σε περισσότερα τμήματα του νοσοκομείου παρουσιάζοντας έτσι ευρύτερη διασπορά αλλά και σε μεγαλύτερο αριθμό φορέων.
- Τέλος στελέχη με φαινότυπο VanC εντοπίστηκαν στα περισσότερα τμήματα, σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και δείχνοντας μια ευρύτερη αλλά πιο ομοιογενή διασπορά.
- Έτσι ο επί μέρους επιπολασμός για τους 3 φαινότυπους ήταν 1,8% για VanA, 3,2% για VanB και 13,8% για τον VanC. Ο επιπολασμός για τους δύο επαγωγίμους τύπους αντοχής (VanA/VanB) αθροιστικά ήταν 5%.
- Η χορήγηση γλυκοπεπτιδίων, η παρουσία κεντρικού φλεβικού καθετήρα και η υποβολή σε αιμοκάθαρση προσδιορίστηκαν ως παράγοντες κινδύνου για αποικισμό από VRE.

**ΠΙΝΑΚΑΣ Β1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ****ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΟΠΟΥ ΕΛΕΓΧΘΗΚΕ ΠΟΣΟΣΤΟ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ**

ΚΛΙΝΙΚΗ	ΣΥΝ. ΑΣΘΕΝ.	ΕΞΕΤΑΣΘ ΕΝΤΕΣ	VANA	VANB	VANC	ΣΥΝΟΛΟ
ΨΥΧΙΑΤΡ	12	3 (25%)	0	0	0	0
Π. ΟΓΚ.	51	10(20%)	0	0	2(20%)	2(20%)
Γ. Π.	23	7(30.4%)	0	1(14.3%)	0	1(14.3%)
Α. Π.	31	8(25.8%)	0	0	0	0
Κ/Κ	35	9(25.7%)	0	2(22.2%)	0	2(22.2%)
ΝΕΥΡΟ	25	7(28)	0	0	1(14.3%)	1(14.3%)
ΠΝΕΥΝΟ	20	7(35%)	0	0	2(28.6%)	2(28.6%)
Β.Π.	48	12(25%)	0	0	2(16.7%)	2(16.7%)
Γ/Χ	35	7(20%)	0	0	2((28.6%)	2(28.6%)
Χ.ΟΓΚ	36	9(25%)	0	0	1(11.1%)	1(11.1%)
ΟΡΘ. Α	16	3(18.7%)	0	0	0	0
ΟΡΘ. Β	23	6(26%)	0	1(16.7%)	1(16.7%)	2(33.3%)
Μ/Γ	23	7(30.4%)	0	0	0	0
ΩΡΛ	19	6(31.6%)	0	0	0	0
ΟΦΘ	6	2(33.3%)	0	0	0	0
ΟΥΡΟ	28	8(28.6%)	0	0	0	0
ΠΑΙΔ.	12	3(25%)	0	0	1(33.3%)	1(33.3%)
ΠΔΧ	7	2(28.6%)	0	0	0	0
ΠΑΙΔ. ΑΙΜ	15	4(26.7%)	0	0	0	0
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>465</b>	<b>120(25.8%)</b>	<b>0</b>	<b>4(3.3%)</b>	<b>12(10%)</b>	<b>16(13.3%)</b>

**ΠΙΝΑΚΑΣ Β2. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΟΠΟΥ ΕΛΕΓΧΘΗΚΕ ΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ**

ΚΛΙΝΙΚΗ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	VANA	VANB	VANC	ΣΥΝΟΛΟ
ΜΕΘ	4	1(25%)	1(25%)	0	2(50%)
ΜΕΠΚ	7	0	1(14.3%)	0	1(14.3%)
ΝΕΟΓΝΑ	15	0	0	1(6.6%)	1(6.6%)
MTN	72	3(4.2%)	1(1.4%)	17(23.6%)	21(29.2%)
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>98</b>	<b>4(4.1%)</b>	<b>3(3.1%)</b>	<b>18(18.3%)</b>	<b>25(25.5%)</b>

**ΠΙΝΑΚΑΣ Β3. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΚΑΤΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ, ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΕΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ**

ΚΛΙΝΙΚΕΣ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ (ΕΞΕΤ./ΣΥΝΟΛΟ)	VanA	VanB	VanC	ΣΥΝΟΛΟ
ΠΑΘΟΛ.	63/245	0	3 (4,8%)	7 (11,1%)	10 (15,9%)
ΧΕΙΡΟΥΡ.	48/186	0	1 (2,1%)	4 (8,3%)	5 (10,4%)
ΠΑΙΔΙΑΤΡ	9/34	0	0	1 (11,1%)	1 (11,1%)
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>120/465</b>	<b>0</b>	<b>4 (3,3)</b>	<b>12 (10%)</b>	<b>16 (13,3%)</b>

**ΠΙΝΑΚΑΣ Β4. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΤΑ ΕΙΔΟΣ ΚΑΙ ΤΥΠΟ ΑΝΤΟΧΗΣ**

ΕΙΔΟΣ	ΤΥΠΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
<i>E. faecium</i>	VanA	4
	VanB	7
<i>E. faecalis</i>	VanB	1
<i>E. gallinarum</i>	VanC1	24
<i>E. casseliflavus/flavescens</i>	VanC2/C3	6
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>		<b>42</b>

**ΔΙΠΛΟΣ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΣ**

***E. faecium* VanB + *E. faecalis* VanB**

**ΠΙΝΑΚΑΣ Β5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ Van-A Η Van-B  
ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΑΝΤΟΧΗΣ**

Κωδικός στελέχ.	Τμήμα	Είδος	MIC (μg/ml)												Van genotype
			AMP	PEN	STR	GM	TE	RA	C	E	NOR	IMP	VA	TEC	
18	ΚΑΡΔ	<i>E. faecium</i>	64	128	32	<4	32	8	32	>2048	256	256	64	0.5	<i>vanB</i>
19	ΚΑΡΔ	<i>E. faecium</i>	64	64	2048	16	32	8	32	>2048	32	256	128	0.5	<i>vanB</i>
21	ΜΕΘ	<i>E. faecium</i>	64	256	>4096	1024	256	64	64	>2048	2	256	512	128	<i>vanA</i>
22α	ΜΕΠΚ	<i>E. faecium</i>	64	128	32	4	32	8	32	>2048	64	256	128	0.5	<i>vanB</i>
22β	ΜΕΠΚ	<i>E. faecalis</i>	1	8	>4096	>2048	32	0.5	16	>2048	256	16	64	0.5	<i>vanB</i>
23	ΜΕΘ	<i>E. faecium</i>	64	128	32	8	32	8	32	>2048	128	1024	128	1	<i>vanB</i>
32	ΟΡΘ	<i>E. faecium</i>	128	1024	>4096	16	256	8	4	>2048	8	256	256	0.5	<i>vanB</i>
34	ΑΙΜ	<i>E. faecium</i>	128	>1024	4096	512	0.5	1024	4	>2048	1024	512	512	0.5	<i>vanB</i>
38	ΜΤΝ	<i>E. faecium</i>	64	512	2048	2048	0.5	1024	2	>2048	512	1024	512	0.25	<i>vanB</i>
39	ΜΤΝ	<i>E. faecium</i>	128	512	8	64	128	0.03	8	>2048	0.5	32	1024	128	<i>vanA</i>
42	ΜΤΝ	<i>E. faecium</i>	0.25	4	64	8	128	<0.03	64	>2048	2	4	1024	128	<i>vanA</i>
47	ΜΤΝ	<i>E. faecium</i>	128	>1024	>4096	1024	256	16	32	>2048	1	128	512	128	<i>vanA</i>

ΣΗΜΕΙΩΣΗ ΚΑΡΔ: καρδιολογική, ΜΕΘ: μονάδα εντατικής θεραπείας, ΜΕΠΚ: μονάδα εντατικής περίθαλψης καρδιοπαθών. ΟΡΘ: ορθοπεδική, Αιμ: αιματολογική, ΜΤΝ: μονάδα τεχνητού νεφρού.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ 2 AMP: ampicillin, PEN: penicillin, STR: streptomycin, GM: gentamicin, TE: tetracycline, RA: rifampicin, C: Chloramphenicol, E: erythromycin, NOR: norfloxacin, IMP: imipenem, VA: vancomycin, και TEC: teicoplanin

**ΠΙΝΑΚΑΣ Β6. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟ ΑΣΘΕΝΩΝ**

**ΑΠΟ VRE**

<b>ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ</b>	<b>No (%) VRE ΦΟΡΕΩΝ (n = 41)</b>	<b>No (%) ΑΣΘΕΝΩΝ ΑΡΝΗΤΙΚΩΝ (n = 177)</b>	<b>p-value</b>
ΑΝΔΡΕΣ	20 (48.8)	104 (58.8)	0.32
ΜΕΣΗ ΗΛΙΚΙΑ	57.1 ± 17.74	53.4 ± 23.64	0.34
ΜΕΣΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΝΟΣΗΛΕΙΑΣ	7.6 ± 15.22	10 ± 20.07	0.46
ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ	14 (34.1)	76 (42.9)	0.393
ΠΕΝΙΚΙΛΛΙΝΕΣ	6 (14.6)	33 (18.1)	0.767
ΚΕΦΑΛΟΣΠΟΡΙΝΕΣ	8 (19.5)	43 (24.3)	0.655
ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ	3 (7.3)	16 (9)	0.964
ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ	3 (7.3)	12 (6.8)	0.826
ΑΝΤΙ-ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ	4 (9.8)	19 (9.6)	0.79
<b>ΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΑ</b>	<b>6 (14.6)</b>	<b>9 (5.1)</b>	<b>0.041</b>
ΠΡΟΣΦΑΤΗ ΧΕΙΡ. ΕΠΕΜΒΑΣΗ	6 (14.6)	24 (13.6)	0.943
<b>ΚΕΝΤΡΙΚΟΣ ΦΛΕΒΟΚΑΘΗΤΗΡ</b>	<b>28 (68.3)</b>	<b>73 (41.2)</b>	<b>0.003</b>
ΤΡΑΧΕΙΟΤΟΜΗ	2 (4.9)	4 (2.3)	0.69
ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΗΡΑΣ	4 (9.6)	9 (5.1)	0.44
ΟΥΡΟΚΑΘΗΤΗΡΑΣ	7 (17.1)	27 (15.3)	0.96
<b>ΝΕΦΡΙΚΗ ΚΑΘΑΡΣΗ</b>	<b>22 (53.7)</b>	<b>51 (28.8)</b>	<b>0.004</b>
ΓΑΣΤΡΟΣΚΟΠΗΣΗ	2 (4.9)	2 (1.1)	0.33
ΚΟΛΟΝΟΣΚΟΠΗΣΗ	1 (2.4)	4 (2.3)	0.61

**Γ. ΠΟΛΥΚΕΝΤΡΙΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ  
ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ ΓΙΑ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟ ΤΟΥ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ  
ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΑΠΟ VRE  
ΣΕ 13 ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑ**

**Γ. 1. Γενική κατανομή**

Από το σύνολο των 1246 δειγμάτων που εξετάστηκαν 255 βρέθηκαν θετικά για VRE και εξ' αυτών απομονώθηκαν 266 στελέχη (από 9 ασθενείς απομονώθηκαν 2 διαφορετικά στελέχη και από έναν ασθενή 3 διαφορετικά στελέχη VRE). Έτσι η συχνότητα επιπολασμού από VRE στο σύνολο των ασθενών προσδιορίστηκε στο 20,5%. Τα αναλυτικά αποτελέσματα επιπολασμού κατά νοσοκομείο και τομέα εμφανίζονται στον πίνακα Γ2. Επίσης φαίνονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των πανεπιστημιακών και των γενικών νοσοκομείων κατά τομέα ξεχωριστά.

Η υψηλότερη συχνότητα επιπολασμού σημειώνεται στις μονάδες τεχνητού νεφρού (28,9%), ακολουθεί ο χειρουργικός τομέας (22,6%), έπονται ο παθολογικός τομέας (19%) και οι μονάδες εντατικής νοσηλείας των ενηλίκων (14,9%), ενώ δεν ανιχνεύθηκαν VRE σε καμία μονάδα νοσηλείας νεογνών.

Η συχνότητα επιπολασμού στο σύνολο των πανεπιστημιακών νοσοκομείων (21,1%) δεν διαφέρει ουσιαστικά από την αυτήν των γενικών νοσοκομείων (19,7%). Η διαφορά των τιμών επιπολασμού δεν κρίνεται στατιστικά σημαντική ( $\chi^2$ -test,  $p=0,531$ ). Όμως οι τιμές επιπολασμού κατά τομέα διαφοροποιούνται μεταξύ πανεπιστημιακών και γενικών νοσοκομείων. Στα πανεπιστημιακά νοσοκομεία η υψηλότερη τιμή σημειώνεται στον χειρουργικό τομέα (34,2%), ενώ στους υπόλοιπους τομείς, με εξαίρεση την μονάδα νεογνών, οι τιμές επιπολασμού δεν διαφοροποιούνται ουσιαστικά. Στα γενικά νοσοκομεία η τιμή επιπολασμού είναι σαφώς υψηλότερη στις μονάδες τεχνητού νεφρού (35,3%), και ακολουθούν σε απόσταση ο παθολογικός τομέας (17,3%), ο χειρουργικός τομέας (13,4%), και οι μονάδες εντατικής νοσηλείας ενηλίκων (14,9%). Η

υπεροχή των πανεπιστημιακών νοσοκομείων στην συχνότητα επιπολασμού στις μονάδες εντατικής νοσηλείας των ενηλίκων και στον χειρουργικό τομέα ανέρχεται σε επίπεδα στατιστικώς σημαντικά ( $\chi^2$ -test,  $p=0,015$  και  $p<0,001$ , αντίστοιχα), καθώς επίσης και η υπεροχή των γενικών νοσοκομείων στις μονάδες τεχνητού νεφρού ( $\chi^2$ -test,  $p=0,008$ ).

Μεγάλο είναι επίσης και το εύρος τιμών που σημειώνεται μεταξύ των νοσοκομείων (0-51,7%). Η τιμή επιπολασμού 29,9% που σημειώθηκε στο ΗΡΑ-1 είναι μία από τις υψηλότερες και είναι σαφώς υψηλότερη από εκείνη που σημειώθηκε στην πρώτη μελέτη επιπολασμού (18,8%).

## **Γ. 2. Ειδική κατανομή κατά είδος και τύπο αντοχής των απομονωθέντων στελεχών.**

Από τους 255 φορείς απομονώθηκαν 266 στελέχη (9 ασθενείς έφεραν 2 διαφορετικά στελέχη έκαστος, ενώ 1 ασθενής έφερε 3 διαφορετικά στελέχη).

Η κατανομή των στελεχών κατά είδος σε όλα τα νοσοκομεία φαίνεται στον πίνακα Γ3. Η κατανομή των στελεχών σε είδη ποικίλλει μεταξύ των συμμετεχόντων νοσοκομείων. Στα συγκεντρωτικά αποτελέσματα το επικρατέστερο είδος είναι *E. gallinarum* με αναλογία 57,5% και ακολουθεί *E. faecium* με 29,7%. Στα υπόλοιπα είδη η κατανομή διασπείρεται σε μικρές αναλογίες. Στα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των πανεπιστημιακών και γενικών νοσοκομείων ξεχωριστά, τα είδη *E. gallinarum* και *E. faecium* παραμένουν στην πρώτη και δεύτερη θέση της κατανομής αντίστοιχα και στα δύο σύνολα, όμως η μεταξύ τους απόσταση είναι κατά πολύ μεγαλύτερη στα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των γενικών νοσοκομείων. Έτσι η αναλογία του *E. faecium* στα πανεπιστημιακά νοσοκομεία (38,3%) είναι υπερδιπλάσια αυτής των γενικών (18,8).

**ΠΙΝΑΚΑΣ Γ2. ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ ΤΟΥ VRE ΚΑΤΑ  
ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΚΑΙ ΤΟΜΕΑ.**

ΝΟΣ/ΜΕΙΑ	ΤΟΜΕΑΣ					ΣΥΝΟΛΟ
	ΜΟΝΑΔΕΣ	ΜΕΘ	ΜΕΘ	ΠΑΘΟΛΟ	ΧΕΙΡΟΥΡΓΙ	
	ΤΕΧΝΗΤΟΥ ΝΕΦΡΟΥ	Ν	Ν	ΓΙΚΟΣ	ΚΟΣ	
<b>ΘΕΣ-1</b>	-	10/32 (31,3)	0/1 (0)	15/58 (25,9)	14/37 (37,8)	39/128 (30,5)
<b>ΗΡΑ-1</b>	22/61 (36,1)	4/22 (18,2)	0/16 (0)	20/67 (29,9)	15/38 (39,5)	61/204 (29,9)
<b>ΠΤ-1</b>	2/27 (7,4)	1/9 (11,1)	0/15 (0)	21/53 (39,6)	10/22 (45,5)	34/126 (27)
<b>ΑΛ-1</b>	1/33 (3)	1/6 (16,7)	0/8 (0)	3/37 (8,1)	1/16 (6,3)	6/100 (6)
<b>ΙΩ-1</b>	-	1/12 (8,3)	0/14 (0)	2/89 (2,2)	0/4 (0)	3/119 (2,5)
<b>ΗΡΑ-2</b>	49/74 (66,2)	1/3 (33,3)	0/13 (0)	21/40 (52,5)	6/19 (31,6)	77/149 (51,7)
<b>ΧΛ-1</b>	4/13 (30,8)	-	-	6/10 (60)	2/6 (33,3)	12/29 (41,4)
<b>ΧΑ-1</b>	-	0/2 (0)	-	3/30 (10)	4/22 (18,2)	7/54 (13)
<b>ΚΟ-1</b>	-	0/2 (0)	-	1/10 (10)	0/7 (0)	1/19 (5,3)
<b>ΞΑ-1</b>	0/39 (0)	-	-	0/5 (0)	5/24 (20,8)	5/68 (7,4)
<b>ΚΑ-1</b>	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)	2/26 (7,7)	0/13 (0)	2/45 (4,4)
<b>ΘΕΣ-2</b>	2/28 (7,1)	2/43 (4,7)	-	1/64 (1,6)	3/51 (5,9)	8/186 (4,3)
<b>ΔΙ-1</b>	-	0/1 (0)	-	0/11 (0)	0/7 (0)	0/19 (0)
<b>ΠΑΝ/ΚΑ</b>				61/304	40/117	143/677
<b>ΝΟΣ/ΜΕΙΑ</b>	25/121(20,7)	17/81 (21)	0/54 (0)	(20,1)	(34,2)	(21,1)
<b>ΓΕΝΙΚΑ</b>				34/196	20/149	112/569
<b>ΝΟΣ/ΜΕΙΑ</b>	55/156 (35,3)	3/53 (5,7)	0/15 (0)	(17,3)	(13,4)	(19,7)
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>		20/134			60/266	255/1246
	80/277 (28,9)	(14,9)	0/69 (0)	95/500 (19)	(22,6)	(20,5)



**ΠΙΝΑΚΑΣ Γ3.**  
**ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE ΚΑΤΑ**  
**ΕΙΔΟΣ ΣΕ ΟΛΑ ΤΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑ**

ΝΟΣΟ-ΚΟΜΕΙΟ	E. faecium	E. faecalis	E. avium	E. hirae	E. gall/um	E. cass/vus	ΣΥΝΟΛΟ
ΘΕΣ-1	3 (7,5)				35 (87,5)	2 (5)	40 (100)
ΗΡΑ-1	24 (38)	4 (6,3)	4 (6,3)	1 (1,6)	28 (44,4)	2 (3,2)	63 (100)
ΠΤ-1	28 (75,7)	1 (2,7)		1 (2,7)	5 (13,5)	2 (5,4)	37 (100)
ΑΛ-1		1 (16,7)			5 (83,3)		6 (100)
ΙΩ-1	2 (66,7)					1 (33,3)	3 (100)
ΗΡΑ-2	14 (17)	3 (3,7)			59 (72)	6 (7,3)	82 (100)
ΧΛ-1					10	2	12 (100)
ΧΑ-1					7 (100)		7 (100)
ΚΟ-1		1 (100)					1 (100)
ΞΑ-1	2 (40)				3 (60)		5 (100)
ΚΑ-1	2 (100)						2 (100)
ΘΕΣ-2	4 (50)	2 (25)			1 (12,5)	1 (12,5)	8 (100)
ΔΙ-1							0
ΠΑΝ/ΚΑ	57 (38,3)	6 (4)	4 (2,7)	2 (1,3)	73 (49)	7 (4,7)	149 (100)
ΓΕΝΙΚΑ	22 (18,8)	6 (5,1)			80 (68,4)	9 (7,7)	117 (100)
ΣΥΝΟΛΟ	79 (29,7)	12 (4,5)	4 (1,5)	2 (0,8)	153 (57,5)	16 (6)	266 (100)

**ΠΙΝΑΚΑΣ Γ4.**  
**ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE ΚΑΤΑ**  
**ΤΥΠΟ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΕ ΟΛΑ ΤΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑ**

ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ	Van-A N (%)	Van-B N (%)	Van-C1 N (%)	Van-C2/C3 N (%)	ΣΥΝΟΛΟ
ΘΕΣ-1	3 (7,5)	0	35 (87,5)	2 (5)	40
ΗΡΑ-1	21 (33,3)	12 (19)	28 (44,4)	2 (3,2)	63
ΠΤ-1	32 (86,5)	0	4 (10,8)	1 (2,7)	37
ΑΛ-1	1 (16,7)	0	5 (83,3)	0	6
ΙΩ-1	2 (66,7)	0	0	1 (33,3)	3
ΗΡΑ-2	15 (18,3)	2 (2,4)	59 (72)	6 (7,3)	82
ΧΛ-1	0	0	10 (83,3)	2 (16,7)	12
ΧΑ-1	0	0	7 (100)	0	7
ΚΟ-1	1(100)	0	0	0	1
ΞΑ-1	1 (20)	1 (20)	3 (60)	0	5
ΚΑ-1	0	2 (100)	0	0	2
ΘΕΣ-2	6 (75)	0	1 (12,5)	1 (12,5)	8
ΔΙ-1	0	0	0	0	0
ΠΑΝ/ΚΑ	59 (39,6)	12 (8,1)	72 (48,3)	6 (4)	149
ΓΕΝΙΚΑ	23 (19,7)	5 (4,3)	80 (68,5)	9 (7,7)	117
ΣΥΝΟΛΟ	82 (30,8)	17 (6,4)	152 (57,1)	15 (5,6)	266

Η κατανομή των στελεχών κατά τύπο αντοχής εμφανίζεται στον Πίνακα Γ4. Και αυτή η κατανομή ποικίλλει μεταξύ των συμμετεχόντων νοσοκομείων. Οι τύποι VanA και VanC1 παρουσιάζουν την ευρύτερη διασπορά. Ο τύπος VanA εντοπίζεται και στα 5 πανεπιστημιακά νοσοκομεία και σε 4 από τα 8 γενικά, ενώ ο VanC1 σε 4 από τα 5 πανεπιστημιακά και σε 5 από τα 8 γενικά. Ο τύπος VanB εμφανίζεται σε 1 πανεπιστημιακό και 3 γενικά, ενώ ο VanC2/C3 σε 4 πανεπιστημιακά και σε 3 γενικά νοσοκομεία. Στα συγκεντρωτικά αποτελέσματα ο VanC1 αναδεικνύεται ο επικρατέστερος τύπος με αναλογία 57,1% και ο VanA ο δεύτερος με αναλογία 30,8%. Αυτή η σειρά συχνότητας διατηρείται και στα επί μέρους συγκεντρωτικά αποτελέσματα των πανεπιστημιακών και γενικών νοσοκομείων όμως η απόσταση μεταξύ τους μικραίνει στα πανεπιστημιακά νοσοκομεία και μεγαλώνει στα γενικά. Έτσι η αναλογία του VanA στα πανεπιστημιακά νοσοκομεία (39,6%) είναι διπλάσια της αντίστοιχης στα γενικά (19,7%).

### **Γ. 3. Επιπολασμός στελεχών με επίκτητο τύπο αντοχής (VanA, VanB)**

Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι η επιδημιολογική σημασία των στελεχών που διαθέτουν συστασιακή (φυσική) αντοχή είναι εντελώς διαφορετική από εκείνων που διαθέτουν επίκτητο και επαγωγίμο μηχανισμό αντοχής. Για τον λόγο αυτό τα στελέχη με επίκτητο τύπο αντοχής και οι ασθενείς που έφεραν αυτά τα στελέχη διαχωρίστηκαν και απετέλεσαν ξεχωριστή ομάδα μελέτης.

Όταν τα στελέχη με συστασιακή αντοχή στην βανκομυκίνη και επομένως ήσσονος επιδημιολογικής σημασίας, δηλαδή όσα είχαν μόνο αντοχή τύπου VanC1, ή VanC2/C3, εξαιρέθηκαν, τότε τα αποτελέσματα διαφοροποιήθηκαν ουσιαστικά.

Τα εναπομείναντα στελέχη που έφεραν αντοχή τύπου VanA, ή VanB ήταν 99 στον αριθμό και απομονώθηκαν από 93 ασθενείς ( έξι ασθενείς έφεραν από 2 διαφορετικά στελέχη έκαστος). Τα αποτελέσματα που αφορούν μόνο τα στελέχη με επίκτητο μηχανισμό αντοχής παρουσιάζονται στον πίνακα Γ5.

## ΠΙΝΑΚΑΣ Γ5.

**ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ ΤΟΥ VRE ΜΕ VanA / VanB ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ  
ΚΑΤΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΚΑΙ ΤΟΜΕΑ**

ΝΟΣ/ΜΕΙΑ	ΤΟΜΕΑΣ					ΣΥΝΟΛΟ
	ΜΤΝ	ΜΕΘ ΕΝΗΛΙΚΩΝ	ΜΕΘ ΝΕΟΓΝΩΝ	ΠΑΘΟΛΟ ΓΙΚΟΣ	ΧΕΙΡΟΥΡΓΙ ΚΟΣ	
<b>ΘΕΣ-1</b>	-	1/32 (3,1)	0/1 (0)	1/58 (1,7)	1/37 (2,7)	3/128 (2,3)
<b>ΗΡΑ-1</b>	10/61 (16,4)	2/22 (9,1)	0/16 (0)	11/67 (16,4)	8/38 (21,1)	31/204 (15,2)
<b>ΠΤ-1</b>	1/27 (3,7)	1/9 (11,1)	0/15 (0)	20/53 (37,7)	7/22 (31,8)	29/126 (23,0)
<b>ΑΛ-1</b>	0/33 (0)	0/6 (0)	0/8 (0)	0/37 (0)	1/16 (6,3)	1/100 (1)
<b>ΙΩ-1</b>	-	1/12 (8,3)	0/14 (0)	1/89 (1,1)	0/4 (0)	2/119 (1,7)
<b>ΗΡΑ-2</b>	4/74 (5,4)	1/3 (33,3)	0/13 (0)	10/40 (25)	1/19 (5,3)	16/149 (10,7)
<b>ΧΛ-1</b>	0/13 (0)	-	-	0/10 (0)	0/6 (0)	0/29 (0)
<b>ΧΑ-1</b>	-	0/2 (0)	-	0/30 (0)	0/22 (0)	0/54 (0)
<b>ΚΟ-1</b>	-	0/2 (0)	-	1/10 (10)	0/7 (0)	1/19 (5,3)
<b>ΞΑ-1</b>	0/39 (0)	-	-	0/5 (0)	2/24 (8,3)	2/68 (2,9)
<b>ΚΑ-1</b>	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)	2/26 (7,7)	0/13 (0)	2/45 (4,4)
<b>ΘΕΣ-2</b>	0/28 (0)	2/43 (4,7)	-	1/64 (1,6)	3/51 (5,9)	6/186 (3,2)
<b>ΔΙ-1</b>	-	0/1 (0)	-	0/11 (0)	0/7 (0)	0/19 (0)
<b>ΠΑΝ/ΚΑ ΝΟΣ/ΜΕΙΑ</b>	11/121 (9,1)	5/81 (6,2)	0/54 (0)	33/304 (10,9)	17/117 (14,5)	66/677 (9,7)
<b>ΓΕΝΙΚΑ ΝΟΣ/ΜΕΙΑ</b>	4/156 (2,6)	3/53 (5,7)	0/15 (0)	14/196 (7,1)	6/149 (4)	27/569 (4,7)
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>15/277 (5,4)</b>	<b>8/134 (6)</b>	<b>0/69 (0)</b>	<b>47/500 (9,4)</b>	<b>23/266 (8,6)</b>	<b>93/1246 (7,5)</b>

Η τιμή επιπολασμού στο σύνολο διαμορφώθηκε στο 7,5%. Σε δύο περιφερειακά νοσοκομεία δεν εντοπίστηκαν στελέχη με επίκτητο τύπο αντοχής. Η τιμή επιπολασμού για τα πανεπιστημιακά νοσοκομεία στο σύνολό τους (9,7%) είναι υψηλότερη από αυτήν των γενικών (4,7%) σε επίπεδο στατιστικά σημαντικό ( $\chi^2$ -test,  $p=0,001$ ). Μία άλλη διαφοροποίηση προκύπτει από το μέγεθος των νοσοκομείων. Σε κανένα από τα μικρά νοσοκομεία (δυναμικότητας < 200 κλινών) δεν ανιχνεύθηκαν στελέχη VanA/VanB. Σε ένα μάλιστα από αυτά δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου VRE. Στα μεσαίου μεγέθους νοσοκομεία (δυναμικότητας 200-500 κλινών), η τιμή επιπολασμού διακυμαίνεται από 1% έως 5,3%. Στα μεγάλα νοσοκομεία (δυναμικότητας >200 κλινών) οι τιμές επιπολασμού κυμαίνονται από 1% έως 23%. Οι τιμές επιπολασμού κατά τομέα διαφοροποιούνται επίσης. Στα συγκεντρωτικά αποτελέσματα ο παθολογικός τομέας αναδεικνύεται πρώτος σε συχνότητα επιπολασμού (9,4%), ακολουθούμενος από τον χειρουργικό (8,6%) και τις μονάδες νοσηλείας των ενηλίκων (6%). Σαφείς είναι και οι διαφορές μεταξύ πανεπιστημιακών και γενικών νοσοκομείων σε επίπεδο τομέα. Η διαφορά στην συχνότητα επιπολασμού στις μονάδες νεφρού και στον χειρουργικό τομέα ανέρχεται σε επίπεδο στατιστικά σημαντικό ( $\chi^2$ -test,  $p=0,002$  και  $p=0,017$ , αντίστοιχα), ενώ στις μονάδες εντατικής νοσηλείας ενηλίκων και στον παθολογικό τομέα δεν παρατηρείται διαφορά στατιστικώς σημαντική ( $\chi^2$ -test,  $p=0,903$  και  $p=0,165$ , αντίστοιχα).

Η κατανομή των στελεχών κατά είδος και τύπο αντοχής παρουσιάζεται στους πίνακες Γ11 και Γ12. Από τα 99 στελέχη με επίκτητο μηχανισμό αντοχής, τα 82 εκφράζουν VanA φαινότυπο και τα 17 VanB. Έτσι οι επιμέρους τιμές επιπολασμού διαμορφώνονται για μεν τον VanA φαινότυπο σε 6,6% και για τον VanB φαινότυπο 1,4%, ώστε ο VanA φαινότυπος αναδεικνύεται ως ο επικρατέστερος φαινότυπος μεταξύ των στελεχών με επίκτητο μηχανισμό αντοχής. Η κατανομή των 99 αυτών στελεχών σε είδη έχει ως ακολούθως: 79 (79,8%) *E. faecium*, 12 (12,1%) *E. faecalis*, 4 (4%) *E. avium*, 2 (2%) *E. hirae*, 1 (1%) *E. gallinarum* και 1 (1%) *E. casseliflavus*. Έτσι ως επικρατέστερο είδος με επίκτητο φαινότυπο αντοχής αναδεικνύεται το *E. faecium*.

#### **Γ. 4. Χαρακτηρισμός του γονότυπου αντοχής κατόπιν εφαρμογής multiplex PCR**

Όλα τα απομονωθέντα στελέχη εξετάστηκαν για χαρακτηρισμό του γονότυπου αντοχής σε μοριακό επίπεδο. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε είναι πολλαπλή αλυσωτή αντίδραση θερμοανθεκτικής πολυμεράσης (multiplex PCR). Πρόκειται για την ίδια ακριβώς μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για τα στελέχη της 1<sup>ης</sup> μελέτης επιπολασμού στο ΠΕΠΑΓΝΗ και περιγράφεται διεξοδικά στην ενότητα Ε. Στην μέθοδο χρησιμοποιούνται 7 ζεύγη primers ειδικά για τα γονίδια *rrs*, *vanC2/C3*, *ddl<sub>E. faecium</sub>*, *vanC1*, *ddl<sub>E. faecalis</sub>*, *vanB* και *vanA*. Η ανάλυση με αυτήν την μέθοδο επιβεβαίωσε την φαινοτυπική τυποποίηση των στελεχών και τον προσδιορισμό του φαινότυπου αντοχής στα γλυκοπεπτίδια που έγινε με το συμβατικό έλεγχο ευαισθησίας.

Για τα 4 στελέχη *E. avium* και τα 2 στελέχη *E. hirae* με την μέθοδο αυτή παρήχθησαν μόνο προϊόντα που αντιστοιχούσαν στην παρουσία του *vanA* γονιδίου, και του *rrs*, εφ' όσον η μέθοδος δεν περιλαμβάνει και primers ειδικούς για τον προσδιορισμό αυτών των ειδών.

Ένα στέλεχος *E. gallinarum* και ένα στέλεχος *E. casseliflavus* που αμφότερα παρουσίαζαν όχι την αναμενόμενη αντοχή χαμηλού επιπέδου στην βανκομυκίνη, αλλά υψηλή αντοχή σε βανκομυκίνη και τεϊκοπλανίνη, έδωσαν προϊόντα που αντιστοιχούσαν στην παρουσία του γονιδίου *vanA*, ταυτόχρονα με την παρουσία των χαρακτηριστικών του είδους γονιδίων *vanC1* και *vanC2/C3* αντίστοιχα, επιβεβαιώνοντας έτσι την φαινοτυπική ταυτοποίηση.

#### **Γ. 5. Ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (pulse field gel electrophoresis, PFGE)**

Ογδόντα έξι από τα απομονωθέντα στελέχη που χαρακτηρίστηκαν ως φέροντα *vanA* ή *vanB* γονότυπο μετά από ανάλυση με PCR, αναλύθηκαν με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Τα αποτελέσματα από αυτήν την ανάλυση παρουσιάζονται αναλυτικά στην ενότητα ΣΤ. Εδώ όμως

περιγράφονται εν τάχει τα αποτελέσματα που αφορούν τα στελέχη που απομονώθηκαν κατά την πολυκεντρική μελέτη επιπολασμού.

Από αυτήν την ανάλυση προέκυψαν 46 διαφορετικά πρότυπα (patterns) και τα στελέχη διαχωρίστηκαν σε 46 διαφορετικές ομάδες, κάθε μία εκ των οποίων πιθανόν αντιπροσωπεύει έναν ξεχωριστό κλώνο. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στον Πίνακα Γ6. Τα 65 στελέχη *E. faecium vanA* διαχωρίστηκαν σε 32 ξεχωριστές ομάδες, τα 4 στελέχη *E. faecalis vanA* σε 4 ομάδες, τα 10 στελέχη *E. faecium vanB* σε 4 ομάδες και τα 4 στελέχη *E. avium vanA* σε 3 ομάδες (ΣΧΗΜΑ Γ1).

Αναλύοντας τα αποτελέσματα κατά νοσοκομείο, βρίσκουμε ότι τα 31 στελέχη από το νοσοκομείο HPA-1 διαχωρίστηκαν σε 17 ξεχωριστές ομάδες, τα 15 στελέχη του HPA-2 σε 5 ομάδες, 32 στελέχη από το ΠΤ-1 σε 19 ομάδες, 3 στελέχη από ΘΕΣ-1 σε 2 ομάδες, 3 στελέχη από ΘΕΣ-2 σε 3 ομάδες και 2 στελέχη από ΙΩ-1 σε 2 ομάδες.

Μεγάλη συσσώρευση στελεχών παρατηρείται στο νοσοκομείο HPA-2, όπου 10 στελέχη *E. faecium vanA* κατατάσσονται στην ίδια ομάδα. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει το 66% των στελεχών αυτού του νοσοκομείου και το 77% των στελεχών *E. faecium vanA* αυτού του νοσοκομείου. Στο νοσοκομείο HPA-1 συσσώρευση παρατηρείται σε δύο ομάδες με 7 (44%) και 3 (19%) στελέχη από τα 16 *E. faecium vanA* που εξετάστηκαν, καθώς και σε μία ομάδα που συγκέντρωσε 6 (67%) από τα 9 στελέχη *E. faecium vanB* που εξετάστηκαν. Μικρή συσσώρευση στελεχών παρατηρείται και στο νοσοκομείο ΠΤ-1, όπου μία ομάδα συγκεντρώνει 7 (24%) από τα 29 στελέχη *E. faecium vanA*.

Τα στελέχη των ξεχωριστών νοσοκομείων δεν σχετίζονται μεταξύ τους εκτός από τα δύο νοσοκομεία της πόλης του Ηρακλείου, όπου 3 στελέχη *E. faecium vanA* του HPA-1 εμφανίζουν πανομοιότυπο πρότυπο και κατατάσσονται στην ίδια ομάδα, όπου συσσωρεύονται τα 10 στελέχη του HPA-2 και 1 στέλεχος *E. faecium vanB* από το HPA-2 κατατάσσεται στην ίδια ομάδα-πρότυπο, με 6 στελέχη του HPA-1.

## Γ. 6. Ανάλυση παραγόντων κινδύνου για αποικισμό από VRE

Κατά την ανάλυση των παραγόντων κινδύνου για αποικισμό από VRE, μόνο οι ασθενείς που ήταν αποικισμένοι από στελέχη με επίκτητο τύπο αντοχής στα γλυκοπεπτίδια (Van-A, Van-B) μελετήθηκαν σαν περιπτώσεις (cases). Όσοι βρέθηκαν αποικισμένοι από στελέχη με φυσική αντοχή (VanC1, VanC2/C3) δεν συμπεριελήφθησαν στις περιπτώσεις, αφού η επιδημιολογική σημασία αυτών των τύπων είναι εντελώς διαφορετική. Κατά την ανάλυση μιας μεταβλητής (univariate), αρκετοί παράγοντες βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των ομάδων περιπτώσεις (cases) και αρνητικοί μάρτυρες (controls). Από τις παραμέτρους που σχετίζονται με τον ασθενή, η ηλικία και η παρουσία κακοήθειας παρουσίασαν πολύ σημαντική συσχέτιση ( $p < 0,001$ ). Από τις παραμέτρους που σχετίζονται με το νοσοκομείο η νοσηλεία σε πανεπιστημιακό νοσοκομείο ( $p = 0,006$ ), η παρατεταμένη νοσοκομειακή νοσηλεία ( $p < 0,001$ ) και η νοσηλεία σε μονάδα νεφρού ( $p = 0,024$ ) βρέθηκαν να σχετίζονται με αποικισμό. Αναφορικά με τα αντιβιοτικά, τόσο η χορήγηση αντιβιοτικών, όσο και ο αριθμός των χορηγούμενων αντιβιοτικών παρουσίασαν ισχυρή συσχέτιση με αποικισμό ( $p < 0,001$ ). Κεφαλοσπορίνες, γλυκοπεπτίδια, καρβαπενέμες, και μακρολίδες-λινκοζαμίνες αναδείχθηκαν σε ομάδες ισχυρά σχετιζόμενες με αποικισμό ( $p < 0,001$ ). Από τις παρεμβατικές η ERCP παρουσίασε συσχέτιση πολύ σημαντική ( $p = 0,001$ ), όμως η τραχειοτομή, ο αριθμός των παρεμβατικών πράξεων και η προηγηθείσα χειρουργική επέμβαση παρουσίασαν επίσης σημαντική συσχέτιση με αποικισμό.

Κατά την ανάλυση όμως πολλαπλών μεταβλητών (stepwise multivariate regression analysis) μόνο οι παράγοντες της ηλικίας, η παρουσία κακοήθειας, η παρατεταμένη νοσηλεία, και η προηγηθείσα ERCP παρέμειναν ως ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου. Η σημαντικότερη ανατροπή αφορούσε την χορήγηση αντιβιοτικών. Από τις ομάδες των αντιβιοτικών μόνο η χορήγηση καρβαπενεμών παρέμεινε παράγοντας κινδύνου, ενώ ούτε ο αριθμός των χορηγούμενων αντιβιοτικών αναδείχθηκε παράγοντας κινδύνου κατά την ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών. Παράλληλα η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια ανεδείχθη και αυτή σε παράγοντα κινδύνου, αν και δεν είχε αναδειχθεί κατά την

ανάλυση μιας μεταβλητής. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των παραγόντων κινδύνου φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα Γ7.

### **Γ. 7. Συσχέτιση των αποτελεσμάτων των δύο μελετών στο ΠΑΓΝΗ μεταξύ τους και προς την πολυκεντρική.**

Καθώς η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε στην πολυκεντρική μελέτη ήταν ακριβώς η ίδια με εκείνη της πρώτης μελέτης επιπολασμού στο ΠΑΓΝΗ, παρέχεται η δυνατότητα σύγκρισης των αποτελεσμάτων των δύο μελετών μεταξύ τους και προς την πολυκεντρική. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στους πίνακες Γ11 και Γ12.

Περιορισμός της μεθόδου είναι ότι οι μετρήσεις αφορούν μόνο μία συγκεκριμένη χρονική στιγμή (point prevalence study) με ισχυρές πιθανότητες να μην αντιπροσωπεύονται οι πραγματικές τιμές (rates). Η συχνότητα επιπολασμού παρουσιάζει αύξηση από 18,8% στην πρώτη, σε 29,9% στην δεύτερη και είναι αρκετά υψηλότερη από την συχνότητα επιπολασμού στην πολυκεντρική μελέτη (20,5%) η οποία βρίσκεται πλησιέστερα στην συχνότητα επιπολασμού της πρώτης μελέτης του ΠΑΓΝΗ.

Ιδιαίτερα αυξημένη παρουσιάζεται η συχνότητα επιπολασμού του VanA φαινότυπου αντοχής, που από 1,8% ανέρχεται σε 10,3% (υπερπενταπλασιάζεται). Αύξηση παρουσιάζει και η συχνότητα του VanB φαινότυπου από 3,7% στην πρώτη σε 5,9% στην δεύτερη. Και οι δύο τιμές είναι σαφώς υψηλότερες από εκείνη της πολυκεντρικής (1,4%). Οι φαινότυποι VanC1 και VanC2/C3 δεν παρουσιάζουν αξιόλογες διαφοροποιήσεις.

Ένα άλλο αξιοσημείωτο γεγονός είναι η αύξηση της διασποράς του φαινότυπου VanA σε περισσότερα τμήματα του νοσοκομείου και της κατανομής του σε περισσότερα είδη. Ενώ στην πρώτη μελέτη VanA στελέχη ανιχνεύονται μόνο στην ΜΕΘ ενηλίκων και στην Μονάδα Τεχνητού Νεφρού (MTN), στην δεύτερη διαπιστώνεται διασπορά του VanA σε κλινικές του χειρουργικού και παθολογικού τομέα. Ωστόσο, σε καμία από τις δύο μελέτες δεν διαπιστώνεται παρουσία VanA σε κλινικές νοσηλείας παιδών. Η κατανομή του VanA σε είδη παρουσιάζει ευρύτερη διασπορά. Ενώ στην πρώτη μελέτη κατανέμεται σε 2 είδη



(*E. faecium*, *E. faecalis*), στην δεύτερη κατανέμεται σε 4 (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. avium*, *E. hirae*).

### Γ. 8. Συμπεράσματα

- Η πολυκεντρική μελέτη για επιπολασμό του VRE στο έντερο νοσηλευομένων ασθενών αποκάλυψε την ευρεία διασπορά αυτού (συχνότητα επιπολασμού 20,5%) στην πλειονότητα των συμμετεχόντων νοσοκομείων.
- Τομείς με την μεγαλύτερη συχνότητα επιπολασμού του VRE αναδείχθηκαν κατά σειρά οι: MTN (28,9%), χειρουργικός (22,6%), παθολογικός (19%) και ΜΕΘ ενηλίκων (14,9%).
- Επικρατέστερος τύπος αντοχής στα γλυκοπεπτίδια ανεδείχθη ο VanC1 και επικρατέστερο είδος το *E. gallinarum*.
- Κατά τον υπολογισμό της συχνότητας επιπολασμού στο σύνολο των δειγμάτων και για κάθε τύπο αντοχής επιμεριστικά, προέκυψαν οι εξής τιμές: 6,6% για τον VanA, 1,4% για τον VanB, 12,2% για τον VanC1, και 1,2% για τον VanC2/C3.
- Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων, όταν υπολογίσθηκαν μόνο τα στελέχη με επίκτητο μηχανισμό αντοχής (VanA, VanB) και εξαιρέθηκαν τα στελέχη που έφεραν μόνο φυσική συστασιακή αντοχή (VanC1, VanC3/C3), τότε η τιμή επιπολασμού διαμορφώθηκε σε 7,5% των ασθενών. Τομείς με την μεγαλύτερη συχνότητα επιπολασμού αναδείχθηκαν οι: παθολογικός (9,4%), χειρουργικός (8,6%), ΜΕΘ ενηλίκων (6%) και MTN (5,4%).
- Στα μικρά νοσοκομεία δεν ανιχνεύθηκαν στελέχη VanA/VanB, ενώ οι υψηλότερες τιμές επιπολασμού σημειώθηκαν σε νοσοκομεία που ανήκουν στην κατηγορία των μεγάλων νοσοκομείων.

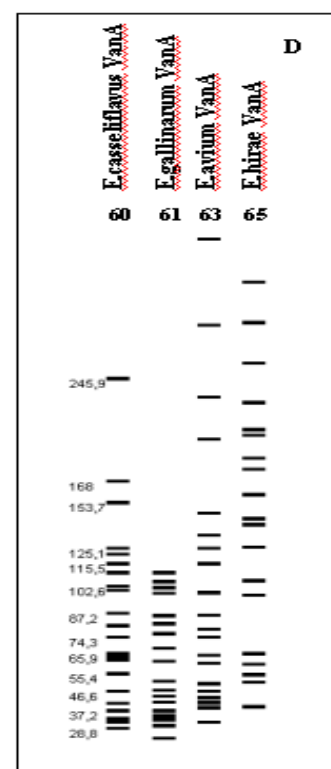
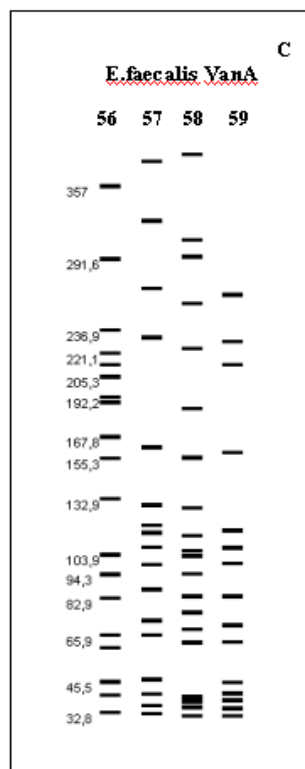
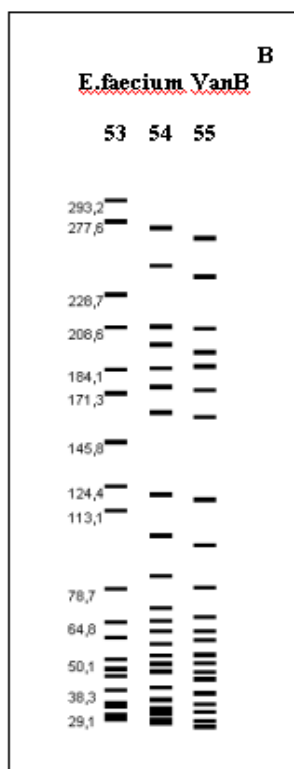
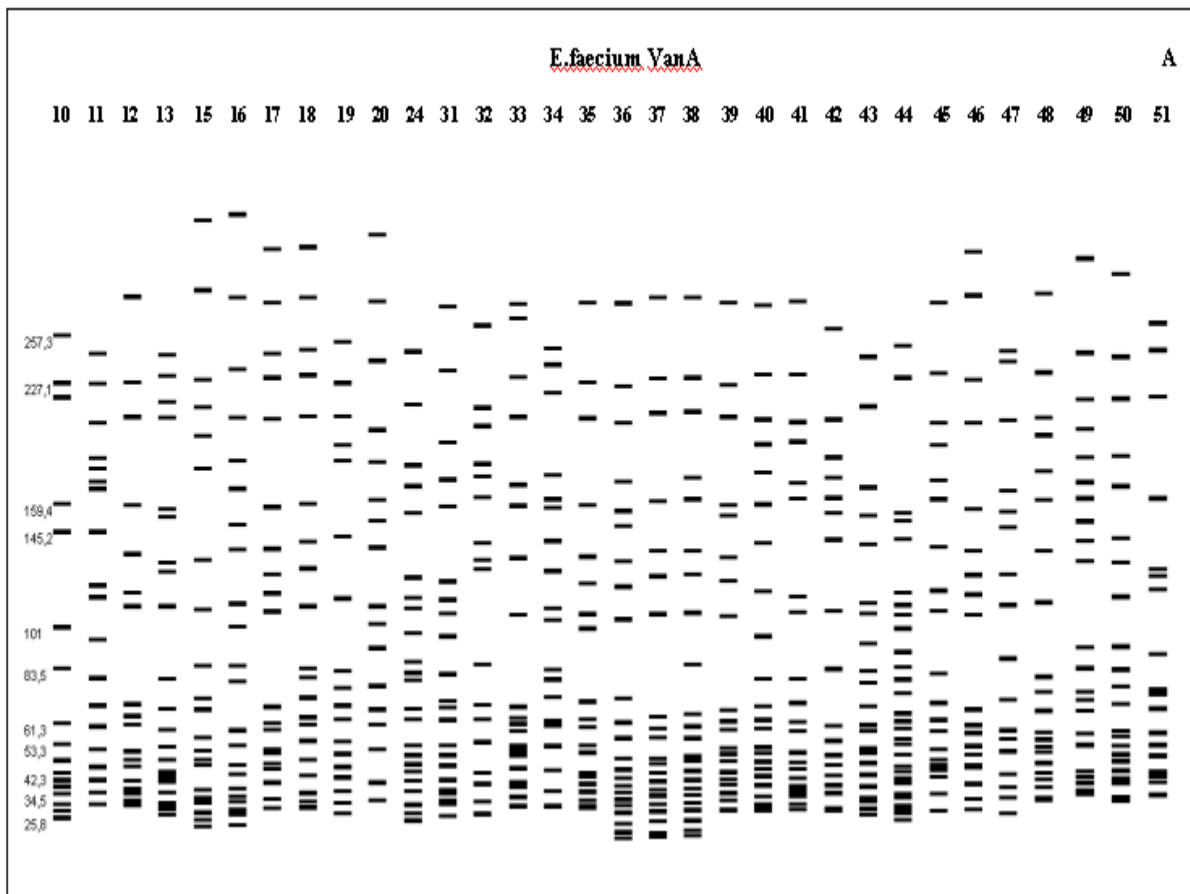
- Επικρατέστερος τύπος επίκτητης αντοχής στα γλυκοπεπίδια ανεδείχθη ο VanA (τιμή επιπολασμού 6,6%) και επικρατέστερο είδος με επίκτητο τύπο αντοχής το *E. faecium* (σχετική συχνότητα 79,8%).
- Η ανάλυση των στελεχών με μοριακές μεθόδους (multiplex PCR και PFGE) απέδειξε την ετερογένεια αυτών.
- Η μεγάλη ηλικία, η παρουσία κακοήθειας και ο αριθμός των ασθενειών στο υπόστρωμα του ασθενούς, η παρατεταμένη νοσηλεία στο νοσοκομείο, η νοσηλεία σε πανεπιστημιακό νοσοκομείο, η υποβολή σε τεχνητό νεφρό, η προηγηθείσα αντιβιοτική αγωγή, αλλά και ο αριθμός των χορηγηθέντων αντιβιοτικών, η διενέργεια πολλαπλών παρεμβατικών πράξεων στον ασθενή (ιδιαίτερα τραχειοτομής και ERCP) και η πρόσφατη υποβολή σε χειρουργική επέμβαση αναδείχθηκαν παράγοντες κινδύνου για αποικισμό του εντέρου από VRE.
- Τα αποτελέσματα στο νοσοκομείο HPA-1 (ΠΑΓΝΗ) δείχνουν αύξηση του επιπολασμού σε σχέση με την πρώτη μελέτη. Ιδιαίτερα αυξημένη είναι η τιμή επιπολασμού για τον φαινότυπο VanA, που εμφανίζει ευρύτερη διασπορά σε περισσότερα τμήματα του νοσοκομείου και ευρύτερη κατανομή σε περισσότερα είδη.

## ΠΙΝΑΚΑΣ Γ6.

**ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΟΜΑΔΕΣ ΜΕ PFGE ΑΝΑΛΥΣΗ 81  
ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ  
ΠΟΛΥΚΕΝΤΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

PFGE pattern	ΑΡΙΘΜ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	ΕΙΔΟΣ	HPA-1	HPA-2	ΠΤ-1	ΘΕΣ-1	ΘΕΣ-2	ΙΟ-1
10	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
11	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
12	7	<i>E. faecium VanA</i>	7					
13	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
15	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
16	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
17	13	<i>E. faecium VanA</i>	3	10				
18	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
19	1	<i>E. faecium VanA</i>			1			
20	1	<i>E. faecium VanA</i>			1			
24	1	<i>E. faecium VanA</i>			1			
31	1	<i>E. faecium VanA</i>			1			
32	1	<i>E. faecium VanA</i>			1			
33	2	<i>E. faecium VanA</i>			2			
34	1	<i>E. faecium VanA</i>			1			
35	1	<i>E. faecium VanA</i>			1			
36	2	<i>E. faecium VanA</i>			2			
37	7	<i>E. faecium VanA</i>			7			
38	2	<i>E. faecium VanA</i>			2			
39	2	<i>E. faecium VanA</i>			2			
40	4	<i>E. faecium VanA</i>			4			
41	1	<i>E. faecium VanA</i>			1			
42	2	<i>E. faecium VanA</i>		2				
43	1	<i>E. faecium VanA</i>			1			
44	1	<i>E. faecium VanA</i>			1			
45	2	<i>E. faecium VanA</i>				2		
46	1	<i>E. faecium VanA</i>		1				
47	1	<i>E. faecium VanA</i>				1		
48	1	<i>E. faecium VanA</i>						1
49	1	<i>E. faecium VanA</i>						1
50	1	<i>E. faecium VanA</i>					1	
51	1	<i>E. faecium VanA</i>					1	
53	1	<i>E. faecium VanB</i>	1					
54	7	<i>E. faecium VanB</i>	6	1				
55	1	<i>E. faecium VanB</i>	1					
66	1	<i>E. faecium VanB</i>	1					
56	1	<i>E. faecalis VanA</i>					1	
57	1	<i>E. faecalis VanA</i>	1					
58	1	<i>E. faecalis VanA</i>			1			
59	1	<i>E. faecalis VanA</i>		1				
60	1	<i>E. casseliflavus VanA</i>			1			
61	1	<i>E. gallinarum VanA</i>			1			
62	1	<i>E. avium VanA</i>	1					
63	2	<i>E. avium VanA</i>	2					
64	1	<i>E. avium VanA</i>	1					
65	1	<i>E. hirae VanA</i>	1					

**ΣΧΗΜΑ Γ1. ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΔΟΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ  
PFGE ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ  
ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΟΛΥΚΕΝΤΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ.**



**ΠΙΝΑΚΑΣ Γ7. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ  
ΑΠΟΙΚΙΣΜΟ ΑΠΟ  
ΣΤΕΛΕΧΗ VRE ΜΕ ΤΥΠΟ ΑΝΤΟΧΗΣ VAN-A Η VAN-B**

	Μεταβλητή	VanA/B φορείς (n = 92)	Μάρτυρες (n = 968)	Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
				UOR <sup>#1</sup> (95% CI)	P – value <sup>#2</sup>	AOR <sup>#1</sup> (95% CI)	P – value <sup>#2</sup>
Χαρακτηριστικά του ασθενούς	Ηλικία (έτη)	65.7 ± 15.0	57.3 ± 21.5	1.02 (1.01–1.04)	<b>&lt;0.001</b>	1.03 (1.01 – 1.05)	<b>&lt;0.001</b>
	Φύλο (άρρεν)	51 (55.4)	557 (57.5)	0.92 (0.60–1.41)	0.696	-	-
	Υποκείμενη νόσος						
	Ελεύθερο ιστορικό	22 (23.9)	420 (43.4)	Reference		Reference	
	<b>Κακοήθεια</b>	33 (35.9)	111 (11.5)	5.68 (3.18–10.12)	<b>&lt;0.001</b>	5.51 (2.92–10.40)	<b>&lt;0.001</b>
	Αυτοάνοσο	2 (2.2)	15 (1.5)	2.55 (0.55–11.83)	0.233	2.09 (0.35–12.35)	0.418
	<b>XNA</b>	19 (20.7)	268 (27.7)	1.35 (0.72–2.55)	0.348	2.79 (1.28–6.09)	<b>0.010</b>
	Κίρρωση ήπατος	1 (1.1)	12 (1.2)	1.59 (0.20–12.79)	0.662	2.23 (0.26–19.48)	0.468
	ΧΑΠ	4 (4.3)	32 (3.3)	2.39 (0.78–7.35)	0.129	1.61 (0.48–5.39)	0.443
	Σακχαρώδης διαβήτης	8 (8.7)	79 (8.2)	1.93 (0.83–4.50)	0.126	1.92 (0.78–4.74)	0.157
AEE	3 (3.3)	31 (3.2)	1.85 (0.52–6.51)	0.340	1.27 (0.33–4.85)	0.730	
Αριθμός ασθενειών	0.9 ± 0.6	0.7 ± 0.7	1.59 (1.19–2.14)	<b>0.002</b>	-	-	
Χαρακτηριστικά νοσοκομείου	Τύπος νοσοκομείου						
	Πανεπιστημιακό προς γενικό	66 (71.7)	550 (56.8)	1.93 (1.20–3.09)	<b>0.006</b>	-	-
	Τύπος τομέα						
	Παθολογικός προς	47 (51.1)	390 (40.3)	Reference			
	Μονάδες νεφρού	15 (16.3)	249 (25.7)	0.50 (0.27–0.91)	<b>0.024</b>	-	-
ΜΕΘ ενηλίκων	7 (7.6)	122 (12.6)	0.48 (0.21–1.08)	0.076			
Χειρουργικός	23 (25.0)	207 (21.4)	0.92 (0.54–1.56)	0.762			
<b>Μέρες νοσηλείας</b>	19.3 ± 26.6	9.9 ± 15.4	1.02 (1.01–1.03)	<b>&lt;0.001</b>	1.02 (1.01–1.03)	<b>0.003</b>	
Νοσηλεία προηγηθείσα τον τελευταίο μήνα	14 (15.2)	106 (11.0)	1.46 (0.80–2.67)	0.219	-	-	
Προηγηθείσα νοσηλεία σε ΜΕΘ	18 (19.6)	140 (14.5)	1.44 (0.83–2.48)	0.191	-	-	
Χορήγηση αντιβιοτικών	Προηγηθείσα αντιβιοτική αγωγή	72 (78.3)	455 (47.0)	4.06 (2.43–6.77)	<b>&lt;0.001</b>	-	-
	Αριθμός αντιβιοτικών	1.8 ± 1.3	0.9 ± 1.1	1.76 (1.50–2.07)	<b>&lt;0.001</b>	1.33 (0.99–1.78)	0.062
	Πενικιλίνες	17 (18.5)	165 (17.0)	1.10 (0.63–1.92)	0.728	-	-
	Κεφαλοσπορίνες	37 (40.2)	201 (20.8)	2.57 (1.65–4.00)	<b>&lt;0.001</b>	1.61 (0.87–3.00)	0.131
	Γλυκοπεπτίδια	24 (26.1)	73 (7.5)	4.33 (2.57–7.30)	<b>&lt;0.001</b>	2.03 (0.95–4.34)	0.067
	<b>Μονολακτάμες-καρβαπενέμες</b>	17 (18.5)	37 (3.8)	5.70 (3.07–10.61)	<b>&lt;0.001</b>	2.71 (1.15–6.38)	<b>0.022</b>
	Αμινογλυκοσίδες	15 (16.3)	95 (9.8)	1.79 (0.99–3.24)	0.054	-	-
	Κινολόνες	14 (15.2)	88 (9.1)	1.79 (0.98–3.30)	0.060	-	-
	Μακρολίδες-λινκοζαμίνες	17 (18.5)	70 (7.2)	2.91 (1.63–5.19)	<b>&lt;0.001</b>	1.93 (0.94–4.00)	0.075
	Άλλα αντιβιοτικά	15 (16.3)	83 (8.6)	2.08 (1.14–3.77)	<b>0.016</b>	-	-
Παρεμβατικές ιατρικές πράξεις	Χρήση παρεμβατικής	65 (70.7)	631 (65.2)	1.29 (0.81–2.05)	0.292	-	-
	Αριθμός παρεμβατικών	1.4 ± 1.5	1.1 ± 1.3	1.17 (1.01–1.36)	<b>0.031</b>	-	-
	Γαστροσκόπηση	3 (3.3)	29 (3.0)	1.09 (0.33–3.65)	0.887	-	-
	Κολονοσκόπηση	3 (3.3)	20 (2.1)	1.60 (0.47–5.48)	0.456	-	-
	Τραχειοτομή	10 (10.9)	50 (5.2)	2.24 (1.09–4.58)	<b>0.027</b>	-	-
	Διασωλήνωση	11 (12.0)	106 (11.0)	1.10 (0.57–2.14)	0.769	-	-
	Κεντρικός φλεβοκαθετήρ	21 (22.8)	161 (16.6)	1.48 (0.89–2.48)	0.134	-	-
	Ουροκαθετήρ	30 (32.6)	236 (24.4)	1.50 (0.95–2.38)	0.084	-	-
	<b>ERCP</b>	4 (4.3)	5 (0.5)	8.75 (2.31–33.19)	<b>0.001</b>	4.55 (1.06–19.52)	<b>0.042</b>
	Νεφρική κάθαρση	19 (20.7)	254 (26.2)	0.73 (0.43–1.24)	0.243	-	-
Περιτοναϊκή διύλιση	3 (3.3)	25 (2.6)	1.27 (0.38–4.29)	0.698	-	-	
<b>Πρόσφατη χειρουργική επέμβαση</b>	26 (28.3)	185 (19.1)	1.67 (1.03–2.70)	<b>0.037</b>	-	-	

**ΠΙΝΑΚΑΣ Γ8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΗΡΑ-1 (ΠΑΓΝΗ) ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΟΛΥΚΕΝΤΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ-ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΟΠΟΥ ΕΛΕΓΧΘΗΚΕ ΠΟΣΟΣΤΟ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ**

ΚΛΙΝΙΚΗ	ΕΞΕΤΑΣΘΕΝΤΕΣ	VANA	VANB	VANC	ΣΥΝΟΛΟ
ΨΥΧΙΑΤ	3	0	0	0	0
Π. ΟΓΚ.	8	0	0	1(12,5%)	1(12,5%)
ΑΙΜ	7	2 (28,6)	3(42,9%)	1 (14,3%)	5*(71,4%)
ΝΕΦΡΟ	5	1(20%)	3(60%)	0	3*(60%)
Α. Π.	9	0	0	2 (22,2%)	2 (22,2%)
Κ/Κ	7	1(14,3%)	0	0	1(14,3%)
ΝΕΥΡΟ	5	1(20%)	0	1(20%)	2(40%)
ΠΝΕΥΝΟ	6	0	0	2(33,3%)	2(33,3%)
Β.Π.	8	1(12,5%)	0	3(37,5%)	4(50%)
Γ/Χ	2	0	0	1(50%)	1(50%)
Χ.ΟΓΚ	1	0	0	0	0
ΟΡΘ.	9	4(44,4%)	1(1,1%)	0	5(55,6%)
Μ/Γ	5	0	0	1(20%)	1(20%)
ΩΡΛ	3	1(33,3%)	0	1(33,3%)	2(66,6%)
ΟΦΘ	4	0	0	2(50%)	2(50%)
ΟΥΡΟ	5	0	0	1(20%)	1(20%)
ΝΕΥΡ/Χ	4	3(75%)	0	0	3(75%)
ΠΑΙΔ.	6	0	0	0	0
ΠΔΧ	5	0	0	0	0
ΠΑΙΔ. ΑΙΜ	1	0	0	0	0
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>104</b>	<b>14(13,5%)</b>	<b>7(6,7%)</b>	<b>16(15,4%)</b>	<b>35(33,6%)</b>

\* Διπλός αποικισμός του ίδιου ασθενούς ταυτόχρονα από στέλεχος με VanA και έτερο στέλεχος με VanB .

**ΠΙΝΑΚΑΣ Γ9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΗΡΑ-1 (ΠΑΓΝΗ) ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΟΛΥΚΕΝΤΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΠΟΛΑΣΜΟΥ-ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΟΠΟΥ ΕΛΕΓΧΘΗΚΕ ΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ**

<b>ΚΛΙΝΙΚΗ</b>	<b>ΑΣΘΕΝΕΙΣ</b>	<b>VANA</b>	<b>VANB</b>	<b>VANC</b>	<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>
<b>ΜΕΘ</b>	11	0	0	1 (9%)	1 (9%)
<b>ΜΕΠΚ</b>	9	1 (11%)	0	1 (11%)	2(22%)
<b>ΜΕΘ/ΠΑΙΔ</b>	3	0	1 (33%)	0	1 (33%)
<b>ΝΕΟΓΝΑ</b>	16	0	0	0	0
<b>MTN</b>	60	6 (10%)	4 (6,7%)	12 (18,3%)	22(35%)
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>99</b>	<b>7(7%)</b>	<b>5(5%)</b>	<b>14(14,1%)</b>	<b>26(26.3%)</b>

**ΠΙΝΑΚΑΣ Γ10. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΗΡΑ-1 (ΠΑΓΝΗ) ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΟΛΥΚΕΝΤΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΠΟΛΑΣΜΟΥ ΚΑΤΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ, ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΕΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ**

<b>ΚΛΙΝΙΚΕΣ</b>	<b>ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΕΞΕΤΑΣΘ</b>	<b>VanA</b>	<b>VanB</b>	<b>VanC</b>	<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>
<b>ΠΑΘΟΛ.</b>	60	6 (10%)	6(10%)	10 (16,7%)	20* (33,3%)
<b>ΧΕΙΡΟΥΡ.</b>	33	8 (24,2%)	1 (3%)	6 (18,2%)	15 (45,5%)
<b>ΠΑΙΔΙΑΤΡ</b>	12	0	0	0	0
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>104</b>	<b>14 (13,5)</b>	<b>7 (6,7%)</b>	<b>16 (15,4%)</b>	<b>35 (33,6%)</b>

\* Διπλός αποικισμός του ίδιου ασθενούς ταυτόχρονα από στέλεχος με VanA και έτερο στέλεχος με VanB .

## ΠΙΝΑΚΑΣ Γ11.

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ  
ΜΕΛΕΤΩΝ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ

	<b>Α΄ ΜΕΛΕΤΗ</b> <b>ΠΕΠΑΓΝΗ</b> <b>1-2-2001</b>	<b>Β΄ ΜΕΛΕΤΗ</b> <b>ΠΕΠΑΓΝΗ</b> <b>1-11-2002</b>	<b>ΠΟΛΥ-</b> <b>ΚΕΝΤΡΙΚΗ</b> <b>1-11-2002</b>
<b>ΕΞΕΤΑΣΘΕΝΤΕΣ</b>	218	204	1246
<b>ΑΠΟΙΚΙΣΜΕΝΟΙ</b>	41 (18,8%)	61 (29,9%)	255 (20,5%)
<b>ΣΤΕΛΕΧΗ</b>	42	63	266
<b>ΔΙΠΛΟΣ</b> <b>ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΣ</b>	1	2	11
<b>Van-A</b>	4 (1,8%)	21 (10,3%)	82 (6,6%)
<b>Van-B</b>	8 (3,7%)	12 (5,9%)	17 (1,4%)
<b>Van-C1</b>	24 (11%)	28 (13,7%)	152 (12,2%)
<b>Van-C2/C3</b>	6 (2,8%)	2 (1%)	15 (1,2%)



**ΠΙΝΑΚΑΣ Γ12.**  
**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ**  
**ΚΑΤΑ ΕΙΔΟΣ ΚΑΙ ΤΥΠΟ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΙΣ ΔΥΟ ΜΕΛΕΤΕΣ**  
**ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ**

ΕΙΔΟΣ	Α΄ ΜΕΛΕΤΗ	Β΄ ΜΕΛΕΤΗ	ΠΟΛΥ-
	ΠΕΠΑΓΝΗ	ΠΕΠΑΓΝΗ	ΚΕΝΤΡΙΚΗ
	1-2-2001	1-11-2002	1-11-2002
	No (%)		
<i>E. faecium Van-A</i>	4 (9,5)	15 (23,8)	66 (24,8)
<i>E. faecium Van-B</i>	7 (16,7)	9 (14,3)	13 (4,9)
<i>E. faecalis Van-A</i>	0	1 (1,6)	8 (3)
<i>E. faecalis Van-B</i>	1 (2,4)	3 (4,8)	4 (1,5)
<i>E. avium Van-A</i>	0	4 (6,3)	4 (1,5)
<i>E. hirae Van-A</i>	0	1 (1,6)	2 (0,8)
<i>E. gallinarum</i>	24 (57,1)	28 (44,4)	152 (57,1)
<i>E. gallinarum Van-A</i>	0	0	1 (0,4)
<i>E. casseliflavus</i>	6 (14,3)	2 (3,2)	15 (5,6)
<i>E. casseliflavus Van-A</i>	0	0	1 (0,4)
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	42 (100)	63 (100)	266 (100)

## **Δ. ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΠΟ VRE ΜΕ ΜΟΡΦΗ ΣΠΟΡΑΔΙΚΩΝ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ**

### **Δ.1. Αριθμός κρουσμάτων - χρονική κατανομή**

Ο συνολικός αριθμός των κρουσμάτων VRE λοίμωξης μέχρι το τέλος του 2004 ανήλθε σε 54. Η ετήσια κατανομή των κρουσμάτων φαίνεται στο ΣΧΗΜΑ Δ1. Το πρώτο κρούσμα που σημειώθηκε στο τέλος του έτους 2000, στην ετήσια κατανομή καταμετρήθηκε με τα κρούσματα του 2001. Αναφορικά με τις τρεις περιόδους, τα κρούσματα κατανέμονται ως εξής:

Α΄ περίοδος, 18/12/2000 – 31/1/2001 (45 ημέρες), 5 κρούσματα

Β΄ περίοδος, 1/2/2001 – 31/10/2002 (25 μήνες), 4 κρούσματα

Γ΄ περίοδος, 1/11/2002 – 31/12/2004 (26 μήνες), 45 κρούσματα

Μελετώντας τον αριθμό κρουσμάτων, όπως κατανέμονται στις τρεις περιόδους, διαπιστώνουμε ότι η μεγαλύτερη συσσώρευση κρουσμάτων παρατηρείται κατά την πρώτη περίοδο, η δεύτερη περίοδος χαρακτηρίζεται από ύφεση, ενώ η τρίτη από ολοένα αυξανόμενο αριθμό κρουσμάτων.

Η ετήσια κατανομή και η επίπτωση ανά 1000 εισαγόμενους ασθενείς και 1000 ημέρες νοσηλείας παρουσιάζονται στον ΠΙΝΑΚΑ Δ1. Από την ετήσια κατανομή φαίνεται ότι το έτος 2002 παρουσιάζει τον μικρότερο αριθμό κρουσμάτων και την μικρότερη επίπτωση, ενώ το 2004 τον μεγαλύτερο.

### **Δ. 2. Καταγραφή ασθενών**

#### **Δ. 2. α) Χαρακτηριστικά των ασθενών-δημογραφικά στοιχεία**

Η μελέτη της κατανομής κατά φύλο έδειξε μικρή υπεροχή των ανδρών έναντι των γυναικών. Από τους 54 ασθενείς οι 30 (55,6%) ήταν άνδρες και οι 24 (44,4%) ήταν γυναίκες.

Η ηλικία των ασθενών είχε εύρος από 85 ημέρες ως 96 έτη. Η μέση ηλικία ήταν 59,7 έτη. Μεταξύ των ασθενών συγκαταλέγονται 2 παιδιά (ηλικίας 85 ημερών και 12 ετών) και 8 υπερήλικες (ηλικίας  $\geq$  80 έτη). Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η λοίμωξη που αναπτύχθηκε στο ηλικίας 85 ημερών βρέφος

ήταν εξωτερική ωτίτις και το απομονωθέν VRE στέλεχος ήταν *E. gallinarum vanC1* που απομονώθηκε μαζί με άλλα 3 στελέχη (*E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*) και πιθανότατα να πρόκειται για πολυμικροβιακή λοίμωξη.

## **Δ. 2. β) Μορφή λοίμωξης – θέση απομόνωσης**

Η κατανομή των κρουσμάτων κατά εντόπιση της λοίμωξης φαίνεται στον ΠΙΝΑΚΑ Δ1. Η συχνότερη εντόπιση λοίμωξης είναι το ουροποιητικό σύστημα (27,8%). Ακολουθούν οι περιτονίτιδες και οι ενδοκοιλιακές πυώδεις συλλογές που θεωρούνται ως μία ομάδα (20,4%). Τρίτη σε συχνότητα μορφή λοίμωξης είναι η βακτηραιμία (16,6%). Από τις υπόλοιπες μορφές αξίζει να αναφερθούν οι διαπυήσεις σε έλκη κατακλίσεων (9,3%) και οι διαπυήσεις χειρουργικών τραυμάτων (5,6%). Οι διαπυήσεις της χοληδόχου κύστης (5,6%) αναφέρονται σαν ξεχωριστή ομάδα, αν και θα μπορούσαν να συνυπολογιστούν με τις ενδοκοιλιακές διαπυήσεις.

## **Δ. 2. γ) Παθολογικό υπόστρωμα ασθενούς**

Από τους 54 ασθενείς μόνο οι 4 διέθεταν ελεύθερο ιστορικό, δηλαδή δεν είχαν κανένα παθολογικό υπόστρωμα που να προδιαθέτει άμεσα ή έμμεσα για λοίμωξη. Οι υπόλοιποι 50 ασθενείς διέθεταν μία ή περισσότερες υποκείμενες νόσους που θα μπορούσαν να υποβοηθήσουν την ανάπτυξη λοίμωξης. Οι νόσοι αυτοί είναι κατά σειρά συχνότητας:

1. κακοήθεις νόσοι του αιμοποιητικού συστήματος, 9 (16,7%) ασθενείς
2. συμπαγείς όγκοι, 7 (13%) ασθενείς
3. χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, 7 (13%) ασθενείς
4. ρήξεις σπλάχνων κοιλίας, 7 (13%) ασθενείς
5. φλεγμονές χοληφόρων – παγκρέατος, 7 (13%) ασθενείς
6. τετραπληγία-παραπληγία, 5 (9,3%) ασθενείς
7. καρδιαγγειακά νοσήματα, 5 (9,3) ασθενείς
8. παθολογική παχυσαρκία, 2 (3,7%) ασθενείς
9. κίρρωση ήπατος, 2 (3,7%) ασθενείς

10. σακχαρώδης διαβήτης, 1 (1,9%) ασθενής  
 11. χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, 1 (1,9%) ασθενής.

### **Δ. 2. δ) Χειρουργική επέμβαση**

Διερευνήθηκε η υποβολή των ασθενών σε χειρουργική επέμβαση κατά την διάρκεια του τελευταίου εξαμήνου. Από το σύνολο των ασθενών, 24 (44,4%) είχαν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση και 9 από αυτούς είχαν υποβληθεί σε 2 τουλάχιστον επεμβάσεις. Η χειρουργική επέμβαση ήταν πρόσφατη (στην διάρκεια του τελευταίου 15ημέρου) σε 14 ασθενείς.

Με βάση τα κριτήρια του NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance) για την κατηγοριοποίηση των χειρουργικών τραυμάτων ανάλογα με τον βαθμό μολυσματικότητας της χειρουργικής επέμβασης (151), έγινε ο διαχωρισμός σε 4 κατηγορίες:

- Τάξη I (άσηπτα), 7 περιπτώσεις
- Τάξη II (δυσνητικά επιμολυσμένα), 5 περιπτώσεις
- Τάξη III (μολυσματικά), 5 περιπτώσεις
- Τάξη IV (σηπτικά), 7 περιπτώσεις

### **Δ. 2. ε) Παρεμβατικές**

Καταγράφηκε επίσης η διενέργεια παρεμβατικών ιατρικών και νοσηλευτικών πράξεων κατά την διάρκεια της παρούσης νοσηλείας.

Διαπιστώθηκε ότι 34 (63%) από τους ασθενείς είχαν υποβληθεί σε μία τουλάχιστον παρεμβατική πράξη. Παρουσιάζονται κατά σειρά συχνότητας:

1. εισαγωγή ουροκαθετήρα τύπου Folley, 22 (40,8%) ασθενείς
2. τοποθέτηση κεντρικού φλεβοκαθετήρα, 18 (33,3%) ασθενείς
3. τραχειοτομή-αναπνευστήρας, 7 (13%) ασθενείς
4. γαστροσκόπηση, 4 (7,4%) ασθενείς
5. παρεντερική διατροφή, 4 (7,4%) ασθενείς
6. ERCP, 3 (5,6%) ασθενείς
7. μετάγγιση αίματος, 3 (5,6%) ασθενείς
8. τοποθέτηση Billow, 3 (5,6%) ασθενείς

9. περιτοναϊκή κάθαρση, 3 (5,6%) ασθενείς
10. αιμοκάθαρση, 2 (3,7%) ασθενείς
11. τοποθέτηση Levin, 2 (3,7%) ασθενείς
12. ασκητική παρακέντηση, 1 (1,9%) ασθενής
13. αντικατάσταση μόνιμου βηματοδότη, 1(1,9%) ασθενής

#### **Δ. 2. στ) Χορήγηση αντιβιοτικών**

Η χορήγηση αντιβιοτικών που καταγράφηκε αφορούσε τις τελευταίες 30 ημέρες πριν την διάγνωση της λοίμωξης. Διαπιστώθηκε ότι μόνο 4 από τους ασθενείς δεν είχαν λάβει αντιμικροβιακή αγωγή. Στους υπόλοιπους 50 (92,6%) ασθενείς είχαν χορηγηθεί ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά. Τα χορηγηθέντα αντιβιοτικά παρουσιάζονται κατά σειρά συχνότητας:

- κεφαλοσπορίνες, σε 27 ασθενείς
- γλυκοπεπτίδια, σε 26 ασθενείς
- ουρεϊδοπενικιλίνες, σε 18 ασθενείς
- κινολόνες, σε 17 ασθενείς
- αμινογλυκοσίδες, σε 17 ασθενείς
- καρβαπενέμες, σε 15 ασθενείς
- αντιμυκητιασικά, σε 8 ασθενείς
- αντιαναερόβια, σε 8 ασθενείς
- μακρολίδες, σε 7 ασθενείς
- πενικιλίνες, σε 4 ασθενείς
- χλωραμφενικόλη, σε 2 ασθενείς
- ριφαμπικίνη, σε 2 ασθενείς
- τετρακυκλίνη, σε 1 ασθενή
- κολιστίνη, σε 1 ασθενή

### **Δ. 3. Επιδημιολογικά στοιχεία**

#### **Δ. 3. α) Διάστημα νοσηλείας**

Το διάστημα της νοσηλείας του ασθενούς ως την ημέρα που διαγνώστηκε η λοίμωξη από VRE αποτελεί βασικό επιδημιολογικό στοιχείο. Το διάστημα αυτό καταγράφηκε σε όλους τους ασθενείς από την ημερομηνία εισόδου της παρούσης νοσηλείας, χωρίς να υπολογισθεί το διάστημα άλλης πρόσφατης νοσηλείας που τυχόν προηγήθηκε στην ίδια ή σε άλλη κλινική, στο ίδιο ή σε άλλο νοσοκομείο. Η μέση τιμή του υπολογίσθηκε σε 23,5 ημέρες. Σε 6 ασθενείς το διάστημα νοσηλείας, όταν ελήφθη το δείγμα από το οποίο απομονώθηκε VRE, ήταν μικρότερο από 48 ώρες. Επειδή όμως 2 από αυτούς είχαν προηγηθείσα νοσηλεία στο ΠΑΓΝΗ στην διάρκεια των 30 τελευταίων ημερών, καταμετρήθηκαν με τους υπόλοιπους 48 που χαρακτηρίστηκαν ως έχοντες νοσοκομειακή λοίμωξη. Αξίζει να σημειωθεί ότι, στους 3 από τους υπόλοιπους 4 που δεν χαρακτηρίστηκαν ως έχοντες νοσοκομειακή λοίμωξη, το απομονωθέν VRE στέλεχος ήταν στέλεχος με φυσική αντοχή στην βανκομυκίνη (2 ασθενείς με *E. gallinarum*, 1 με *E. casseliflavus*).

Στον ΠΙΝΑΚΑ Δ2 παρουσιάζεται η μέση διάρκεια νοσηλείας κατά κλινική και στο σύνολο του νοσοκομείου κατά την χρονική αυτή περίοδο. Είναι φανερό πως, σε σχέση με την μέση διάρκεια νοσηλείας στο σύνολο του νοσοκομείου που είναι 3,19 ημέρες και με την μεγαλύτερη μέση διάρκεια νοσηλείας που σημειώθηκε στην νευροχειρουργική κλινική και είναι 10,11 ημέρες, το διάστημα αυτό είναι αρκετά μεγάλο. Το μεγαλύτερο διάστημα που καταγράφηκε ήταν 86 ημέρες. Επομένως οι ασθενείς που αναπτύσσουν λοίμωξη από VRE είναι κατά βάση ασθενείς με παρατεταμένο χρόνο νοσηλείας.

#### **Δ. 3. β) Κατανομή σε τμήματα**

Η κατανομή των κρουσμάτων κατά τομέα και κλινική σε απόλυτους αριθμούς, σε αναλογία ανά 1000 εισαγόμενους ασθενείς και ανά 1000 ημέρες νοσηλείας σε κάθε κλινική παρουσιάζονται στον ΠΙΝΑΚΑ Δ3. Παράλληλα παρουσιάζονται και στοιχεία που σχετίζονται με την νοσηλευτική

δραστηριότητα κάθε κλινικής στο χρονικό αυτό διάστημα, δηλαδή ο μέσος αριθμός ανά ημέρα νοσηλευόμενων ασθενών (Μ.Τ.Α.Η.Ν.) και η μέση διάρκεια νοσηλείας σε ημέρες (Μ.Δ.Ν.). Οι υπολογισμοί αυτών των παραμέτρων έγινε με βάση τα στατιστικά στοιχεία που μας παραχώρησε η στατιστική υπηρεσία του νοσοκομείου (ΠΑΓΝΗ).

Ο μεγαλύτερος αριθμός κρουσμάτων (8) σημειώθηκε στην μονάδα εντατικής νοσηλείας (ΜΕΘ). Σημαντικό αριθμό κρουσμάτων συγκέντρωσε και ο παθολογικός τομέας (30) με πρώτη σε αριθμό κρουσμάτων (7) την γαστρεντερολογική κλινική. Ακολουθούν η νεφρολογική και η αιματολογική κλινική με 6 κρούσματα σε κάθε μία. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι οι δύο αυτές κλινικές συστεγάζονται στον ίδιο χώρο, οι ασθενείς τους νοσηλεύονται σε κοινούς θαλάμους και νοσηλευτικά αποτελούν μία κλινική. Επομένως αθροιστικά τα κρούσματα σε αυτήν την κλινική είναι 12. Σημαντικός αριθμός κρουσμάτων (15) σημειώθηκε και στον χειρουργικό τομέα με πρώτη την γενική χειρουργική (6 κρούσματα).

Όταν τα περιστατικά λοίμωξης από VRE εκφραστούν με την μορφή δεικτών αναλογίας ανά 1000 εισαχθέντες ασθενείς, ή ανά 1000 ημέρες νοσηλείας σε κάθε τμήμα ξεχωριστά, και πάλι η ΜΕΘ έχει την πρώτη θέση. Όμως στην δεύτερη θέση ανέρχεται η νεφρολογική κλινική αφού ξεπερνά την γαστρεντερολογική. Ομοίως και στον χειρουργικό τομέα, η γενική χειρουργική παραμένει πρώτη και σε επίπεδο δεικτών, όμως η χειρουργική ογκολογική αν και με μικρότερο αριθμό κρουσμάτων από την ορθοπεδική παρουσιάζει υψηλότερους δείκτες.

Οι αριθμοί που δίνονται στην τελευταία γραμμή του ΠΙΝΑΚΑ Δ3, επί του συνόλου, αναφέρονται στο σύνολο όλων των κλινικών του νοσοκομείου, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που δεν παρουσίασαν περιστατικά λοίμωξης από VRE.

### **Δ. 3. γ) Διακίνηση ασθενών**

Ιδιαίτερο επιδημιολογικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η διακίνηση των ασθενών στο νοσοκομείο πριν και μετά την εμφάνιση της λοίμωξης καθώς και

η προηγηθείσα νοσηλεία σε άλλο νοσοκομείο. Από το σύνολο των 54 ασθενών, μόνο οι 13 (24%) είχαν μία και μόνη νοσηλεία στην κλινική όπου σημειώθηκε η λοίμωξη, χωρίς να έχει προηγηθεί νοσηλεία σε άλλο νοσοκομείο ή άλλη κλινική του ΠΑΓΝΗ κατά το εξαμήνο που προηγήθηκε της λοίμωξης. Από τους υπόλοιπους ασθενείς, 7 (13%) είχαν μεταφερθεί από άλλο ελληνικό νοσηλευτικό ίδρυμα, 5 (9,3%) είχαν στο ιστορικό τους τουλάχιστον μία προηγούμενη νοσηλεία (προηγούμενη εισαγωγή και έξοδος) κατά την διάρκεια του τελευταίου εξαμήνου στην ίδια κλινική που σημειώθηκε η λοίμωξη, 6 (11,1%) είχαν προηγηθείσα νοσηλεία (προηγούμενη εισαγωγή και έξοδος) και την διάρκεια του τελευταίου εξαμήνου σε άλλη κλινική του ΠΑΓΝΗ, 20 (37%) είχαν διακινηθεί σε μία ή και περισσότερες κλινικές μέσα στο νοσοκομείο μετά την είσοδό τους και κατά την διάρκεια της παρούσης νοσηλείας πριν από την ανάπτυξη της λοίμωξης από VRE, ενώ 14 (25,9%) διακινήθηκαν σε άλλες κλινικές του νοσοκομείου μετά την εκδήλωση της λοίμωξης. Καθίσταται δηλαδή φανερό ότι πρόκειται για ασθενείς με ιδιαίτερα αυξημένη διακίνηση.

Ιδιαίτερη σημασία παρουσιάζει η διακίνηση από και προς την ΜΕΘ, αφού αυτό το τμήμα φαίνεται να έχει την μεγαλύτερη επιβάρυνση σε λοιμώξεις από VRE. Από τους ασθενείς που ανέπτυξαν λοίμωξη σε άλλη κλινική, 8 ασθενείς είχαν πρόσφατα νοσηλευθεί στην ΜΕΘ, ενώ άλλοι 6 που επίσης ανέπτυξαν λοίμωξη σε άλλη κλινική μεταφέρθηκαν με την λοίμωξη στην ΜΕΘ. Αν συνυπολογίσουμε και τους 8 ασθενείς της ΜΕΘ που ανέπτυξαν λοίμωξη κατά την διάρκεια της εκεί νοσηλείας τους, τότε 22 (41%) από τους 54 ασθενείς σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την ΜΕΘ.

### **Δ. 3. δ) Έλεγχος για αποικισμό**

Έλεγχος για αποικισμό του εντέρου από VRE έγινε μόνο σε 11 (20,4%) ασθενείς. Ο έλεγχος απέβη θετικός σε 7 (63,6%) ασθενείς, δηλαδή αυτοί οι ασθενείς βρέθηκαν αποικισμένοι στο γαστρεντερικό από VRE και απομονώθηκαν ένα, ή περισσότερα στελέχη από τον καθένα τους. Οι υπόλοιποι 4 ασθενείς χαρακτηρίστηκαν αρνητικοί για αποικισμό του εντέρου. Χαρακτηριστική υπήρξε η περίπτωση ενός ασθενούς που στον πρώτο έλεγχο



για αποικισμό του γαστρεντερικού από VRE βρέθηκε αρνητικός, στον δεύτερο έλεγχο απομονώθηκε ένα στέλεχος *E. gallinarum vanCI* και τελικά βρέθηκε θετικός στον τρίτο έλεγχο που έγινε ένα μήνα μετά την διάγνωση της λοίμωξης από VRE.

Σε 11 περιπτώσεις λοίμωξης από VRE, παράλληλα με τον πάσχοντα, διερευνήθηκαν και όλοι οι υπόλοιποι νοσηλευόμενοι ασθενείς στον ίδιο θάλαμο για αποικισμό του εντέρου από VRE. Θετικός απέβη ο έλεγχος σε 6 (54,5%) των περιπτώσεων και εντοπίστηκαν συνολικά σε αυτούς τους ελέγχους 11 ασθενείς αποικισμένοι από VRE. Στις υπόλοιπες 5 περιπτώσεις ελέγχου, δεν εντοπίστηκαν άλλοι ασθενείς αποικισμένοι από VRE στον ίδιο θάλαμο.

Ο μικρός αριθμός των ασθενών με λοίμωξη από VRE, που ελέγχθηκαν για αποικισμό του γαστρεντερικού από VRE, δεν επιτρέπει την αξιολόγηση αυτών των δεδομένων.

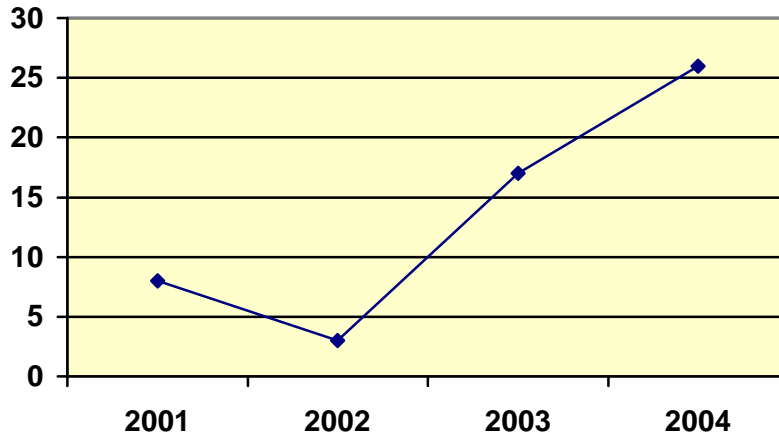
#### ΠΙΝΑΚΑΣ Δ1. ΕΤΗΣΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΙ ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ VRE

ΕΤΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ	ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΑΝΑ 1000 ΕΙΣΑΓΩΓΕΣ	ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΑΝΑ 1000 ΗΜΕΡΕΣ ΝΟΣΗΛΕΙΑΣ
2001	8	0,137	0,037
2002	3	0,049	0,014
2003	17	0,282	0,077
2004	26	0,400	0,109
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>54</b>	<b>0,221</b>	<b>0,061</b>

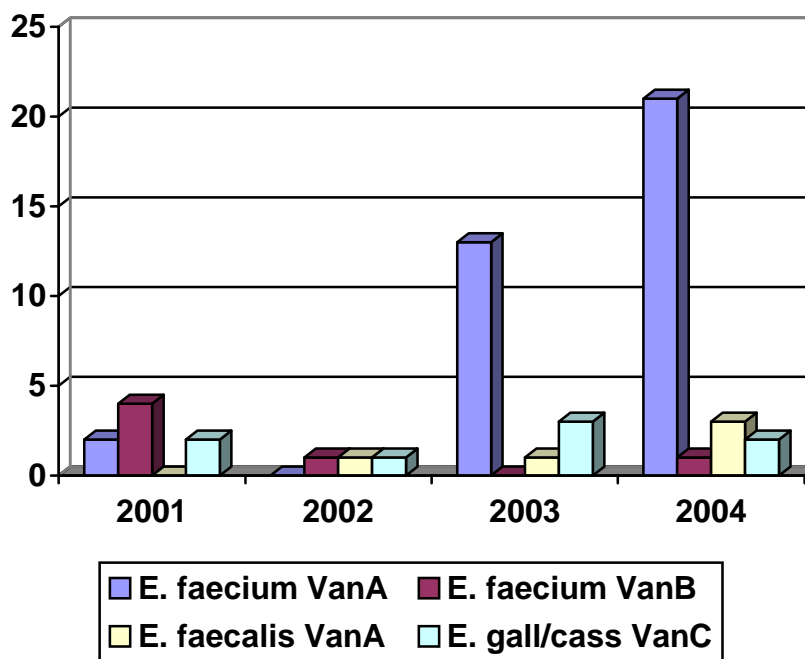
**ΠΙΝΑΚΑΣ Δ2. ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ VRE**

<b>ΕΝΤΟΠΙΣΗ</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ</b>
Λοίμωξη ουροποιητικού	15 (27,8 %)
Περιτοναϊκό υγρό – ενδοκοιλιακό πύο	11 (20,4 %)
Αίμα (Βακτηραιμία)	9 (16,6 %)
Διαπύηση κατακλίσεων	5 (9,3 %)
Χολή	3 (5,6 %)
Διαπύηση χειρουργικού τραύματος	3 (5,6 %)
Πλευριτικό υγρό	2 (3,7 %)
Λοίμωξη αναπνευστικού	2 (3,7 %)
Λοίμωξη μαλακών μορίων	2 (3,7 %)
Ωτικό	1 (1,8 %)
Κεντρικός φλεβοκαθετήρας	1 (1,8 %)
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>54 (100 %)</b>

**ΣΧΗΜΑ Δ1. ΕΤΗΣΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ VRE ΣΤΟ ΠΑΓΝΗ**



**ΣΧΗΜΑ Δ2. ΕΤΗΣΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤΑ ΕΙΔΟΣ ΚΑΙ ΤΥΠΟ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ VRE ΣΤΟ ΠΑΓΝΗ**



#### Δ. 4. Μικροβιολογικά δεδομένα-πολυμικροβιακές λοιμώξεις

Μία άλλη σημαντική πτυχή των λοιμώξεων από VRE είναι και η ενδεχόμενη συμμετοχή και άλλων μικροβίων. Από τους 54 ασθενείς, στους 30 (55,6%), στο ίδιο δείγμα μαζί με τον VRE απομονώθηκαν ταυτόχρονα και άλλα μικρόβια (ένα ή και περισσότερα), γεγονός που ανάγει στον χαρακτηρισμό της λοίμωξης ως πολυμικροβιακής. Σε ορισμένους τύπους (εντοπίσεις) λοιμώξεων η πλειοψηφία των περιπτώσεων έχει πολυμικροβιακό χαρακτήρα. Στον ΠΙΝΑΚΑ Δ4 αναφέρονται οι πολυμικροβιακές λοιμώξεις με συμμετοχή του VRE κατανεμημένες κατά εντόπιση και σε σχέση με το συνολικό αριθμό λοιμώξεων με την ίδια εντόπιση.

**ΠΙΝΑΚΑΣ Δ4. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΠΟΛΥΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ  
ΜΕ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΟΥ VRE ΚΑΤΑ ΕΝΤΟΠΙΣΗ**

ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΛΟΙΜΩΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ (%) ΠΟΛΥ-ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ	ΣΥΝΟΛΟ
ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟ	5 (33,3%)	15
ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑ	8 (72,7%)	11
ΒΑΚΤΗΡΙΑΙΜΙΑ	2 (22,2%)	9
ΔΙΑΠΥΗΣΕΙΣ ΚΑΤΑΚΛΙΣΕΩΝ	4 (80%)	5
ΔΙΑΠΥΗΣΕΙΣ ΧΟΛΗΔΟΧΟΥ	3 (100%)	3
ΔΙΑΠΥΗΣΕΙΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΩΝ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ	2 (66,7%)	3
ΜΑΛΑΚΑ ΜΟΡΙΑ	2 (100%)	2
ΠΛΕΥΡΙΤΙΔΕΣ	1 (50%)	2
ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ	1 (50%)	2
ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΩΤΙΤΙΣ	1	1
ΕΙΣΟΔΟΣ ΦΛΕΒΟΚΑΘΕΤΗΡΑ	1	1
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>30 (55,6%)</b>	<b>54</b>

Ο πολυμικροβιακός χαρακτήρας της λοίμωξης έχει σχέση με την εντόπιση. Οι βακτηριαμιές και οι ουρολοιμώξεις είναι ως επί το πλείστον καθαρές λοιμώξεις από VRE, ενώ οι ενδοκοιλιακές λοιμώξεις και οι διαπυήσεις (κατακλίσεων, μαλακών μορίων, χειρουργικών τραυμάτων) είναι κατά κύριο λόγο πολυμικροβιακές.

Από τα μικρόβια που συμμετείχαν στις πολυμικροβιακές αυτές λοιμώξεις, επικρατούν τα gram αρνητικά βακτηρίδια: *Pseudomonas aeruginosa* (9 περιπτώσεις), *Acinetobacter baumannii* (7), *Klebsiella ssp* (7).

### **Δ. 5. Έκβαση**

Ο χαρακτηρισμός της τελικής έκβασης της λοίμωξης ήταν αρκετά δυσχερής, καθόσον η βαριά κατάσταση πολλών ασθενών ήταν συνέπεια της κύριας νόσου και του παθολογικού τους υποστρώματος. Έτσι σαν κριτήριο για τον χαρακτηρισμό της έκβαση ελήφθη κατά συνθήκη η επιβίωση του ασθενούς 30 ημέρες μετά την διάγνωση της λοίμωξης. Η έκβαση χαρακτηρίστηκε ως αρνητική στις περιπτώσεις που ο ασθενής είχε αποβιώσει στο διάστημα των 30 ημερών που ακολούθησαν και θετική στις περιπτώσεις που βρισκόταν εν ζωή 30 ημέρες μετά.

Με βάση αυτόν τον ορισμό θετική ήταν η έκβαση σε 33 (61,1%) περιπτώσεις, αρνητική σε 20 (37%) και άγνωστη σε 1 (0,9%) περίπτωση.

### **Δ. 6. Καταγραφή στελεχών**

#### **Δ. 6. α) Αρχικά στελέχη**

Στην παρούσα καταγραφή υπολογίσθηκαν μόνο τα στελέχη που απομονώθηκαν αρχικά κατά την διάγνωση της λοίμωξης. Τα αποτελέσματα αυτής της καταγραφής κατά είδος και τύπο αντοχής στα γλυκοπεπτίδια φαίνονται σχηματικά κατανεμημένα στο ΣΧΗΜΑ Δ2.

Η κατανομή κατά είδη των στελεχών αυτών έχει ως ακολούθως:

*E. faecium*, 41 (75,9%)

*E. faecalis*, 5 (9,3%)

*E. gallinarum*, 6 (11,1%)

*E. casseliflavus*, 2 (3,7%)

Τα αποτελέσματα από τον χαρακτηρισμό του τύπου αντοχής στα γλυκοπεπίδια ήταν τα εξής:

VanA, 41 (75,9%)

VanB, 5 (9,3%)

VanC1, 6 (11,1%)

VanC2/C3, 2 (3,7%)

Όλα τα στελέχη *E. faecalis* είχαν VanA τύπο αντοχής στα γλυκοπεπίδια, όλα τα *E. gallinarum* είχαν VanC1 και όλα τα *E. casseliflavus* VanC2/C3. Ο τύπος αντοχής VanB βρέθηκε μόνο σε 5 στελέχη *E. faecium*.

Στο ΣΧΗΜΑ Δ2, όπου παρουσιάζεται η ετήσια κατανομή των ειδών και τύπων αντοχής, φαίνεται ότι τα 3 από τα 5 στελέχη με VanB τύπο αντοχής απομονώθηκαν κατά την πρώτη περίοδο της συρροής κρουσμάτων κατά την οποία αυτός ο τύπος αντοχής ήταν ο επικρατέστερος. Μεταγενέστερα όμως παρατηρείται μείωση αυτού του τύπου και επικράτηση του VanA.

#### **Δ. 6. β) Πολλαπλές απομονώσεις από τον ίδιο ασθενή**

Σε 39 ασθενείς απομονώθηκε μόνο ένα στέλεχος, ή τα άλλα στελέχη που απομονώθηκαν χαρακτηρίστηκαν ως όμοια φαινοτυπικά και με μοριακές μεθόδους. Σε 15 όμως ασθενείς ακολούθησαν μεταγενέστερες απομονώσεις διαφορετικών στελεχών VRE από την ίδια θέση απομόνωσης του αρχικού στελέχους, ή και από διαφορετική θέση. Αυτά τα απομονωθέντα στελέχη διέφεραν από το αρχικό στέλεχος φαινοτυπικά και με μοριακές μεθόδους. Σε κάποιες περιπτώσεις διέφεραν ακόμα και ως προς το είδος και τον τύπο αντοχής στα γλυκοπεπίδια. Συνολικά απομονώθηκαν άλλα 19 στελέχη VRE.

#### **Δ. 7. Συμπεράσματα**

- Τα περιστατικά λοίμωξης από VRE κατά την τετραετία 2001-2004, μετά την αρχική συσσώρευση που παρατηρήθηκε τον πρώτο μήνα, παρουσιάζουν ενδημικό χαρακτήρα με αυξητική τάση.

- Ο μικρότερος αριθμός κρουσμάτων και η μικρότερη επίπτωση σημειώθηκαν κατά το έτος 2002, ενώ ο μεγαλύτερος το 2004. Η μέση τιμή επίπτωσης ήταν 0,221/1000 εισαγωγές, ή 0,061/1000 ημέρες νοσηλείας.
- Μεγαλύτερη αναλογία κρουσμάτων ανά 1000 εισαγόμενους ασθενείς παρουσιάζει η ΜΕΘ ενηλίκων και ακολουθούν η νεφρολογική και γαστρεντερολογική κλινική στον παθολογικό τομέα και η γενική χειρουργική στον χειρουργικό τομέα.
- Η συντριπτική πλειοψηφία (50/54) των περιπτώσεων είχε τον χαρακτήρα νοσοκομειακής λοίμωξης.
- Συχνότερη θέση λοίμωξης είναι το ουροποιητικό, 15/54 (27,8%) και ακολουθούν οι ενδοκοιλιακές φλεγμονές 11/54 (20,4%), ενώ οι βακτηριαιμίες είναι τρίτες σε συχνότητα 9/54 (16,6%).
- Τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των ασθενών είναι: η παρατεταμένη νοσηλεία, οι πολλές διακινήσεις εντός του νοσοκομείου με ιδιαίτερη έμφαση την μεταφορά από και προς την ΜΕΘ ενηλίκων, η παρουσία σοβαρής υποκείμενης νόσου, η διενέργεια χειρουργικής επέμβασης, η διενέργεια παρεμβατικών ιατρικών πράξεων και η χορήγηση αντιβιοτικών.
- Η παρουσία κακοήθειας (αιμοποιητικού-συμπαγείς όγκοι) και οι φλεγμονές ενδοκοιλιακών οργάνων (ρήξεις σπλάχνων-φλεγμονές χολής/παγκρέατος) σε αναλογία 29,6% και 25,9% αντίστοιχα, αποτελούν τους συχνότερες υποκείμενες νόσους.
- Στους περισσότερους ασθενείς η λοίμωξη ήταν πολυμικροβιακή με συμμετοχή κυρίως gram αρνητικών βακτηριδίων. Η πιθανότητα συμμετοχής και άλλων μικροβίων είναι μεγαλύτερη σε λοιμώξεις ενδοκοιλιακών οργάνων, κατακλίσεων και μαλακών μορίων και μικρότερη σε βακτηριαιμίες.

- Τα υπεύθυνα για την λοίμωξη στελέχη εντεροκόκκου ήταν καθ' υπεροχήν *E. faecium* και είχαν τύπο αντοχής VanA.
- Το 37% των ασθενών απεβίωσε κατά την διάρκεια των επόμενων 30 ημερών.



**ΠΙΝΑΚΑΣ Δ3. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ VRE ΣΤΟ ΠΑΓΝΗ ΚΑΤΑ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΑΣ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΟΤΗΤΑ ΕΚΑΣΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΤΕΤΡΑΕΤΙΑ 2001-2004**

<b>ΚΛΙΝΙΚΗ</b>	<b>VRE ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ Νο</b>	<b>ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΑΝΑ 1000 ΕΙΣΑΓΩΓΕΣ</b>	<b>ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΑΝΑ 1000 ΗΜΕΡΕΣ ΝΟΣΗΛΕΙΑΣ</b>	<b>Μ.Τ.Α.Ν.Η.</b>	<b>Μ.Δ.Ν. (ΗΜΕΡΕΣ)</b>
ΜΕΘ	8	3,844	0,576	9,6	6,67
ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΙΚΗ	7	1,062	0,211	23	5
ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΚΗ	6	2,266	0,369	11,3	6,14
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ	6	0,853	0,168	29,8	5,1
ΓΕΝ. ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ	5	0,641	0,095	36,6	6,75
ΠΑΘ. ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ	2	0,222	0,030	46,3	7,38
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ	2	0,300	0,058	23,8	5,14
ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ	1	0,074	0,017	41	4,39
ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ	1	0,293	0,038	18,1	7,65
ΓΕΝ. ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ	6	0,736	0,116	35,8	6,33
ΟΡΘΟΠΕΔΙΚΗ	4	0,491	0,067	41,75	7,39
ΧΕΙΡ. ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ	3	0,597	0,119	17,6	5,04
ΝΕΥΡΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ	1	0,538	0,053	13	10,11
ΠΑΙΔΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ	1	0,230	0,058	12	3,96
ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ	1	0,112	0,031	22,6	3,66
<b>ΣΥΝΟΛΟ*</b>	54	0,221*	0,061*	610*	3,59*

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Μ.Τ.Α.Ν.Η.: μέση τιμή αριθμού νοσηλευομένων ανά ημέρα, Μ.Δ.Ν.: μέση διάρκεια νοσηλείας, \* οι αριθμοί και οι δείκτες που δίνονται αναφέρονται στο σύνολο του νοσοκομείου.

## **E. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ**

### **E. 1. Γενική περιγραφή αποτελεσμάτων**

Τα αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας με την μέθοδο των δίσκων ήταν σε γενικές γραμμές σύμφωνα με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τον προσδιορισμό της MIC με την μέθοδο E- test, εκτός ελαχίστων παρεκκλίσεων που δεν μετέβαλλαν όμως ουσιαστικά την συνολική εικόνα των αντοχών.

Χάριν συντομίας παρουσιάζονται μόνο τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό της MIC με την μέθοδο E-test, ωστόσο το γεγονός της συμβατότητας των αποτελεσμάτων αυτών με εκείνα της μεθόδου διάχυσης των αντιβιοτικών σε δίσκους δείχνει ότι αυτή η τελευταία μέθοδος που είναι αρκετά εύχρηστη και γίνεται σε όλα τα μικροβιολογικά εργαστήρια, εφ' όσον εφαρμοσθεί με αυστηρή τήρηση των προβλεπόμενων προδιαγραφών, είναι ικανή να δώσει σημαντικές πληροφορίες για την αντοχή των εντεροκόκκων στα αντιβιοτικά.

Στελέχη του ίδιου είδους που απομονώθηκαν από τον ίδιο ασθενή και παρουσίαζαν τον ίδιο ακριβώς φαινότυπο αντοχής υπολογίσθηκαν μία φορά.

Τα αποτελέσματα ελέγχου της ευαισθησίας με τον προσδιορισμό των MICs από τα 14 αντιβιοτικά παρουσιάζονται κατά είδος εντεροκόκκου συγκεντρωτικά και συνοπτικά στους Πίνακες E5-8. Στον Πίνακα E9 παρουσιάζονται συνοπτικά αποτελέσματα του συνόλου των στελεχών., ενώ στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα στα 14 αντιβιοτικά για τα στελέχη που έφεραν επίκτητο μηχανισμό αντοχής στα γλυκοπεπίδια (φαινότυποι VanA, VanB).

### **E. 2. Αποτελέσματα κατά αντιβιοτικό**

Το υψηλότερο ποσοστό ευαισθησίας (100%) στο σύνολο των στελεχών παρουσιάζει η linezolid, η chloramphenicol (94,4%) επί του συνόλου και ακολουθούν tetracycline και rifampicin με 71,3 και 63,5% αντίστοιχα (Πίνακας

E9). Τα εν λόγω αντιβιοτικά δεν παρουσιάζουν επίσης ουσιαστικές διακυμάνσεις ως προς τα ποσοστά ευαισθησίας μεταξύ των διαφορετικών ειδών εντεροκόκκων (Πίνακες E5-E8).

Η penicillin και η ampicillin, με ποσοστό ευαισθησίας 60,9% και 62,7% αντίστοιχα επί του συνόλου, διαφοροποιούνται ουσιαστικά ανάλογα με το είδος των εντεροκόκκων. Είναι πολύ δραστικά στα είδη *E. gallinarum* και *E. casseliflavus*, αλλά στο είδος *E. faecium* το ποσοστό ευαισθησίας είναι μόνο 4,8% και 8,2%, αντίστοιχα (Πίνακες E5-E9).

Ανάλογα είναι και τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό αντοχής υψηλού επιπέδου στις αμινογλυκοσίδες (High Level Resistance-HLR).

Η αντοχή αυτή προσδιορίστηκε σε 45,3% και 23,3% επί του συνόλου για την streptomycin και την gentamicin αντίστοιχα, αλλά η διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών είναι τέτοια, ώστε για τα είδη *E. faecalis* και *E. faecium* η HLR στην streptomycin ανέρχεται σε 92% και 91,2% αντίστοιχα και στην gentamicin σε 88% και 44,2% αντίστοιχα (Πίνακες E5-E9). Αυτά τα επίπεδα αντοχών σε συνδυασμό με τα υψηλά ποσοστά αντοχών σε penicillin και ampicillin ουσιαστικά ακυρώνουν την δυνατότητα θεραπευτικής χορήγησης του συνδυασμού πενικιλίνης-αμινογλυκοσίδης.

Η erythromycin με ποσοστό ευαισθησίας 24,1% επί του συνόλου, αλλά με 0% για τα είδη *E. faecium*, *E. faecalis* και άλλα (Πίνακας E5-E9) αποδεικνύεται ελάχιστα χρήσιμη. Ομοίως και οι κινολόνες, norfloxacin και ciprofloxacin με ποσοστό ευαισθησίας 15,5% και 29,7% επί του συνόλου αντίστοιχα, αλλά 5,4% και 4,8% για *E. faecium* αντίστοιχα δεν προσφέρονται για θεραπευτική χρήση (Πίνακες E5, E9).

Η imipenem διαφοροποιείται σημαντικά μεταξύ των ειδών. Εμφανίζει ένα ποσοστό ευαισθησίας 60,6% επί του συνόλου, αλλά κυμαίνεται από 4,1% για το *E. faecium* σε 100% για το *E. casseliflavus* (Πίνακας E5-E9).

### **E. 3. Αποτελέσματα κατά είδος εντεροκόκκου**

Αναφορικά με την διαφοροποίηση της ανθεκτικότητας κατά είδος, το *E. faecium* αναδεικνύεται το πιο ανθεκτικό, αφού μόνο σε 2 αντιβιοτικά

(chloramphenicol, linezolid) εμφανίζεται ευαίσθητο σε αναλογία πάνω από 80% (Πίνακας E5). Η ομάδα *E. faecalis* και άλλα είδη σε 5 αντιβιοτικά (penicillin, ampicillin, chloramphenicol, imipenem, linezolid) εμφανίζει αναλογία ευαισθησίας πάνω από 80% ( Πίνακας E8). Σε 9 αντιβιοτικά (penicillin, ampicillin, tetracycline, chloramphenicol, imipenem, teicoplanin, linezolid, streptomycin-LLR και gentamicin -LLR) εμφανίζει αναλογία ευαισθησίας το *E. casseliflavus* και σε 10 αντιβιοτικά (penicillin, ampicillin, tetracycline, rifampicin, chloramphenicol, imipenem, teicoplanin, linezolid, streptomycin-LLR και gentamicin -LLR) το είδος *E. gallinarum* Πίνακες E6, E7).

#### **E. 4. Αποτελέσματα κατά φαινότυπο αντοχής**

Όταν έγινε ο χαρακτηρισμός του φαινότυπου αντοχής με βάση τα κριτήρια Arthur-Courvalin, ο συνολικός αριθμός των 373 στελεχών κατανεμήθηκε ως εξής: 118 στελέχη *E. faecium* VanA, 29 *E. faecium* VanB, 14 *E. faecalis* VanA, 5 *E. faecalis* VanB, 4 *E. avium* VanA, 2 *E. hirae* VanA, 173 *E. gallinarum* VanC, *E. gallinarum* VanA, 26 *E. casseliflavus* VanC, 1 *E. casseliflavus* VanA.

Όταν τα 174 στελέχη που διαθέτουν VanA, ή VanB τύπο αντοχής εξετασθούν μόνα τους σαν μια ξεχωριστή ομάδα, τότε τα αποτελέσματα που προκύπτουν διαφοροποιούνται ουσιαστικά έναντι του συνόλου. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στον πίνακα E10. Σε 11 από τα 14 αντιβιοτικά η αναλογία των ανθεκτικών στελεχών είναι  $\geq 50\%$  και σε 5 αντιβιοτικά ξεπερνά το 90%.

Ένα άλλο αποτέλεσμα είναι η διαπίστωση της παρουσίας στελεχών με συνδυασμένη αντοχή σε πολλαπλά αντιβιοτικά (multi-drug resistance). Πολύ-αντοχή σε 12 αντιβιοτικά παρουσίασαν 9 στελέχη *E. faecium* VanA, σε 11 αντιβιοτικά 41 στελέχη *E. faecium* VanA και 4 *E. faecium* VanB, και σε 10 αντιβιοτικά 18 *E. faecium* VanA, 18 *E. faecium* VanB, και 1 *E. faecalis* VanA.

## E. 5. Συμπεράσματα

- Ο έλεγχος ευαισθησίας των VRE στα αντιβιοτικά με την μέθοδο διάχυσης των αντιβιοτικών σε δίσκους έδωσε αποτελέσματα, τα οποία συγκρινόμενα με εκείνα του προσδιορισμού της MIC με την μέθοδο E-test, χαρακτηρίζονται από μεγάλη αξιοπιστία

- Μεγάλη διαφοροποίηση προκύπτει μεταξύ των διαφορετικών ειδών εντεροκόκκου, όσον αφορά το φάσμα αντοχών στα αντιβιοτικά. Έτσι, τα στελέχη VRE που διαθέτουν μόνο την φυσική αντοχή στην βανκομυκίνη (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens*) εμφανίζονται πολύ περισσότερο ευαίσθητα έναντι αυτών με επίκτητο μηχανισμό αντοχής.

- Το πιο ανθεκτικό είδος είναι το *E. faecium*.

- Το πιο δραστικό αντιβιοτικό αποδείχθηκε η λινεζολίδη με ποσοστό ευαισθησίας 100%.

- Δεύτερο σε δραστικότητα η χλωραμφενικόλη με ποσοστό ευαισθησίας 94,4% επί του συνόλου των στελεχών

- Ευαισθησία στην αμπικιλίνη ανιχνεύθηκε μόνο στο 20,1% των στελεχών με VanA/VanB τύπο αντοχής.

- Υψηλού επιπέδου αντοχή στην γενταμικίνη (HLR) είχε το 50% των στελεχών VanA/VanB, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν στελέχη *E. gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens* με HLR σε γενταμικίνη.

- Υψηλού επιπέδου αντοχή στην στρεπτομυκίνη είχε το 91,4% των VanA/VanB στελεχών, αλλά μόνο το 6,3% *E. gallinarum* και 3,7% *E. casseliflavus/flavescens*.

- Όλα τα στελέχη με VanA/VanB τύπο είχαν αντοχή στην ερυθρομυκίνη

- Τα ποσοστά ευαισθησίας των VanA/VanB στελεχών σε τετρακυκλίνη και ριφαμπικίνη ήταν 57,5% και 49,4% αντίστοιχα.
- Από τα 174 VanA/VanB στελέχη, τα 91 (52,3%) ήταν ανθεκτικά σε 10 ή περισσότερα αντιβιοτικά ταυτόχρονα.

**ΠΙΝΑΚΑΣ Ε5. ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ  
ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ 174 ΣΤΕΛΕΧΩΝ *E. FAECIUM* ΣΕ  
14 ANTIBIOTIKA**

<b>ANTIBIOTIKA</b>	<b>MIC50 (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>MIC90 (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>ΕΥΡΟΣ MICS (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>ΕΥΑΙΣΘ ΗΤΑ No (%)</b>	<b>ΜΕΤΡ. ΕΥΑΙΣΘ. No (%)</b>	<b>ΑΝΘΕΚ No (%)</b>
<b>Penicillin</b>	$\geq 256$	$\geq 256$	2 - $\geq$ 256	7 (4,8)	0	140 (95,2)
<b>Ampicillin</b>	128	$\geq 256$	0,25- $\geq$ 256	12 (8,2)	0	135 (91,8)
<b>Streptomycin</b>	> 1024	> 1024	8->1024	13 (8,8) LLR	0	134 (91,2) HLR
<b>Gentamicin</b>	64	>1024	4 - >1024	82 (55,8) LLR	0	65 (44,2)
<b>Tetracycline</b>	0,25	64	0,094- $\geq 256$	91 (61,9)	0	56 (38,1)
<b>Rifampicin</b>	4	$\geq 256$	$\leq 0,016$ - $\geq 256$	67 (45,6)	5 (3,4)	75 (51)
<b>Chloramphenicol</b>	3	16	1,5 - 48	129 (87,8)	13 (8,8)	5 (3,4)
<b>Erythromycin</b>	>256	>256	2 ->256	0	6 (4,1)	141 (95,9)
<b>Imipenem</b>	$\geq 32$	$\geq 32$	2 - $\geq 32$	6 (4,1)	1 (0,7)	140 (95,9)
<b>Norfloxacin</b>	$\geq 256$	$\geq 256$	1 - $\geq$ 256	8 (5,4)	9 (6,1)	130 (91,8)
<b>Ciprofloxacin</b>	$\geq 32$	$\geq 32$	0,19 - $\geq 32$	7 (4,8)	5 (3,4)	135 (91,8)
<b>Vancomycin</b>	$\geq 256$	$\geq 256$	8 - $\geq$ 256	0	0	147 (100)
<b>Teicoplanin</b>	24	128	0,125- $\geq$ 256	29 (19,7)	0	118 (80,3)
<b>Linezolid</b>	1,5	2	0,5-2	147 (100)	0	0

**ΠΙΝΑΚΑΣ Ε6. ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ  
ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ 174 ΣΤΕΛΕΧΩΝ *E. GALLINARUM* ΣΕ  
14 ANTIBIOTIKA**

ANTIBIOTIKA	MIC50 ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC90 ( $\mu\text{g/ml}$ )	ΕΥΡΟΣ MICS ( $\mu\text{g/ml}$ )	ΕΥΑΙΣΘ ΗΤΑ No (%)	ΜΕΤΡ. ΕΥΑΙΣΘ. No (%)	ΑΝΘΕΚ No (%)
<b>Penicillin</b>	1	1,5	0,094-16	172 (99)	0	2 (1)
<b>Ampicillin</b>	0,75	1,5	0,125-4	174 (100)	0	0
<b>Streptomycin</b>	24	32	8->1024	163 (93,7) LLR	0	11 (6,3) HLR
<b>Gentamicin</b>	8	12	2 - 128	174 (100) LLR	0	0
<b>Tetracycline</b>	0,5	32	0,094- >256	145 (83,3)	1 (0,6)	28 (16,1)
<b>Rifampicin</b>	0.008	6	>0,004- >256	143 (82,2)	2 (1,1)	29 (16,7)
<b>Chloramphenicol</b>	2	4	1-8	174 (100)	0	0
<b>Erythromycin</b>	0,5	1,5	0,125- >256	87 (50)	77 (44,3)	10 (50,7)
<b>Imipenem</b>	0,75	1.5	0,125- >32	173 (99,4)	0	1 (0,6)
<b>Norfloxacin</b>	8	16	1,5- >256	40 (23)	116 (66,7)	18 (10,3)
<b>Ciprofloxacin</b>	1	2	0,25 - >32	88 (50,6)	76 (43,7)	10 (5,7)
<b>Vancomycin</b>	6	8	4->256	0	173 (99,4)	1 (0,6)
<b>Teicoplanin</b>	0,5	0,75	0,125-24	173 (99,4)	0	1 (0,6)
<b>Linezolid</b>	1,5	2	0,75-2	174 (100)	0	0



**ΠΙΝΑΚΑΣ Ε7. ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ  
ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ 27 ΣΤΕΛΕΧΩΝ *E. CASSELIFLAVUS*  
ΣΕ 14 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ**

<b>ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ</b>	<b>MIC50 (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>MIC90 (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>ΕΥΡΟΣ MICS (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>ΕΥΑΙΣΘ ΗΤΑ No (%)</b>	<b>ΜΕΤΡ. ΕΥΑΙΣΘ. No (%)</b>	<b>ΑΝΘΕΚ No (%)</b>
<b>Penicillin</b>	0,38	1	0,19 - 1	27 (100)	0	0
<b>Ampicillin</b>	0,5	1	0,25 - 1	27 (100)	0	0
<b>Streptomycin</b>	24	32	8->1024	26 (96,3) LLR	0	1 (3,7) HLR
<b>Gentamicin</b>	8	8	2 - 16	27 (100) LLR	0	0
<b>Tetracycline</b>	0,5	32	0,19 - 48	23 (85,2)	0	4 (14,8)
<b>Rifampicin</b>	2	8	>0,016 16	9 (33,3)	6 (22,2)	12 (44,5)
<b>Chloramphenicol</b>	3	4	1,5 - 4	27 (100)	0	0
<b>Erythromycin</b>	4	8	0,25- >256	3 (11,1)	20 (74,1)	4 (14,8)
<b>Imipenem</b>	0,5	1	0,19 – 1,5	27 (100)	0	0
<b>Norfloxacin</b>	8	24	3 - >256	4 (14,8)	18 (66,7)	5 (18,5)
<b>Ciprofloxacin</b>	1,5	4	0,5 - >32	10 (37)	13 (48,2)	4 (14,8)
<b>Vancomycin</b>	6	8	4->256			
<b>Teicoplanin</b>	0,75	1,5	0,25-32	26 (96,3)	0	1 (3,7)
<b>Linezolid</b>	1,5	2	1 - 2	27 (100)	0	0

**ΠΙΝΑΚΑΣ Ε8. ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ  
ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ 25 ΣΤΕΛΕΧΩΝ *E. FAECALIS* ΚΑΙ  
ΑΛΛΩΝ ΕΙΔΩΝ ΣΕ 14 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ**

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	MIC50 ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC90 ( $\mu\text{g/ml}$ )	ΕΥΡΟΣ MICS ( $\mu\text{g/ml}$ )	ΕΥΑΙΣΘ ΗΤΑ No (%)	ΜΕΤΡ. ΕΥΑΙΣΘ. No (%)	ΑΝΘΕΚ No (%)
Penicillin	8	64	1 - $\geq 256$	21 (84)	0	4 (16)*
Ampicillin	1	16	0,5 - $\geq 256$	21 (84)	0	4 (16)*
Streptomycin	>1024	>1024	128 - >1024	2 (8) LLR	0	23 (92) HLR
Gentamicin	>1024	>1024	16 - >1024	3 (12) LLR	0	22 (88)
Tetracycline	24	64	0,19 - 128	7 (28)	0	18 (72)
Rifampicin	0,5	$\geq 32$	<0,016 - $\geq 32$	17 (68)	4 (16)	4 (16)
Chloramphenicol	4	12	2 - 16	22 (88)	3 (12)	0
Erythromycin	$\geq 256$	$\geq 256$	48 - $\geq 256$	0	0	25 (100)
Imipenem	2	8	1 - $\geq 32$	20 (80)	1 (4)	4 (20)*
Norfloxacin	$\geq 256$	$\geq 256$	1 - $\geq 256$	6 (24)	1 (4)	18 (72)
Ciprofloxacin	$\geq 32$	$\geq 32$	0,25 - $\geq 32$	6 (24)	1 (4)	18 (72)
Vancomycin	$\geq 256$	$\geq 256$	8 - >256	0	0	25 (100)
Teicoplanin	24	128	0,25-24	5 (20)	0	20 (80)
Linezolid	1,5	2	0,5-2	25 (100)	0	0

\* Τα 4 αναφερόμενα στελέχη είναι *E. avium*.

**ΠΙΝΑΚΑΣ Ε9. ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ  
ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ 373 ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE ΣΤΑ 14  
ANTIBIOTIKA**

ANTIBIOTIKA	MIC50 ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC90 ( $\mu\text{g/ml}$ )	ΕΥΡΟΣ MICS ( $\mu\text{g/ml}$ )	ΕΥΑΙΣΘ HTA No (%)	ΜΕΤΡ. ΕΥΑΙΣΘ. No (%)	ΑΝΘΕΚ No (%)
<b>Penicillin</b>	1,5	$\geq 256$	0,125 - $\geq 256$	227 (60,9)	0	146 (39,1)
<b>Ampicillin</b>	1,5	$\geq 256$	0,125- $\geq$ 256	234 (62,70)	0	139 (37,3)
<b>Streptomycin</b>	48	$> 1024$	8->1024	204 (54,7) LLR	0	169 (45,3) HLR
<b>Gentamicin</b>	12	$>1024$	4 - $>1024$	286 (76,7) LLR	0	87 (23,3) HLR
<b>Tetracycline</b>	0,5	48	0,094- $\geq 256$	266 (71,3)	1 (0,3)	106 (28,4)
<b>Rifampicin</b>	$\leq 0,016$	$\geq 32$	$\leq 0,016$ - $\geq 32$	237 (63,5)	17 (4,6)	119 (31,9)
<b>Chloramphenicol</b>	3	4	1 - 48	352 (94,4)	16 (4,3)	5 (1,3)
<b>Erythromycin</b>	0,5	$\geq 256$	0,125 - $\geq 256$	90 (24,1)	103 (27,6)	180 (48,3)
<b>Imipenem</b>	1,5	$\geq 32$	0,19 - $\geq$ 32	226 (60,6)	2 (10,5)	145 (38,9)
<b>Norfloxacin</b>	12	$\geq 256$	1 - $\geq$ 256	58 (15,5)	144 (38,6)	171 (45,9)
<b>Ciprofloxacin</b>	8	$\geq 32$	0,19 - $\geq 32$	11 (29,7)	95 (25,5)	167 (44,8)
<b>Vancomycin</b>	8	$\geq 256$	6 - $\geq$ 256	0	209 (56) LLR	164 (44) HLR
<b>Teicoplanin</b>	0,75	16	0,125 - $\geq 256$	233 (62,5)	0	140 (37,5)
<b>Linezolid</b>	1,5	2	0,5-2	373 (100)	0	0

**ΠΙΝΑΚΑΣ Ε10. ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ  
ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ 174 ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE ΜΕ VanA Η  
VanB ΤΥΠΟ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΑ**

<b>ANTIBIOTIKA</b>	<b>MIC50 (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>MIC90 (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>ΕΥΡΟΣ MICS (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>ΕΥΑΙΣΘ ΗΤΑ No (%)</b>	<b>ΜΕΤΡ. ΕΥΑΙΣΘ. No (%)</b>	<b>ΑΝΘΕΚ No (%)</b>
<b>Penicillin</b>	$\geq 256$	$\geq 256$	0,25 - $\geq 256$	31(17,8)	0	143 (82,2)
<b>Ampicillin</b>	128	$\geq 256$	0,25- $\geq 256$	35 (20,1)	0	139 (79,9)
<b>Streptomycin</b>	>1024	> 1024	8->1024	15 (8,6) LLR	0	159 (91,4) HLR
<b>Gentamicin</b>	128	>1024	8 - >1024	87 (50) LLR	0	87 (50) HLR
<b>Tetracycline</b>	0,25	64	0,094- $\geq 256$	100 (57,5)	0	74 (42,5)
<b>Rifampicin</b>	2	$\geq 32$	$\leq 0,016$ - $\geq 32$	86 (49,4)	9 (5,2)	79 (45,4)
<b>Chloramphenicol</b>	3	12	1,5 - 48	153 (87,9)	16 (9,2)	5 (2,9)
<b>Erythromycin</b>	$\geq 256$	$\geq 256$	2 - $\geq 256$	0	6 (3,4)	168 (96,6)
<b>Imipenem</b>	$\geq 32$	$\geq 32$	0,25 - $\geq 32$	28 (16,1)	2 (1,1)	144 (82,8)
<b>Norfloxacin</b>	$\geq 256$	$\geq 256$	1 - $\geq 256$	15 (8,6)	11 (6,3)	148 (85,1)
<b>Ciprofloxacin</b>	$\geq 32$	$\geq 32$	0,19 - $\geq 32$	14 (8)	6 (3,5)	154 (88,5)
<b>Vancomycin</b>	$\geq 256$	$\geq 256$	8 - $\geq 256$	0	10 (6,7)	164 (94,3)
<b>Teicoplanin</b>	24	128	0,125 - $\geq 256$	34 (19,5)	0	140 (80,5)
<b>Linezolid</b>	1,5	2	0,5-2	174 (100)	0	0

## ΣΤ. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗΝ BANKOMYΚΙΝΗ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ MULTIPLEX PCR

### ΣΤ. 1. Αποτελέσματα

Τα 7 ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, ειδικά για τους γόνους *rrs*, *vanC2/C3*, *ddl<sub>E. faecium</sub>*, *vanC1*, *ddl<sub>E. faecalis</sub>*, *vanB* και *VanA* έδωσαν τα αναμενόμενα προϊόντα μεγέθους 320, 484, 658, 822, 941, 1032, και 1727bp αντίστοιχα. Τρεις ξεχωριστές ζώνες έδωσαν τα στελέχη *E. faecium* και *E. faecalis*, μία που αντιστοιχούσε στην παρουσία του γονιδίου *rrs*, μία που αντιστοιχούσε στο είδος (*ddl<sub>E. faecium</sub>*, *ddl<sub>E. faecalis</sub>*) και μία που αντιστοιχούσε στην παρουσία του γονιδίου αντοχής (*vanA*, *vanB*). Τα στελέχη *E. gallinarum* και *E. casseliflavus/flavescens* έδωσαν δύο ζώνες, μία για τον γόνο *rrs* και μία χαρακτηριστική του είδους που είναι ταυτόχρονα και χαρακτηριστική του τύπου αντοχής (*vanC1* και *vanC2/C3* αντίστοιχα).

Η εικόνα που εμφανίζεται μετά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της multiplex PCR στο gel αγαρόζης φαίνεται στην εικόνα ΣΤ1.

Η ανάλυση των στελεχών με multiplex PCR επιβεβαίωσε την τυποποίηση με συμβατικές μεθόδους και τον φαινοτυπικό χαρακτηρισμό της αντοχής. Καταλυτικό ήταν το αποτέλεσμα στις εξής περιπτώσεις:

- σε ένα στέλεχος *E. faecium vanB* που, ενώ η ταυτοποίησή του με συμβατικές μεθόδους ήταν *E. faecium*, η οριακή τιμή της MIC στην βανκομυκίνη (16μg/ml) έθετε τον προβληματισμό της διαφορικής διάγνωσης από ακίνητα στελέχη *E. gallinarum*
- σε δύο ακίνητα στελέχη *E. gallinarum* που, ενώ έφεραν τα υπόλοιπα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του είδους, η αρνητική δοκιμασία κινητικότητας έθετε τον προβληματισμό της ορθής ταυτοποίησης
- σε 15 κινητά στελέχη που, το ασαφές αποτέλεσμα της δοκιμασίας παραγωγής χρωστικής δεν κατέστησε δυνατό το διαχωρισμό των *E. casseliflavus* από *E. gallinarum*

- σε ένα στέλεχος *E. gallinarum* και ένα στέλεχος *E. casseliflavus* που αμφότερα παρουσίαζαν αντοχή υψηλού επιπέδου σε βανκομυκίνη και αντοχή σε τεϊκοπλανίνη και με την multiplex PCR αποδείχθη ότι, πέραν από τα γονίδια τα χαρακτηριστικά της φυσικής αντοχής του είδους στην βανκομυκίνη (*vanC1* και *vanC2/C3* αντίστοιχα), διέθεταν και τον χαρακτηριστικό *vanA* γονότυπο
- σε 4 στελέχη *E. avium* και 2 στελέχη *E. hiraе* που η PCR έδειξε ότι δεν ανήκαν σε κανένα από τα είδη *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* και *E. casseliflavus/flavescens* ενώ παράλληλα διέθεταν τον γονότυπο *vanA*.

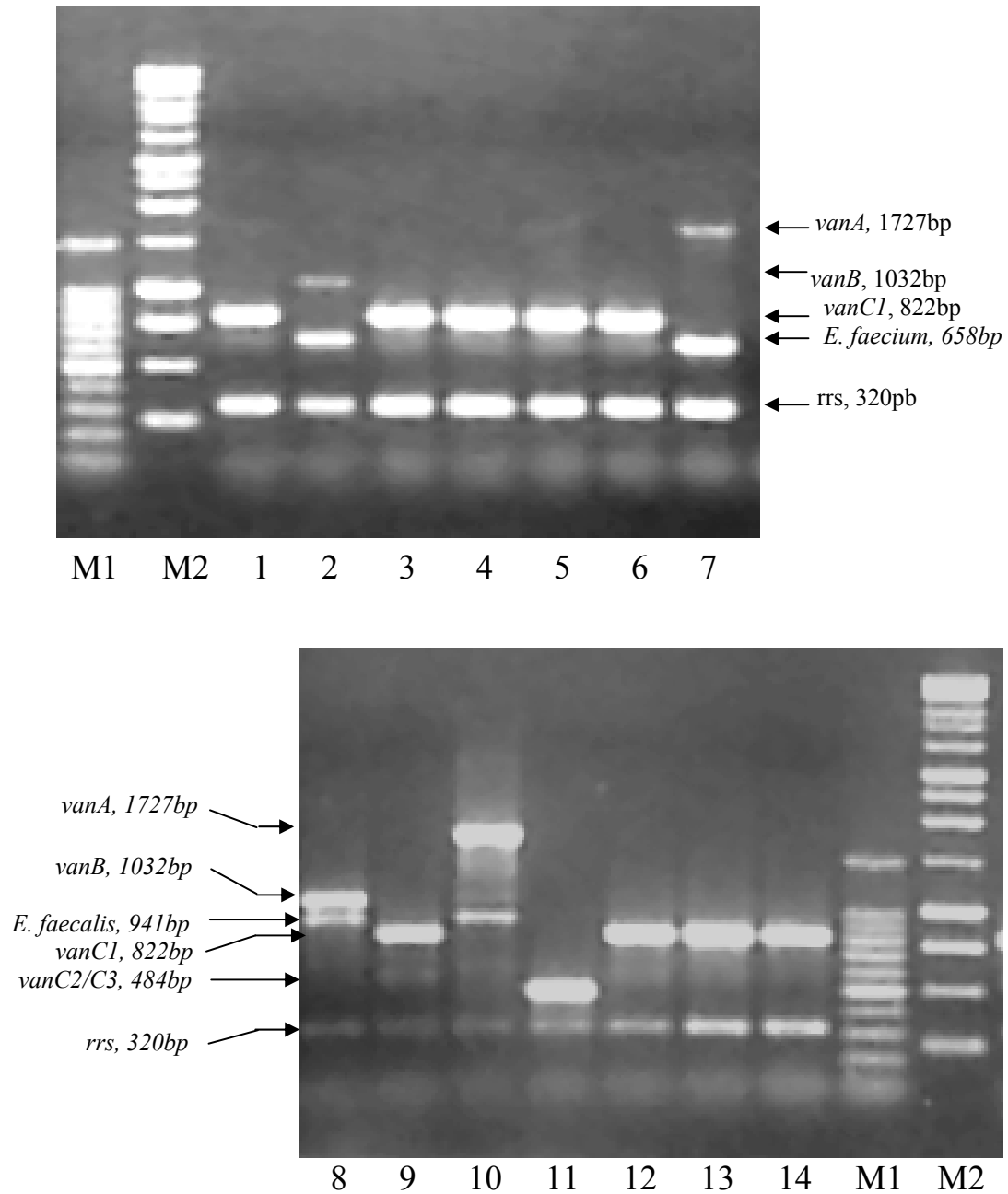
Τα αποτελέσματα της ανάλυσης συνολικά και η κατανομή των στελεχών σε είδος και τύπο αντοχής παρουσιάζονται στον πίνακα ΣΤ2.

## ΣΤ. 2. Αξιολόγηση αποτελεσμάτων

- Η multiplex PCR, που χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό των γονότυπων αντοχής των στελεχών VRE, με την χρήση 7 ζευγών primers σε μία αντίδραση, αποτελεί σημαντικό διαγνωστικό μέσο για την ταυτόχρονη ανίχνευση διαφορετικών γόνων στο ίδιο μικροβιακό στέλεχος.
- Τα αποτελέσματα της μεθόδου συνήθως επιβεβαιώνουν την φαινοτυπική ταυτοποίηση του είδους και τον χαρακτηρισμό του φαινότυπου αντοχής στα γλυκοπεπτίδια, εφ' όσον αυτά γίνουν με ακριβή και προσεκτική χρήση των συμβατικών μεθόδων ταυτοποίησης και χαρακτηρισμού του φαινότυπου αντοχής.
- Ο χαρακτηρισμός του γονότυπου αντοχής με μέθοδο μοριακής ανίχνευσης (PCR) είναι απαραίτητος στις κάτωθι περιπτώσεις
  1. για την διαφορική διάγνωση του VanB φαινότυπου από τον VanC.

2. για την ταυτοποίηση των ειδών με φαινότυπο VanC (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens*), με την ανίχνευση των αντίστοιχων γονότυπων *vanC1*, *vanC2/C3*.
3. για την ταυτοποίηση των ειδών *E. faecium* και *E. faecalis*, με ανίχνευση των αντίστοιχων γόνων που είναι χαρακτηριστικά του είδους
4. για την διερεύνηση του ενδεχόμενου να συνυπάρχει και επίκτητος μηχανισμός αντοχής στα γλυκοπεπτίδια (VanA/VanB) σε στελέχη με φυσική αντοχή στην βανκομυκίνη (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*).

**ΣΧΗΜΑ ΣΤ1. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΕΣΗ ΣΕ ΑΓΑΡΟΖΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ MULTIPLEX PCR ΣΕ VRE ΣΤΕΛΕΧΗ.**



ΣΗΜΕΙΩΣΗ. 7: *E. faecium vanA*, 2: *E. faecium vanB*, 10: *E. faecalis vanA*, 8: *E. faecalis vanB*, 1, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 13, 14: *E. gallinarum vanC1*, 11: *E. casseliflavus/flavescens vanC2/C3*, M1: δείκτης DNA 100-bp, M2: δείκτης DNA 1-Kb.



**ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΤ2. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΤΑ ΕΙΔΟΣ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΟ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗΝ BANKOMYΚΙΝΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ MULTIPLEX PCR**

<b>ΕΙΔΟΣ</b>	<b>HPA-1</b>	<b>HPA-2</b>	<b>XA-1</b>	<b>XA-1</b>	<b>ΠΤ-1</b>	<b>ΘΕΣ-1</b>	<b>ΘΕΣ-2</b>	<b>ΙΩ-1</b>	<b>ΣΥΝ</b>
<i>E. faecium vanA</i>	69	13			29	3	2	2	118
<i>E. faecium vanB</i>	28	1							29
<i>E. faecalis vanA</i>	10	2			1	1			14
<i>E. faecalis vanB</i>	4	1							5
<i>E. gallinarum vanC1</i>	60	59	8	10	4	31	1		173
<i>E. gallinarum vanC1 + vanA</i>					1				1
<i>E. cass./flav. vanC2/C3</i>	11	7	1	2	1	2	1	1	26
<i>E. cass./flav. vanC2/C3 + vanA</i>					1				1
<i>E. avium vanA</i>	4								4
<i>E. hirae vanA</i>	1				1				2
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	187	83	9	12	38	37	4	3	373

## **Z. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΣΕ ΠΑΛΛΟΜΕΝΟ ΠΕΔΙΟ (PFGE)**

### **Z. 1. Γενική περιγραφή αποτελεσμάτων**

Από την ανάλυση των στελεχών με PFGE προέκυψε μια ευρεία διασπορά αυτών σε πολλαπλά PFGE patterns. Αυτή η διασπορά ήταν εμφανής σε όλα τα νοσοκομεία και σε όλα τα είδη που μελετήθηκαν. Τα αναλυτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα Z2.

Τα 98 στελέχη *E. faecium vanA* κατανεμήθηκαν σε 51 ομάδες τα 11 στελέχη *E. faecium vanB* σε 5, τα 4 στελέχη *E. faecalis vanA* σε 4 ομάδες, τα 4 στελέχη *E. anium vanA* σε 3 ομάδες και από ένα ξεχωριστό pattern έδωσαν έκαστο των στελεχών *E. gallinarum vanA*, *E. casseliflavus vanA*, *E. hiraе vanA*. Τα 66 αυτά ξεχωριστά patterns παρουσιάζονται στο ΣΧΗΜΑ Z1.

Ο αριθμός των στελεχών των προερχόμενων από τα νοσοκομεία ΘΕΣ-1, ΘΕΣ-2 και ΙΩ-1 είναι μικρός (3, 3 και 2 αντίστοιχα ) και δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα πλην της παρατήρησης ότι τα patterns που έδωσαν ήταν μοναδικά για καθένα από αυτά και δεν προέκυψαν από στελέχη άλλων νοσοκομείων.

### **Z. 2. Αποτελέσματα κατά νοσοκομείο**

Από τα στελέχη του νοσοκομείου ΠΤ-1 προέκυψαν 19 ξεχωριστά patterns που δεν δόθηκαν από στελέχη άλλων νοσοκομείων. Τα 28 στελέχη *E. faecium vanA* κατανεμήθηκαν σε 15 ομάδες, δύο εκ των οποίων συγκέντρωσαν 7 και 4 στελέχη αντίστοιχα.

Στο νοσοκομείο ΗΡΑ-2 τα 15 στελέχη κατανεμήθηκαν σε 5 ομάδες, όμως 10 (77%) από τα 13 στελέχη *E. faecium vanA* βρέθηκαν στην ίδια ομάδα.

Στο νοσοκομείο ΗΡΑ-1, τα 65 στελέχη που μελετήθηκαν κατανεμήθηκαν σε 37 ομάδες με ξεχωριστό PFGE pattern σε κάθε μία. Τα 49 στελέχη *E. faecium vanA* κατανεμήθηκαν σε 27 ομάδες, δύο εκ των οποίων συσώρευσαν

11(22,4%) και 8 (16,3%) στελέχη αντίστοιχα. Τα 10 στελέχη *E. faecium vanB* κατανεμήθηκαν σε 5 ομάδες μία εκ των οποίων συγκέντρωσε 6 (60%) από αυτά.

Τα νοσοκομεία HPA-1 και HPA-2 που βρίσκονται στην ίδια πόλη είναι τα μόνα νοσοκομεία που στελέχη τους κατανεμήθηκαν σε κοινές ομάδες. Δύο ήταν οι κοινές ομάδες που συμπεριέλαβαν στελέχη αμφοτέρων των νοσοκομείων. Η πιο σημαντική συσσώρευση παρατηρήθηκε στην ομάδα 17 η οποία συγκέντρωσε το 77% των στελεχών *E. faecium vanA* στο HPA-2 και το 16,3% στο HPA-1.

### **Z. 3. αποτελέσματα στελεχών απομονωθέντων από τον ίδιο ασθενή**

Ανάμεσα στα στελέχη που μελετήθηκαν υπήρχαν 5 στελέχη του ίδιου είδους και γονότυπου αντοχής που απομονώθηκαν από τον ίδιο ασθενή και 7 ζεύγη στελεχών που απομονώθηκαν από ισάριθμους ασθενείς. Όλα αυτά τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *E. faecium* και έφεραν *vanA* γονότυπο αντοχής. Τα χαρακτηριστικά αυτών των στελεχών φαίνονται στον πίνακα Z3. Στον εν λόγω πίνακα εμφανίζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου αντοχής στα αντιβιοτικά στα οποία διαφοροποιούνται. Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά (πενικιλίνη, αμπικιλίνη, ερυθρομυκίνη, νορφλοξασίνη, σιπροφλοξασίνη, ιμιπενέμη και βανκομυκίνη) όλα τα στελέχη ήταν ανθεκτικά.

Τα 5 διαφορετικά στελέχη *E. faecium vanA* που απομονώθηκαν από τον ασθενή 1 όχι μόνο ταξινομήθηκαν σε διαφορετικές ομάδες με την ανάλυση PFGE, αλλά παρουσίασαν επίσης διαφορετική εικόνα αντοχής στα αντιβιοτικά. Αμφότερα τα στελέχη κάθε ζεύγους στελεχών που απομονώθηκαν από τους ασθενείς 7 και 8, ταξινομήθηκαν στην ίδια ομάδα PFGE, αλλά και παρουσίασαν την ίδια εικόνα αντοχής στα αντιβιοτικά. Στους ασθενείς 3, 4, και 5 μολονότι αμφότερα τα στελέχη κάθε ζεύγους παρουσίασαν την ίδια εικόνα αντοχής στα αντιβιοτικά, με την ανάλυση PFGE κατετάγησαν σε διαφορετικές ομάδες. Τέλος στους ασθενείς 2 και 6 τα στελέχη κάθε ζεύγους διέφεραν μεταξύ τους ως προς την εικόνα αντοχής στα αντιβιοτικά και κατετάγησαν σε διαφορετικές ομάδες.

#### **Z. 4. Συσχέτιση των προτύπων (pattern) που προέκυψαν από την PFGE ανάλυση**

Μελετώντας τις συγγένειες μεταξύ των διαφορετικών προτύπων (patterns) έγιναν ορισμένες παρατηρήσεις. Από τα στελέχη της Α΄ περιόδου (18/12/00-1/2/2001) αναλύθηκαν με PFGE όλα τα στελέχη *E. faecium vanA*. Από μία ασθενή (την πρώτη με *E. faecium vanA*) απομονώθηκαν 5 διαφορετικά στελέχη σε διαφορετικές χρονικές στιγμές που έδωσαν 5 διαφορετικά PFGE patterns. Τα τρίτο κατά σειρά απομόνωσης στέλεχος διέφερε από το πρώτο κατά 3 θραύσματα, το τέταρτο κατά 6 θραύσματα και το τρίτο με το τέταρτο κατά 6 θραύσματα. Το δεύτερο ήταν ανόμοιο γενετικά με το αρχικό, όμως διέφερε από το πέμπτο κατά 3 θραύσματα. Συγγενές γενετικά με το πέμπτο κατά σειρά απομόνωσης στέλεχος αυτής της ασθενούς ήταν και ένα στέλεχος απομονωθέν κατά την πρώτη μελέτη επιπολασμού από ασθενή της μονάδας τεχνητού νεφρού-MTN (διαφορά κατά 1 θραύσμα).

Στα τέσσερα ζεύγη στελεχών που απομονώθηκαν από ισάριθμους ασθενείς και με την PFGE ανάλυση έκαστο του ζεύγους κατετάγη σε διαφορετική ομάδα, η ανά ζεύγη σύγκριση των διαφορετικών προτύπων (patterns) έδειξε ότι τα κοινά θραύσματα ήταν λιγότερο από το 50% κι έτσι χαρακτηρίστηκαν ως μη σχετιζόμενα γενετικά.

Από τα στελέχη του HPA-1 της δευτέρας περιόδου (δεύτερη μελέτη επιπολασμού-σποραδικά ενδημικά κρούσματα) παρατηρείται συσσώρευση στελεχών σε 2 ομάδες. Το pattern της πρώτης σε αριθμό στελεχών ομάδας (group 12) δεν παρουσιάζει κάποια αξιοσημείωτη συγγένεια με κανένα άλλο pattern. Όμως το pattern της δεύτερης σε αριθμό στελεχών ομάδας συσσώρευσης (group 17) που συγκέντρωσε 8 στελέχη, παρουσιάζει στενή συγγένεια (διαφορά κατά  $\leq 3$  θραύσματα) με το pattern τριών άλλων ομάδων (group 14, 18, 27) που συγκεντρώνουν συνολικά άλλα 5 στελέχη και σχετική συγγένεια (διαφορά κατά 4-6 θραύσματα) με το πρότυπο άλλων 2 απομονωθέντων στελεχών (group 28, 29).

Στο νοσοκομείο ΠΤ-1 το πρότυπο της πρώτης σε αριθμό στελεχών ομάδος (group 37) που συγκεντρώνει 7 στελέχη, παρουσιάζει στενή συγγένεια με το πρότυπο άλλων 5 ομάδων (group 33, 35, 36, 38 και 39) που συγκεντρώνουν συνολικά 9 στελέχη.

## **Z. 5. Χωροταξική και χρονική κατανομή στελεχών με κοινό πρότυπο ανάλυσης**

Κάθε μία από τις 4 ομάδες PFGE που συσώρευσαν ένα σημαντικό αριθμό στελεχών με κοινό πρότυπο μελετήθηκε ως προς την χωροταξική κατανομή και την χρονική κατανομή των στελεχών της.

Η ομάδα 37 συγκέντρωσε 7 στελέχη *E. faecium vanA* απομονωθέντα από ασθενείς αποικισμένους από VRE στο νοσοκομείο ΠΤ-1. Οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζονται κατανεμημένοι σε 4 διαφορετικές κλινικές και η δειγματοληψία για την απομόνωση έγινε την ίδια ημέρα (1/11/2002) στα πλαίσια της πολυκεντρικής μελέτης επιπολασμού. Επομένως υπάρχει χρονική σύμπτωση αλλά παρουσιάζονται διεσπαρμένα μέσα στο νοσοκομείο.

Η ομάδα 54 συγκέντρωσε 7 στελέχη *E. faecium vanB* που απομονώθηκαν από ισάριθμους ασθενείς που βρέθηκαν αποικισμένοι στο νοσοκομείο ΗΡΑ-1 και ένα στέλεχος *E. faecium vanB* από αποικισμένο ασθενή του νοσοκομείου ΗΡΑ-2. Όλα τα στελέχη ήταν ταυτόσημα χρονικά γιατί απομονώθηκαν στις 1/11/2002 στα πλαίσια της πολυκεντρικής μελέτης. Αν εξαιρεθεί το στέλεχος του ΗΡΑ-2 και ένα στέλεχος του ΗΡΑ-1 που απομονώθηκε από ασθενή της εντατικής μονάδας παιδών τα υπόλοιπα 6 στελέχη απομονώθηκαν από ασθενείς της αιματολογικής κλινικής, της συστεγαζόμενης με αυτήν νεφρολογικής κλινικής και της σχετιζόμενης με αυτήν μονάδας τεχνητού νεφρού. Επομένως υπάρχει χωροταξική συσχέτιση και η εν λόγω ομάδα θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ομάδα του συμπλέγματος Αιματολογικής-Νεφρολογικής κλινικής. Είναι όμως χαρακτηριστικό ότι αυτή η ομάδα δεν επανεμφανίζεται μεταγενέστερα.

Μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ομάδες 12 και 17. Η χωροταξική και χρονική τους κατανομή στο νοσοκομείο HPA-1 παρουσιάζεται σχηματικά στο ΣΧΗΜΑ Ζ2.

Η ομάδα 12 συγκεντρώνει 11 στελέχη *E. faecium vanA* και είναι αποκλειστικά ομάδα του HPA-1. Στελέχη της εμφανίζονται για πρώτη φορά στο νοσοκομείο στις 1/11/2002 στα πλαίσια της πολυκεντρικής μελέτης. Θα μπορούσε και αυτή να αποδοθεί στο σύμπλεγμα Αιματολογικής-Νεφρολογικής αφού, με εξαίρεση ένα στέλεχος στην Γαστρεντερολογική, τα υπόλοιπα απομονώνονται στην αιματολογική κλινική και στην μονάδα τεχνητού νεφρού. Στελέχη της ομάδας αυτής επανεμφανίζονται 4 μήνες αργότερα και μέσα σε διάστημα 20 ημερών δίνουν 4 κρούσματα λοίμωξης από VRE σε ισάριθμους ασθενείς, 1 στην Γαστρεντερολογική και 3 στην Α΄ Παθολογική. Δεδομένου ότι ένα από τα κρούσματα της Α΄ Παθολογικής είχε προηγούμενα νοσηλευθεί στην Γαστρεντερολογική, πιθανόν να αποτέλεσε την οδό μεταφοράς. Γεγονός πάντως είναι ότι αυτά τα κρούσματα συνδέονται στο χώρο και στον χρόνο. Στο 9μηνο που ακολούθησε δεν επανεμφανίστηκαν στελέχη αυτής της ομάδας.

Η ομάδα 17 είναι η πολυπληθέστερη ομάδα. Συγκεντρώνει συνολικά 18 στελέχη *E. faecium vanA*. Τα 10 από αυτά απομονώνονται στο νοσοκομείο HPA-2 κατά την πολυκεντρική μελέτη στις 1/11/2002. Είναι διασκορπισμένα σε 6 κλινικές αυτού του νοσοκομείου, όμως 4 από αυτά συσσωρεύονται στην μονάδα τεχνητού νεφρού του HPA-2. Θα μπορούσε να χαρακτηριστεί και ως το ενδημικό στέλεχος του HPA-2 (Βενιζελείου). Όμως την ίδια χρονική στιγμή, στα πλαίσια του πολυκεντρικής μελέτης, 2 στελέχη της ίδιας ομάδας απομονώνεται και από 2 αποικισμένους ασθενείς σε διαφορετικές κλινικές στο HPA-1. Στο 15μηνο που ακολουθεί 5 κρούσματα λοίμωξης από VRE στο HPA-1 αποδίδονται σε ισάριθμα στελέχη της ομάδας αυτής. Τα κρούσματα αυτά είναι απλωμένα σε βάθος χρόνου και τα περισσότερα εξ αυτών εντοπίζονται στο σύμπλεγμα αιματολογικής-νεφρολογικής κλινικής. Ως εκ τούτου η μοριακή διερεύνηση της επιδημιολογίας του VRE παρουσιάζει πολλές δυσκολίες λόγω της μεγάλης διαφοροποίησης των στελεχών.

## Z. 6. Αξιολόγηση ευρημάτων

- Η ανάλυση των στελεχών VRE με PFGE έδειξε μεγάλη ετερογένεια μεταξύ, όχι μόνο των στελεχών που προέρχονταν από διαφορετικά νοσοκομεία, αλλά και των στελεχών που προέρχονταν από το ίδιο νοσοκομείο
- Από τα δύο νοσοκομεία του Ηρακλείου, HPA-1 και HPA-2, απομονώθηκαν στελέχη που έδωσαν το ίδιο PFGE πρότυπο, επομένως μπορούν να χαρακτηρισθούν ως προερχόμενα από τον ίδιο κλώνο.
- Το νοσοκομείο HPA-2 (Βενιζέλειο) παρουσίασε την μεγαλύτερη συσσώρευση στελεχών σε κοινό PFGE πρότυπο.
- Στο νοσοκομείο ΠΤ-1 παρουσιάσθηκαν μικρές συσσωρεύσεις σε κοινά PFGE πρότυπα και συγγένειες σε profile διαφορετικών προτύπων, αλλά η εικόνα της πολυκλωνικότητας ήταν εμφανής.
- Στο νοσοκομείο HPA-1 (ΠΑΓΝΗ), εκτός από τα στελέχη τα απομονωθέντα κατά την πολυκεντρική μελέτη, αναλύθηκαν και στελέχη απομονωθέντα καθ' όλη την διάρκεια της παρουσίας του VRE στο νοσοκομείο.
- Τα στελέχη της πρώτης περιόδου του ΠΑΓΝΗ παρουσιάζουν διαφορετικό PFGE πρότυπο και κανένα από αυτά δεν εμφανίζεται μεταγενέστερα.
- Στελέχη με κοινό PFGE πρότυπο εντοπίζονται κυρίως σε ασθενείς του συμπλέγματος αιματολογικής-νεφρολογικής-MTN, που φαίνεται να λειτουργεί σαν εστία διατήρησης και διασποράς αυτών.
- Στελέχη απομονωθέντα από τον ίδιο ασθενή παρουσίασαν διαφορετικά PFGE πρότυπα με κορυφαία την περίπτωση του

ασθενούς ΠΕΡ Γ, όπου 5 διαφορετικά απομονωθέντα στελέχη *E. faecium vanA* παρουσίασαν 5 διαφορετικά PFGE πρότυπα.

- Τα στελέχη *E. faecium vanB* παρουσιάζουν μεγαλύτερη συσσώρευση σε κοινό PFGE πρότυπο, όμως εξαφανίζονται από το νοσοκομείο.

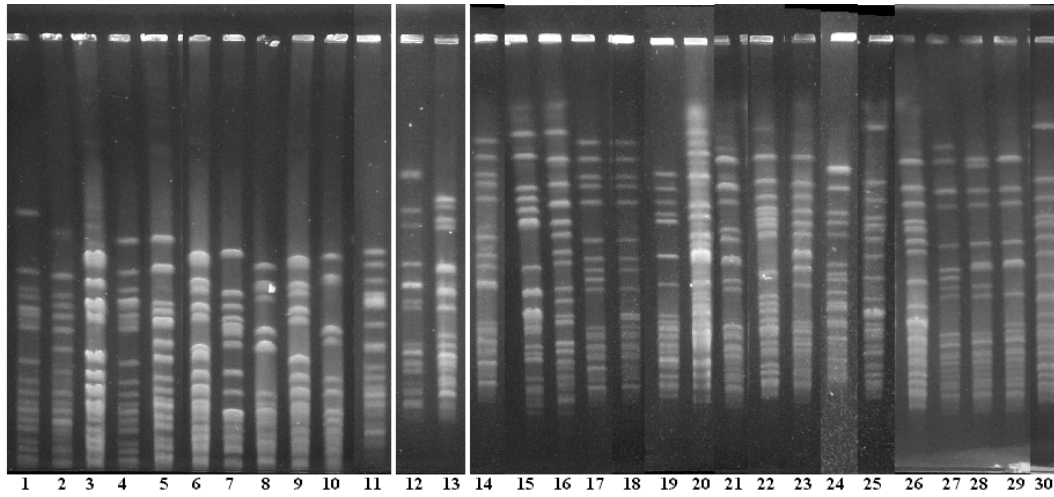


**ΠΙΝΑΚΑΣ Ζ1. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ  
ΚΑΤΑ ΕΙΔΟΣ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΟ ΑΝΤΟΧΗΣ**

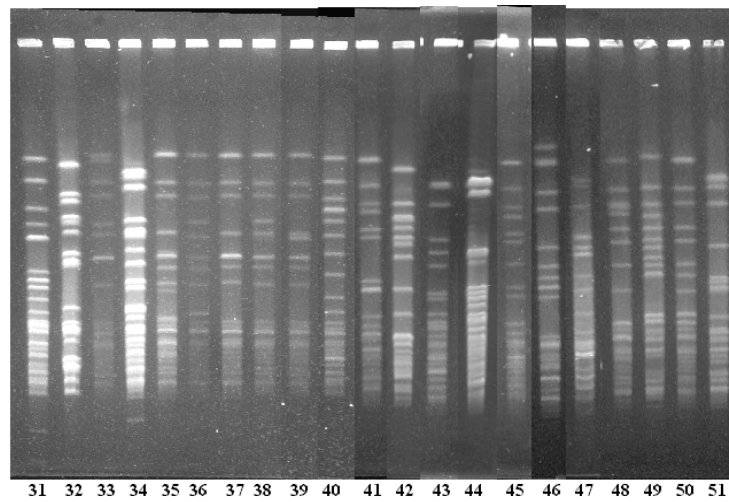
<b>ΕΙΔΟΣ</b>	<b>ΗΡΑ- 1</b>	<b>ΗΡΑ- 2</b>	<b>ΠΤ-1</b>	<b>ΘΕΣ- 1</b>	<b>ΘΕΣ- 2</b>	<b>ΙΩ- 1</b>	<b>ΣΥΝ</b>
<i>E. faecium vanA</i>	49	13	29	3	2	2	98
<i>E. faecium vanB</i>	10	1					11
<i>E. faecalis vanA</i>	1	1	1		1		4
<i>E. gallinarum vanA</i>			1				1
<i>E. casseliflavus vanA</i>			1				1
<i>E. avium vanA</i>	4						4
<i>E. hirae vanA</i>	1						1
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	65	15	32	3	3	2	120

**ΣΧΗΜΑ Ζ1. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ (PATTERNS) ΜΕΤΑ  
ΑΠΟ PFGE ΑΝΑΛΥΣΗ VRE ΣΤΕΛΕΧΩΝ**

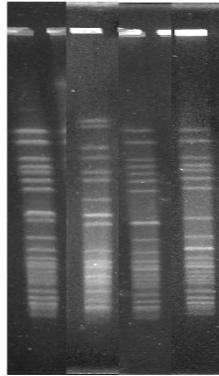
*E. FAECIUM vanA*



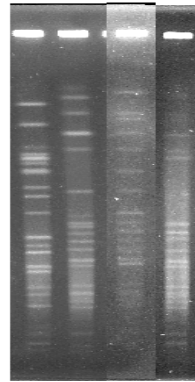
*E. FAECIUM vanA*



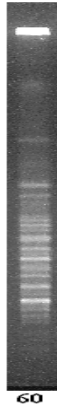
***E. faecium* VanB**



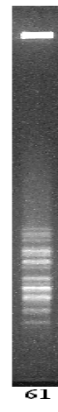
***E. faecalis* VanA**



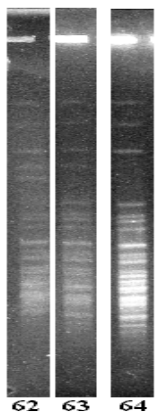
***E. casseliflavus* VanA**



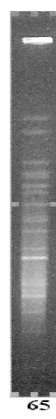
***E. gallinarum* VanA**



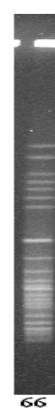
***E. avium* VanA**



***E. durans* VanA**



***E. durans* VanB**



**ΠΙΝΑΚΑΣ Ζ2. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΟΜΑΔΕΣ ΜΕ PFGE  
ΑΝΑΛΥΣΗ 120 ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE**

PFGE pattern	ΑΡΙΘ Μ.ΣΤ ΕΛΕΧ ΩΝ	ΕΙΔΟΣ	HPA-1	HPA-2	ΠΤ-1	ΘΕΣ-1	ΘΕΣ-2	ΙΟ-1
1	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
2	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
3	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
4	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
5	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
6	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
7	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
8	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
9	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
10	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
11	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
12	11	<i>E. faecium VanA</i>	11					
13	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
14	3	<i>E. faecium VanA</i>	3					
15	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
16	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
17	18	<i>E. faecium VanA</i>	8	10				
18	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
19	1	<i>E. faecium VanA</i>			1			
20	1	<i>E. faecium VanA</i>			1			
21	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
22	2	<i>E. faecium VanA</i>	2					
23	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
24	1	<i>E. faecium VanA</i>			1			
25	2	<i>E. faecium VanA</i>	2					
26	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
27	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
28	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
29	1	<i>E. faecium VanA</i>	1					
30	2	<i>E. faecium VanA</i>	2					
31	1	<i>E. faecium VanA</i>			1			
32	1	<i>E. faecium VanA</i>			1			
33	2	<i>E. faecium VanA</i>			2			
34	1	<i>E. faecium VanA</i>			1			
35	1	<i>E. faecium VanA</i>			1			
36	2	<i>E. faecium VanA</i>			2			
37	7	<i>E. faecium VanA</i>			7			
38	2	<i>E. faecium VanA</i>			2			
39	2	<i>E. faecium VanA</i>			2			
40	4	<i>E. faecium VanA</i>			4			

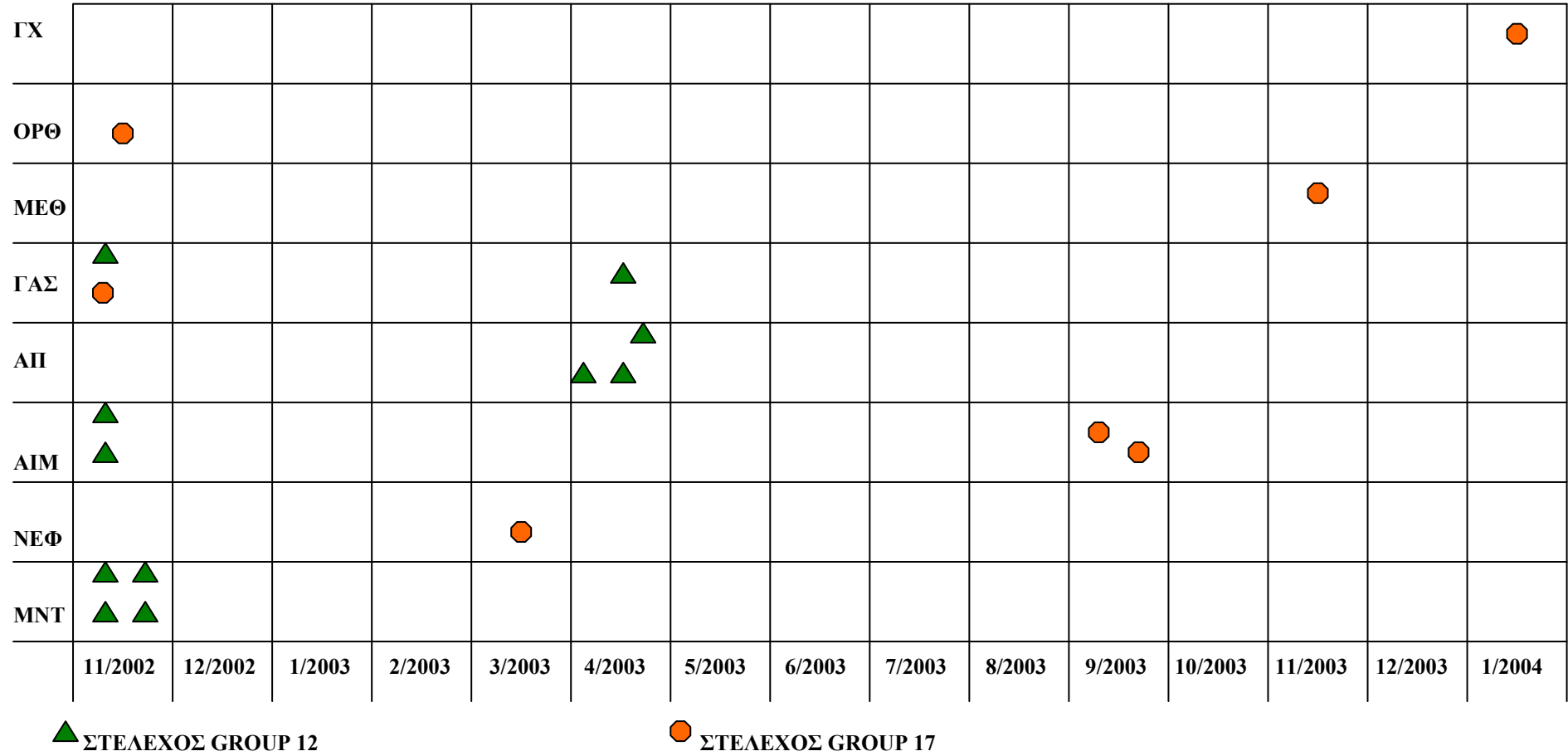
41	1	<i>E. faecium VanA</i>			1			
42	2	<i>E. faecium VanA</i>		2				
43	1	<i>E. faecium VanA</i>			1			
44	1	<i>E. faecium VanA</i>			1			
45	2	<i>E. faecium VanA</i>				2		
46	1	<i>E. faecium VanA</i>		1				
47	1	<i>E. faecium VanA</i>				1		
48	1	<i>E. faecium VanA</i>						1
49	1	<i>E. faecium VanA</i>						1
50	1	<i>E. faecium VanA</i>					1	
51	1	<i>E. faecium VanA</i>					1	
52	1	<i>E. faecium VanB</i>	1					
53	1	<i>E. faecium VanB</i>	1					
54	7	<i>E. faecium VanB</i>	6	1				
55	1	<i>E. faecium VanB</i>	1					
66	1	<i>E. faecium VanB</i>	1					
56	1	<i>E. faecalis VanA</i>					1	
57	1	<i>E. faecalis VanA</i>	1					
58	1	<i>E. faecalis VanA</i>			1			
59	1	<i>E. faecalis VanA</i>		1				
60	1	<i>E. casseliflavus VanA</i>			1			
61	1	<i>E. gallinarum VanA</i>			1			
62	1	<i>E. avium VanA</i>	1					
63	2	<i>E. avium VanA</i>	2					
64	1	<i>E. avium VanA</i>	1					
65	1	<i>E. hirae VanA</i>	1					

**ΠΙΝΑΚΑΣ Ζ3. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΑΣΘΕΝΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΘΕΝΤΩΝ ΜΕ PFGE**

Α/Α	ΚΩΔ ΣΤΕΛ	ΑΣΘΕΝ	ΚΛΙΝΙΚΗ	ΘΕΣΗ	Η/Α	PFGE ΟΜΑΔΑ	ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ					
							STR	GM	TE	RA	CHL	TEC (MIC, µg/ml)
1	3	ΣΚ ΜΑ	ΜΕΘ	ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΟ	5/1/2001	1	HLR	HLR	S	R	I	>256
	5β	ΣΚ ΜΑ	ΜΕΘ	ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΚΟ	9/1/2001	3	HLR	HLR	R	R	R	>256
	17	ΣΚ ΜΑ	ΜΕΘ	ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΚΟ	11/1/2001	5	HLR	LLR	S	R	S	128
	10	ΣΚ ΜΑ	ΜΕΘ	ΚΑΤΑΚΛΙΣΕΙΣ	31/1/2001	4	HLR	LLR	R	R	R	32
	21	ΣΚ ΜΑ	ΜΕΘ	ΚΟΠΡΑΝΑ	31/1/2001	6	HLR	HLR	R	R	R	>256
2	278	ΣΠ ΑΝ	ΝΕΦΡ	ΟΥΡΑ	10/3/2003	17	HLR	HLR	R	S	S	24
	281	ΣΠ ΑΝ	ΓΕΝ ΠΑΘ	ΚΟΠΡΑΝΑ	6/4/2003	12	HLR	HLR	S	R	S	32
3	279	ΜΗ ΓΙ	ΠΟΓΚ	ΟΥΡΑ	29/3/2003	21	HLR	LLR	S	S	S	6
	342	ΜΗ ΓΙ	ΠΟΓΚ	ΚΟΠΡΑΝΑ	8/4/03	27	HLR	LLR	S	S	S	6
4	382	ΠΩ ΔΑ	ΓΕΝ ΠΑΘ	ΑΙΜΑ	11/4/2003	12	HLR	LLR	S	R	S	24
	343	ΠΩ ΔΑ	ΓΕΝ ΠΑ	ΚΟΠΡΑΝΑ	17/4/03	28	HLR	LLR	S	R	S	24
5	283	ΚΑ ΑΓ	ΓΑΣΤΡ	ΑΙΜΑ	21/4/2003	12	HLR	LLR	S	S	S	16
	344	ΚΑ ΑΓ	ΓΑΣΤΡ	ΚΑΘΕΤΗΡ	23/4/2003	29	HLR	LLR	S	S	S	12
6	320	ΑΝ ΑΙ	ΓΑΣΤΡ	ΚΟΠΡΑΝΑ	30/4/2003	22	HLR	HLR	S	R	S	16
	328	ΑΝ ΑΙ	ΓΑΣΤΡ	ΚΟΠΡΑΝΑ	30/5/2003	14	HLR	LLR	R	S	S	24
7	337	ΚΑ ΧΑ	ΑΙΜ	ΟΥΡΑ	20/9/2003	17	HLR	HLR	R	S	S	16
	345	ΚΑ ΧΑ	ΝΕΦΡ	ΟΥΡΑ	23/9/2003	17	HLR	HLR	R	S	S	16
8	339	ΡΟ ΕΒ	ΜΕΘ	ΠΥΩΔΕΣ ΠΕΡ	6/11/2003	25	HLR	HLR	S	R	S	32
	340	ΡΟ ΕΒ	ΜΕΘ	ΚΑΘ ΠΑΡΟΧ	6/11/2003	25	HLR	HLR	S	R	S	32

ΣΗΜΕΙΩΣΗ. STR, Streptomycin; GM, Gentamicin; TE, Tetracycline; RA, Rifampicin; CHL, Chloramphenicol; TEC, Teicoplanin; HLR: αντοχή υψηλού επιπέδου, LLR: αντοχή χαμηλού επιπέδου, S: ευαισθησία, R: αντοχή, I: ενδιάμεση αντοχή.

ΣΧΗΜΑ Ζ2. ΧΩΡΟΤΑΞΙΚΗ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΔΥΟ ΕΠΙΚΡΑΤΕΣΤΕΡΩΝ PFGG PATTERNS ΣΤΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΗΡΑ-1 (ΠΕΠΑΓΝΗ)



## **ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ**

### **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

- A. Πρώτη εμφάνιση (διεθνής εμπειρία)**
  - B. Πρώτη επιδημιολογική μελέτη επιπολασμού του VRE στο ΠΑΓΝΗ.**
  - Γ. Πολυκεντρική μελέτη επιπολασμού του VRE σε ελληνικά νοσοκομεία.**
  - Δ. Λοιμώξεις από VRE**
  - Ε. Φάσμα αντοχών στελεχών VRE σε άλλα αντιβιοτικά.**
  - ΣΤ. 1. Μοριακός χαρακτηρισμός του γονότυπου αντοχής-multiplex PCR**
  - Z. Μοριακή διερεύνηση της επιδημιολογίας του VRE**
- Επίλογος**



## A. ΠΡΩΤΗ ΕΜΦΑΝΙΣΗ (ΔΙΕΘΝΗΣ ΕΜΠΕΙΡΙΑ)

Ο συνηθέστερος τρόπος εμφάνισης του VRE σε ένα νοσοκομείο είναι με μορφή επιδημίας. Άλλωστε, η πρώτη περιγραφείσα εμφάνιση εντεροκόκκου ανθεκτικού στην βανκομυκίνη είχε επιδημικό χαρακτήρα. Οι Uttley και συντο 1988 (Dulwich Public Health Laboratory and the Antibiotics Reference Laboratory at Colindale) περιέγραψαν μια επιδημία σε μονάδα τεχνητού νεφρού που αφορούσε 22 ασθενείς και 55 απομονωθέντα στελέχη σε διάρκεια 12 μηνών (311).

Αλλά και η δεύτερη αναφορά από την Γαλλία αφορούσε επιδημία, αυτή την φορά σε μονάδα αιματολογική (187).

Στις ΗΠΑ, η εμφάνιση του VRE χαρακτηρίζεται από διασπορά και πρόκληση επιδημιών σε νοσοκομεία (56, 143, 257, 263), άλλοτε από στελέχη με VanA τύπο αντοχής (276) και άλλοτε από VanB (257).

Η επιδημία από VRE μπορεί να είναι μονοκλωνική, ή πολυκλωνική. Όμως και στην περίπτωση της πολυκλωνικότητας, ανευρίσκονται εστίες μονοκλωνικής διασποράς, δηλαδή τμήματα στα οποία ένας κλώνος έχει διασπαρεί (168). Σε άλλη περίπτωση η πολυκλωνικότητα οφείλεται σε αρχική είσοδο ενός στελέχους το οποίο αρχικά διασπείρεται κάθετα, αλλά ταυτόχρονα με οριζόντια μεταφορά των γόνων αντοχής, τα ενδημικά στελέχη που μέχρι τότε ήταν ευαίσθητα, καθίστανται ανθεκτικά (169).

Έχει όμως περιγραφεί και ένα άλλο πρότυπο επιδημίας, που χαρακτηρίζεται από την βαθμιαία μετάβαση από έναν γονότυπο αντοχής (*vanB*) σε άλλον (*vanA*). Σύμφωνα με αυτήν την περιγραφή, κατά την διάρκεια μιας επιδημίας από *E. faecium vanB*, εμφανίζονται στελέχη με άλλο γονότυπο αντοχής (*vanA*), που όμως κατατάσσονται στην ίδια ομάδα κατά την PFGE ανάλυση, δηλαδή πρόκειται για στελέχη από τον ίδιο κλώνο. Παράλληλα, απομονώνεται στέλεχος που φέρει και τους δύο γόνους αντοχής (*vanA* και *vanB*). Το στέλεχος αυτό, κατά την PFGE ανάλυση, κατατάσσεται στην ίδια ομάδα με τα προηγούμενα, δηλαδή προέρχεται και αυτό από τον ίδιο κλώνο. Αυτό το εύρημα οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι ο γονότυπος *vanA*

πέρασε στο επιδημικό στέλεχος κατά την διάρκεια της επιδημίας και οδήγησε στην μεταστροφή του τύπου αντοχής (335).

Άλλοτε, η πρώτη εμφάνιση του VRE σε ένα νοσοκομείο γίνεται με την μορφή πρόκλησης μεμονωμένων σποραδικών κρουσμάτων. Στη συνέχεια ο VRE καθίστανται ενδημικός, προκαλώντας ολοένα αυξανόμενο αριθμό κρουσμάτων, που μπορεί να παρουσιάζουν περιστασιακά, χρονική, ή και τοπική συρροή (22). Έτσι μπορεί να καταλήξει σε μια πολυκλωνική ενδημία, ή ακόμη και να προκαλέσει επιδημία σε κάποια χρονική στιγμή (147).

Στην δική μας περίπτωση, ο VRE έκανε γνωστή την παρουσία του με έναν αρκετά εντυπωσιακό τρόπο, προκαλώντας ένα άθροισμα από 5 κρούσματα λοίμωξης σε διάρκεια ενός μήνα. Αυτή η αρχική συσσώρευση κρουσμάτων είναι η μεγαλύτερη που παρατηρήθηκε καθ' όλη την τετραετή (2001-2004) παρουσία του VRE. Θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως επιδημία, αν τα απομονωθέντα στελέχη είχαν τον ίδιο τύπο αντοχής. Το γεγονός ότι τα απομονωθέντα από τους ασθενείς στελέχη έφεραν διαφορετικούς γονότυπους αντοχής (3 ασθενείς με *vanB* και 2 με *vanA*) και ταυτοποιήθηκαν σε διαφορετικά είδη (4 ασθενείς με *E. faecium* και 1 με *E. faecalis*) έδειχνε ότι υπήρχε ήδη μια ποικιλομορφία στελεχών. Άλλωστε, εκτός από δύο ασθενείς, οι υπόλοιποι δεν είχαν καμία σχέση μεταξύ τους. Αλλά, και οι δύο αυτοί ασθενείς, που νοσηλεύτηκαν το ίδιο χρονικό διάστημα στην μονάδα, νόσησαν από στελέχη με διαφορετικό τύπο αντοχής (VanA ο ένας και VanB ο άλλος). Τέλος, κατά την PFGE ανάλυση, τα απομονωθέντα στελέχη έδωσαν διαφορετική εικόνα και επομένως δεν σχετίζονταν μεταξύ τους γενετικά.

## **B. ΠΡΩΤΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ ΤΟΥ VRE ΣΤΟ ΠΑΓΝΗ**

Η πρώτη επιδημιολογική μελέτη επιπολασμού για αποικισμό του εντέρου των νοσηλευόμενων ασθενών του νοσοκομείου, που έλαβε χώρα 40 μέρες από την διάγνωση του πρώτου περιστατικού λοίμωξης και αφού ο VRE είχε εκδηλώσει την παρουσία του, με την μορφή ενός αθροίσματος 5

περιστατικών διασπαρμένων στο νοσοκομείο, κατόρθωσε να δώσει μία απεικόνιση της πραγματικότητας που κρύβονταν κάτω από την επιφάνεια.

Όπως ήταν αναμενόμενο, βρέθηκε μια διασπορά στελεχών σε τμήματα του νοσοκομείου, κατ' αναλογία με την διασπορά των κρουσμάτων. Ο υψηλότερος επιπολασμός (50%) βρέθηκε στο τμήμα (ΜΕΘ), όπου είχαν σημειωθεί τα 2 από τα 5 κρούσματα λοίμωξης.

Μία άλλη πτυχή του προβλήματος είναι η κατανομή των φαινότυπων αντοχής στα γλυκοπεπτίδια. Ο φαινότυπος VanB είχε μεγαλύτερη τιμή επιπολασμού (3,2%) και ευρύτερη διασπορά στο νοσοκομείο έναντι του VanA που είχε τιμή επιπολασμού (1,8%) και εντόπιση μόνο σε δύο τμήματα (ΜΕΘ και ΜΤΝ). Αυτή η κατανομή σε φαινότυπους αντοχής είναι σε απόλυτα συμβατή με την κατανομή σε φαινότυπους αντοχής των στελεχών που απομονώθηκαν από τους ασθενείς με λοίμωξη, αφού και τα στελέχη που απομονώθηκαν σε 3 από τους 5 ασθενείς έφεραν VanB φαινότυπο. Άλλωστε το πρώτο περιστατικό προκλήθηκε από στέλεχος με φαινότυπο VanB.

Εύλογα προκύπτει η εξήγηση, ότι πριν από την αποκάλυψη της παρουσίας του VRE, είχε προηγηθεί διασπορά στελεχών στο νοσοκομείο που πιθανόν να προέκυψε από διαφορετικές εστίες, αφού, και η επιδημιολογική διερεύνηση, και η διερεύνηση με μοριακές μεθόδους, δεν έδειξαν συσχέτιση μεταξύ των στελεχών.

Η αύξηση της χρήσης της βανκομυκίνης στο ΠΑΓΝΗ από 137 DDD/patient-day το 1998 σε 271 DDD/patient-day το 2000 (σχεδόν στο διπλάσιο), πιθανόν συνέβαλε στην εγκατάσταση, αύξηση της διασποράς και τελική εκδήλωση της παρουσίας των ανθεκτικών στην βανκομυκίνη εντεροκόκκων.

Μετά από την πρώτη αυτή περίοδο, ακολουθεί ένα διάστημα 21 μηνών που χαρακτηρίζεται από ύφεση. Στο διάστημα αυτό σημειώνονται 4 σποραδικά κρούσματα εκ των οποίων τα 2 οφείλονται σε *E. gallinarum*. Η πιθανότερη ερμηνεία γι' αυτήν την ύφεση είναι η παρέμβαση της επιτροπής νοσοκομειακών λοιμώξεων, που εφαρμόζοντας τις προτεινόμενες οδηγίες και αξιοποιώντας την διεθνή εμπειρία από την εφαρμογή των μέτρων

περιορισμού της εξάπλωσης του VRE, ανέκοψε την προδιαγεγραμμένη πορεία του προς μία πολυκλωνική επιδημία και τον υποχρέωσε σε μια χαμηλή ενδημία με ελάχιστο αριθμό σποραδικών κρουσμάτων.

## **Γ. ΠΟΛΥΚΕΝΤΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ ΤΟΥ VRE ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑ.**

### **Γ. 1. Επιπολασμός-συσχέτιση με διεθνή δεδομένα**

Όταν αποφασίστηκε η διεξαγωγή της πολυκεντρικής μελέτης, υπήρχαν ήδη δημοσιευμένες αναφορές για απομόνωση στελεχών VRE σε ελληνικά νοσοκομεία (77, 202). Η πολυκεντρική μελέτη αποσκοπούσε, στο να απεικονίσει, στην δεδομένη χρονική στιγμή (1<sup>η</sup> Νοεμβρίου 2002), την έκταση και τα χαρακτηριστικά της διασποράς του VRE, καθώς και τους παράγοντες κινδύνου για αποικισμό, σε μια ευρύτερη κλίμακα μέσα στην χώρα. Τα νοσοκομεία που συμμετείχαν είναι διασπαρμένα σε όλη την ελληνική επικράτεια. Συμπεριλαμβάνονται μικρά νοσοκομεία (δυναμικότητας <200 κλινών), μεγάλα περιφερειακά και μεγάλα πανεπιστημιακά, ώστε το αποτέλεσμα να είναι όσο το δυνατόν αντιπροσωπευτικό.

Η αυστηρή τήρηση κοινού πρωτοκόλλου και η χρησιμοποίηση ενός εργαστηρίου, ως εργαστήριο αναφοράς για την διερεύνηση των απομονωθέντων στελεχών, αποσκοπούσε στην ομοιογένεια της μεθοδολογίας και την δυνατότητα εξαγωγής αθροιστικών αποτελεσμάτων.

Υπολογίζοντας το σύνολο των απομονωθέντων στελεχών, η συχνότητα επιπολασμού της αποίκησης του VRE ανέρχεται σε αρκετά υψηλά επίπεδα (20,5%). Ακόμα και μετά την εξαίρεση των στελεχών που διέθεταν μόνο φυσική αντοχή (VanC1, VanC2/C3), η συχνότητα επιπολασμού για τα στελέχη με επίκτητο μηχανισμό αντοχής (VanA, VanB) ήταν σημαντική (7,5%).

Οι τιμές αυτές συγκρινόμενες με τις τιμές αντίστοιχων μελετών σε άλλες χώρες και με όλους τους περιορισμούς της μεθοδολογίας κρίνονται σημαντικές, αλλά όχι ιδιαίτερα ανησυχητικές.

Η σύγκριση με τα αποτελέσματα άλλων μελετών παρουσιάζει αρκετούς περιορισμούς λόγω των διαφορών στην μεθοδολογία. Τέτοιες διαφορές εντοπίζονται στο μέγεθος του δείγματος, στην επιλογή του δείγματος (συνχά ελέγχονται συγκεκριμένες ομάδες ασθενών σε εξειδικευμένα κέντρα, όπως νεφροπαθείς, μεταμοσχευθέντες, ογκολογικοί ασθενείς, κ.α.), η χρονική διάρκεια της έρευνας (σημειακή μελέτη επιπολασμού, ή μελέτη που διεξάγεται σε βάθος χρόνου) και η μεθοδολογία καλλιέργειας (είδος καλλιεργητικού υλικού, συγκέντρωση βανκομυκίνης, προσθήκη άλλων αντιβιοτικών, εμπλουτισμός). Μια άλλη δυσκολία είναι ο τρόπος παρουσίασης και ανάλυσης των αποτελεσμάτων. Σε άλλες μελέτες συμπεριλαμβάνονται και συνυπολογίζονται και τα στελέχη με φαινότυπο VanC, ενώ σε άλλες εξαιρούνται.

Παρά τις ανωτέρω δυσκολίες, θα επιχειρηθεί μία σύγκριση των ευρημάτων της παρούσης μελέτης με τα διεθνή δεδομένα.

Αντίστοιχη μελέτη (point prevalence study) σε γενικό νοσοκομείο του Βελγίου που διεξήχθη στις 22 και 23 Νοεμβρίου 1993 έδειξε ότι 3,5% των νοσηλευόμενων ασθενών ήταν φορείς VRE (132). Σε μελέτη επιπολασμού που διεξήχθη στην Ολλανδία (Νοέμβριος 1995-Φεβρουάριος 1996) σε 624 ασθενείς νοσηλευόμενους σε 9 νοσοκομεία και 200 άτομα της κοινότητας, μη νοσηλευόμενα σε νοσοκομείο, βρέθηκε η ίδια συχνότητα επιπολασμού (2%) και στις δύο ομάδες πληθυσμού (102). Ανάλογη μελέτη που διεξήχθη σε νοσοκομείο του Βελγίου στις 21 Μαΐου 1996 έδειξε ότι ο επιπολασμός του VRE ήταν 12,8%. Όμως η πλειοψηφία των απομονωθέντων στελεχών ήταν στελέχη με φαινότυπο VanC. Ενδιαφέρον εύρημα αυτής της μελέτης είναι η σημασία της μεθόδου καλλιέργειας για εντοπισμό της παρουσίας VRE στα κόπρανα. Με απ' ευθείας εμβολιασμό σε στερεό υλικό προσδιορίσθηκε το 53,4% των φορέων, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό αποκαλύφθηκε μετά από εμπλουτισμό σε ζωμό (157). Σε νοσοκομείο της

Γλασκόβης στη Σκωτία, μελέτη που διεξήχθη για διάστημα 30 μηνών (Φεβρουάριος 1996-Ιούλιος 1998) έδειξε συχνότητα φορέων 1,4% (239). Στην περιοχή Λιμόζ στην Γαλλία διεξήχθη μελέτη επιπολασμού στα κόπρανα νοσηλευομένων στο νοσοκομείο και σε ομάδα υγιών μη νοσηλευομένων ατόμων. Η μελέτη είχε διάρκεια 7 μηνών, από Μάρτιο ως Σεπτέμβριο 1997. Συνολικά 37% των νοσηλευομένων ασθενών και 11,8% των ατόμων της κοινότητας βρέθηκαν αποικισμένοι από VRE. Αν εξαιρεθούν τα στελέχη με *vanC1*, ή *vanC2* τότε ο επιπολασμός διαμορφώνεται σε 8,6% για τους ασθενείς του νοσοκομείου και 1,8% για τα άτομα της κοινότητας (123). Την ίδια εποχή που διεξάγονται αυτές οι μελέτες έλαβε χώρα και μία πανευρωπαϊκή μελέτη από 1<sup>ης</sup> Ιανουαρίου έως 1<sup>ης</sup> Απριλίου 1997, που περιέλαβε 49 εργαστήρια από 27 χώρες, μεταξύ των οποίων και από την χώρα μας. Η τιμή επιπολασμού, κατά την μελέτη αυτή, για το σύνολο των τύπων αντοχής ήταν 2,2%, ενώ μόνο για τους VanA/VanB ήταν 0,5%. Στην χώρα μας δεν εντοπίστηκαν καθόλου VRE (289). Χρονικά ταυτόσημη με την δική μας, είναι η μελέτη επιπολασμού που διεξήχθη από τον Μάρτιο του 2001 ως τον Ιούνιο του 2001 σε 13 νοσοκομεία 8 Ευρωπαϊκών χωρών από την ομάδα Goosens και συν. Στην μελέτη αυτή, που δεν υπήρχε Ελληνική συμμετοχή, ο επιπολασμός του VRE στα κόπρανα προσδιορίστηκε στο 3,5% των ασθενών χωρίς όμως να υπολογισθούν τα στελέχη VanC (129).

Παρόλο που η πρώτη μελέτη επιπολασμού στο HPA-1 έδειξε την υπεροχή του φαινότυπου VanB (επιπολασμός σε 3,7% των ασθενών) έναντι του VanA (επιπολασμός σε 1,8% των ασθενών), η πολυκεντρική μελέτη έδειξε την επικράτηση του φαινότυπου VanA έναντι του VanB. Ο φαινότυπος VanA είχε υψηλότερη τιμή επιπολασμού (6,6% έναντι 1,4%) και ευρύτερη διασπορά (εντοπίστηκε σε 9 νοσοκομεία, έναντι του VanB που εντοπίστηκε σε 4 νοσοκομεία). Όμως και τα αποτελέσματα της πολυκεντρικής μελέτης που αναφέρονται στο HPA-1 (και αποτελούν τη δεύτερη μελέτη επιπολασμού για αυτό το νοσοκομείο) φέρουν τον VanA σε

επικρατέστερη θέση (τιμή επιπολασμού 10,3%) έναντι του VanB (τιμή επιπολασμού 5,9%).

Αυτό το εύρημα βρίσκεται σε εναρμόνιση με τα αποτελέσματα των περισσότερων ευρωπαϊκών μελετών που δείχνουν, είτε απουσία του VanB (78, 102, 123, 132, 157, 247), είτε υπεροχή του VanA έναντι του VanB (129, 289). Από τις ευρωπαϊκές μελέτες διαφοροποιείται μελέτη σε νοσοκομείο της Σκοτίας (239) που δείχνει μεγάλη υπεροχή του VanB, έναντι του VanA. Παρόλα αυτά δεν λείπουν και από την Ευρώπη αναφορές για επιδημίες σε νοσοκομεία που προκλήθηκαν αποκλειστικά από VanB στελέχη (169).

Αντίθετα με ότι συμβαίνει στην Ευρώπη, στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής πολλές μελέτες που αναφέρονται σε νοσοκομειακές επιδημίες από VRE δείχνουν την υπεροχή του τύπου VanB (30, 257). Ωστόσο, συγκεντρωτικά αποτελέσματα από νοσοκομεία των ΗΠΑ δείχνουν τους φαινότυπους VanA και VanB να αντιπροσωπεύουν το 60% και 40%, αντίστοιχα (59). Μεταγενέστερες μελέτες δείχνουν τον VanA σε ακόμα μεγαλύτερη υπεροχή, να αντιπροσωπεύει το 75% των VRE στελεχών (345). Μελέτες επιπολασμού του VRE σε νοσοκομεία του Καναδά, κατά τα έτη 1995-1996, βρίσκουν ότι ο επιπολασμός του VRE στο έντερο των νοσηλευομένων ασθενών είναι 0,75%, αλλά σε επιλεγμένες ομάδες ασθενών υψηλού κινδύνου ανέρχεται σε 5,3%. Επικρατέστερος τύπος αντοχής είναι ο VanB (167).

Επιπολασμός του VRE στα κόπρανα νοσηλευομένων ασθενών σε συχνότητα 10,9%, διαπιστώνεται σε αντίστοιχη μελέτη στο Γιοχάνεσμπουργκ, στη Ν. Αφρική. Αν και τα περιστατικά λοίμωξης από VRE, στην χώρα αυτή, οφείλονται σε στελέχη με VanA τύπο αντοχής, κατά την μελέτη επιπολασμού στα κόπρανα, τα περισσότερα από τα απομονωθέντα στελέχη βρέθηκαν να διαθέτουν VanB τύπο αντοχής (318). Πάντως σε παγκόσμιο επίπεδο φαίνεται να επικρατεί ο φαινότυπος VanA, όπως τουλάχιστον προκύπτει από διηπειρωτική μελέτη με συμμετοχή 8000 κλινικών στελεχών *E. faecalis* και *E. faecium* προερχομένων από Ασία, Ευρώπη, Βόρειο και Νότιο Αμερική (235).

Τόσο στην πρώτη, όσο και στην πολυκεντρική μελέτη επιπολασμού, επικρατέστερο είδος με επίκτητο μηχανισμό αντοχής ανεδείχθη το *E. faecium*. Με εξαίρεση ελάχιστες μελέτες που αναφέρονται συνήθως σε μονοκλωνική διασπορά *E. faecalis* σε νοσοκομεία (23, 260), γενική είναι η διαπίστωση της υπεροχής του *E. faecium* μεταξύ των στελεχών εντεροκόκκου με επίκτητη αντοχή στην βανκομυκίνη (78, 102, 123, 132, 157, 235, 239, 289, 345).

## Γ. 2. Αναφορές VRE στην Ελλάδα.

Κατά την πανευρωπαϊκή μελέτη που διεξήχθη το 1997 από τους Schouten και συν., και στην οποία συμμετείχε και η χώρα μας δεν βρέθηκαν εντερόκοκκοι με αντοχή στα γλυκοπεπίδια. Μεταγενέστερες μελέτες που δημοσιεύθηκαν κατά την διάρκεια του ετών 2000-2001 αναφέρουν την παρουσία VRE σε ελληνικά νοσοκομεία (77, 202, 259). Οι Platsouka και συν (259) αναφέρουν το 2000 την απομόνωση των πρώτων στελεχών *E. faecium* VanA στην Ελλάδα. Οι Demertzi και συν (77), αναφέρουν το 2001 την απομόνωση 10 στελεχών *E. faecium* με αντοχή στα γλυκοπεπίδια, σε νοσοκομείο της Αθήνας (Λαϊκό), εκ των οποίων 8 έφεραν *vanA* γονότυπο και 2 *vanB2*. Οι Maniatis και συν αναφέρουν το 2001 την απομόνωση, σε άλλο νοσοκομείο της Αθήνας (Σισμανόγλειο), 25 στελεχών *E. faecium vanA* (202).

Κατά την διάρκεια του 2004, έρχονται στο φως τρεις νέες δημοσιεύσεις που αφορούν την παρουσία του VRE στην Ελλάδα. Οι Sofianou και συν (295), περιγράφουν μεγάλη αύξηση (από 1,2% σε 34,9%) του επιπολασμού του VRE σε κόπρανα ασθενών από τμήματα υψηλού κινδύνου σε νοσοκομείο της Θεσσαλονίκης (Ιπποκράτειο) μεταξύ δύο περιόδων, α' πεντάμηνο 1999 και α' πεντάμηνο 2003. Κανένα από τα απομονωθέντα στελέχη δεν έχει *vanB* γονότυπο. Οι Kalocheretis και συν (164), σε μελέτη επιπολασμού που διεξάγεται, από τον Σεπτέμβριο ως τον Δεκέμβριο του 2001, μεταξύ ασθενών σε αιμοκάθαρση σε 4 κέντρα της Αθήνας, διαπιστώνουν επιπολασμό του VRE σε 3,9% των ασθενών, χωρίς να



συμπεριλάβουν τα στελέχη με VanC φαινότυπο. Όλα τα VRE στελέχη είναι *E. faecium vanA*. Οι Rounaras και συν (260) περιγράφουν την διερεύνηση μιας μονοκλωνικής επιδημίας από *E. faecalis vanA*, στο νοσοκομείο «Γ. Γεννηματάς», στην Αθήνα, που συνέβη από Αύγουστο του 2000 ως Νοέμβριο 2001.

Αυτές οι μελέτες, που αφορούν το γίνεσθαι του VRE στην Ελλάδα, περιορίζονται στα πλαίσια μεμονωμένων νοσοκομείων (77, 202, 260, 295), ή σε επιλεγμένες ομάδες ασθενών (164).

Τα ευρήματα της πολυκεντρικής μελέτης επιπολασμού, αναφορικά με την συχνότητα, την επικράτηση των φαινοτύπων και την επικράτηση των ειδών μεταξύ των στελεχών VRE είναι σε εναρμόνιση με τα ευρήματα των περισσότερων αντίστοιχων ευρωπαϊκών μελετών.

Τα αποτελέσματα όμως της πρώτης επιδημιολογικής μελέτης επιπολασμού στο HPA-1(ΠΑΓΝΗ) προσεγγίζουν περισσότερο το επιδημιολογικό πρότυπο των ΗΠΑ, παρά το Ευρωπαϊκό (122, 323).

Έτσι τα ευρήματα αυτής της μελέτης, ενώ είναι συγκρίσιμα με αυτά της ομάδος Ieven και συν (157), διότι πρόκειται για σημειακή μελέτη επιπολασμού, έγινε με την ίδια μεθοδολογία και έδωσε αντίστοιχα αποτελέσματα τόσο στο γενικό επίπεδο επιπολασμού, όσο και στην κατανομή των ειδών, διαφέρουν όμως στην κατανομή των φαινοτύπων, διότι δεν βρίσκονται καθόλου στελέχη τύπου VanB, σε αντίθεση με τα δικά μας ευρήματα, όπου ο VanB υπερέχει του VanA.

Αναφορικά με την υπεροχή του τύπου VanB έναντι του τύπου VanA που βρέθηκε στην δική μας αρχική μελέτη, υπάρχει αντιστοιχία με την μελέτη της ομάδος Nelson και συν σε νοσοκομείο της Γλασκόβης όπου διαπιστώνεται η υπεροχή του τύπου VanB (239).

Όμως και η περαιτέρω εξέλιξη προς υπεροχή του VanA (όπως βρέθηκε στην δεύτερη μελέτη επιπολασμού και όπως εξελίχθηκε στο σύνολό της η πορεία του VRE στο νοσοκομείο), θυμίζει περισσότερο το επιδημιολογικό πρότυπο των ΗΠΑ, που ενώ ξεκινούν με VanB καταλήγουν στην επικράτηση του VanA (170).

Πάντως η πρώτη αναφορά για παρουσία του VRE σε ελληνικό νοσοκομείο (77), αναφέρει παρουσία και VanB τύπου.

### Γ. 3. Επιπολασμός κατά νοσοκομεία

Όταν υπολογισθεί το σύνολο των στελεχών VRE, δεν προκύπτει σημαντική διαφορά στις τιμές επιπολασμού μεταξύ γενικών και πανεπιστημιακών νοσοκομείων. Όταν όμως, μόνο τα στελέχη VanA/VanB υπολογισθούν, τότε ο επιπολασμός στο σύνολο των πανεπιστημιακών νοσοκομείων είναι υπερδιπλάσιος του επιπολασμού στο σύνολο των γενικών νοσοκομείων (9,7% έναντι 4,7%). Μία άλλη διαφοροποίηση προκύπτει ανάλογα με το μέγεθος του νοσοκομείου. Έτσι, στα μικρά νοσοκομεία (<200 κλινών) δεν ανιχνεύθηκαν VanA/VanB στελέχη και τα μεγάλα νοσοκομεία (>500 κρεβάτια) αποδείχθηκαν τα πιο επιβαρημένα, αφού τα υψηλότερα ποσοστά επιπολασμού προσδιορίστηκαν σε νοσοκομεία αυτής της ομάδος.

Τα ευρήματα αυτά εναρμονίζονται άριστα με αναφορά του NNIS των ΗΠΑ (243), όπου παρουσιάζεται **συσχέτιση** του ποσοστού αντοχής στην βανκομυκίνη των νοσοκομειακών εντεροκόκκων με τον τύπο και το **μέγεθος** του νοσοκομείου. Στα **πανεπιστημιακά νοσοκομεία** (teaching hospitals) το ποσοστό αντοχής στην βανκομυκίνη είναι 3%, ενώ στα μη πανεπιστημιακά (non teaching) είναι μόλις 0,6%. Διαφοροποίηση επίσης προκύπτει και ανάλογα με το μέγεθος του νοσοκομείου. Έτσι στα νοσοκομεία με λιγότερα από 200 κρεβάτια δεν είχε απομονωθεί κανένα στέλεχος VRE, στα νοσοκομεία μεγέθους 200-500 κλινών το ποσοστό των εντεροκόκκων με αντοχή στην βανκομυκίνη ήταν 1,8%, ενώ στα νοσοκομεία τα μεγαλύτερα των 500 κλινών το ποσοστό ήταν 3,6% (243).

### Γ. 4. Επιπολασμός κατά τομείς

Όταν το σύνολο των απομονωθέντων στελεχών VRE υπολογίσθηκε, τομείς με την μεγαλύτερη συχνότητα επιπολασμού αναδείχθηκαν κατά σειρά οι: μονάδες τεχνητού νεφρού (28,9%), χειρουργικός (22,6%), παθολογικός (19%) και μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) ενηλίκων (14,9%).

Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων, όταν υπολογίσθηκαν μόνο τα στελέχη με επίκτητο μηχανισμό αντοχής (VanA, VanB) και εξαιρέθηκαν τα στελέχη που έφεραν μόνο φυσική συστασιακή αντοχή (VanC1, VanC3/C3), τότε η σειρά ανατράπηκε και τομείς με την μεγαλύτερη συχνότητα επιπολασμού αναδείχθηκαν οι: παθολογικός (9,4%), χειρουργικός (8,6%), ΜΕΘ ενηλίκων (6%) και μονάδες τεχνητού νεφρού (5,4%).

Είναι γνωστό ότι η ομάδα των νεφροπαθών αποτελεί ομάδα υψηλού κινδύνου αφού η πρώτη αναφορά για παρουσία VRE αφορούσε ομάδα νεφροπαθών (311). Έκτοτε πολλές μελέτες ανέδειξαν την ομάδα των νεφροπαθών σε ομάδα υψηλού κινδύνου (78, 239). Και η μελέτη που διεξήχθη εκείνη την εποχή στην Αθήνα μεταξύ των ασθενών 4 κέντρων αιμοκάθαρσης, έδωσε συγκρίσιμη τιμή επιπολασμού (3,9%) χωρίς να συμπεριλάβει τα στελέχη με φυσική αντοχή (164).

Είναι επίσης γνωστή η ισχυρή παρουσία του VRE σε ΜΕΘ ενηλίκων (129, 239). Είναι εντυπωσιακά τα αποτελέσματα και σε μελέτη από τους Fridkin και συν στις ΗΠΑ (119). Σε 126 ΜΕΘ ενηλίκων από 60 νοσοκομεία των ΗΠΑ, η μέση τιμή επιπολασμού του VRE επί του συνόλου των στελεχών εντεροκόκκου που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα νοσηλευόμενων ασθενών είναι 10%, όμως για τα πανεπιστημιακά νοσοκομεία είναι 12,6% έναντι 5,6% για τα μη πανεπιστημιακά, και για τα νοσοκομεία άνω των 500 κλινών 12,5% έναντι 6,5% για τα νοσοκομεία δυναμικότητας κάτω των 500 κλινών (119).

Η μεγάλη συχνότητα αποικισμού από VRE των ασθενών στον παθολογικό τομέα μπορεί να ερμηνευθεί από το γεγονός ότι σε αυτόν καταγράφηκαν και οι ογκολογικοί – αιματολογικοί ασθενείς που σε άλλες μελέτες αποτελούν ξεχωριστή ομάδα και αναδεικνύονται ομάδα υψηλού κινδύνου (129, 239)

Μηδενική βρέθηκε η τιμή επιπολασμού του VRE σε όλες τις μονάδες νεογνών που εξετάσθηκαν. Είναι γνωστό ότι η επιδημιολογία του VRE στα νεογνά διαφέρει αυτήν των ενηλίκων. Συνήθως δεν ανευρίσκονται στελέχη

με επίκτητο τύπο αντοχής, αλλά μόνο στελέχη με φυσική αντοχή χαμηλού επιπέδου στην βανκομυκίνη, δηλαδή φαινότυπος VanC (209, 306).

Τόσο η πρώτη μελέτη επιπολασμού αποίκισης, όσο και η πολυκεντρική μελέτη έδειξαν την απουσία VRE σε παιδιά, εκτός από ένα περιστατικό στην μονάδα εντατικής νοσηλείας παιδών. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με άλλες αντίστοιχες μελέτες (58, 289).

### Γ. 5. Παράγοντες κινδύνου

Η μεγάλη ηλικία, η παρουσία κακοήθειας και ο αριθμός των ασθενειών στο υπόστρωμα του ασθενούς, η παρατεταμένη νοσηλεία στο νοσοκομείο, η νοσηλεία σε πανεπιστημιακό νοσοκομείο, η υποβολή σε τεχνητό νεφρό, η προηγηθείσα αντιβιοτική αγωγή, αλλά και ο αριθμός των χορηγηθέντων αντιβιοτικών, η διενέργεια πολλαπλών παρεμβατικών πράξεων στον ασθενή (ιδιαίτερα τραχειοτομής και ERCP) και η πρόσφατη υποβολή σε χειρουργική επέμβαση αναδείχθηκαν παράγοντες κινδύνου για αποικισμό του εντέρου από VRE κατά την παρούσα πολυκεντρική μελέτη.

Η αναζήτηση παραγόντων κινδύνου για αποικισμό, ή λοίμωξη από VRE υπήρξε βασικό μέλημα πολλών επιδημιολογικών μελετών. Από την πρώτη κιόλας περιγραφείσα επιδημία από VRE, βρέθηκε ότι, η καθιέρωση πρωτοκόλλου χορήγησης συνδυασμού βανκομυκίνης-κεφταζιδίμης ως εμπειρικής θεραπείας για την αντιμετώπιση οξείας σηπτικής κατάστασης, τρεις μήνες πριν, συνέβαλε στην εκδήλωση της επιδημίας (311). Ομοίως και στην αναφορά από την Γαλλία, είχε προηγηθεί η καθιέρωση της χορήγησης βανκομυκίνης, ως εμπειρικής θεραπείας των ουδετεροπενικών ασθενών που ανέπτυσσαν λοίμωξη. Όμως οι ασθενείς από τους οποίους είχε απομονωθεί VRE, δεν είχαν κατ' ανάγκην λάβει βανκομυκίνη (187).

Είναι δύσκολο να συγκριθούν και να συνεκτιμηθούν τα ευρήματα διαφορετικών μελετών επί των παραγόντων κινδύνου για απόκτηση VRE, λόγω διαφορών στην μεθοδολογία. Οι σημαντικότερες δυσχέρειες στην μεθοδολογία εντοπίζονται: α) στο αν αναφέρονται σε λοίμωξη, ή αποικισμό, β) στην μέθοδο καλλιέργειας και απομόνωσης του VRE (ιδιαίτερα αν

πρόκειται για μελέτες αποικισμού), γ) στην επιλογή ειδικών ομάδων ασθενών, δ) στο γεγονός της φυσικής συσχέτισης κάποιων παραμέτρων, π.χ. η παρατεταμένη νοσηλεία έχει σαν επακόλουθο και την αυξημένη πιθανότητα χορήγησης κάποιων φαρμάκων. Ωστόσο θα επιχειρηθεί μία παρουσίαση των ευρημάτων άλλων μελετών.

Η νοσηλεία σε τμήματα υψηλού κινδύνου, η παρατεταμένη νοσηλεία και η χορήγηση δύο ή περισσότερων αντιβιοτικών ημερησίως, αναδείχθηκαν παράγοντες κινδύνου για απόκτηση VRE σε μελέτη που έλαβε χώρα σε νοσοκομεία της Βοστώνης των ΗΠΑ (121).

Ο αριθμός των χορηγούμενων αντιβιοτικών και η χορήγηση μετρονιδαζόλης αναδεικνύονται ως οι κύριοι παράγοντες κινδύνου για αποικισμό από VRE σε νοσοκομείο της Μελβούρνης (199).

Η μεγάλη ηλικία, ο σακχαρώδης διαβήτης και η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, η παρατεταμένη νοσηλεία, η χορήγηση πολλών αντιβιοτικών και η χορήγηση κεφαλοσπορινών τρίτης γενεάς, προσδιορίζονται ως παράγοντες κινδύνου για αποικισμό από VRE σε μελέτη σε πανεπιστημιακό νοσοκομείο της Αυστραλίας (206).

Σε μία άλλη μελέτη οι Bonten και συν καθιέρωσαν μία άλλη παράμετρο (26), την «πίεση για αποικισμό» (colonization pressure). Η παράμετρος αυτή ορίστηκε ως η αναλογία των αποικισμένων ασθενών σε μία δεδομένη χρονική στιγμή. Η μελέτη αυτή απέδειξε ότι η πίεση για αποικισμό ήταν η σημαντικότερη παράμετρος για αποικισμό από VRE. Άλλοι δύο παράγοντες κινδύνου προσδιορίστηκαν σε αυτήν τη μελέτη, η εντερική διατροφή και η χορήγηση κεφαλοσπορινών τρίτης γενεάς. Όταν η πίεση αποικισμού ήταν >50%, τότε οι άλλοι παράγοντες είχαν μικρή επίδραση καθώς αυτή ήταν ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου. Αντίθετα, όταν η πίεση αποικισμού ήταν <50%, τότε οι άλλοι παράγοντες συνέβαλαν στην απόκτηση του VRE.

Η χρήση βανκομυκίνης και τρίτης γενιάς κεφαλοσπορινών αναδείχθηκαν, ως ισχυροί παράγοντες κινδύνου για υψηλό επίπεδο επιπολασμού από VRE στις μονάδες εντατικής νοσηλείας, σε μελέτη που έγινε στις ΗΠΑ από τους Fridkin και συν (119). Άλλοι παράγοντες που σχετίστηκαν με υψηλότερες

τιμές επιπολασμού του VRE στην ίδια μελέτη ήταν το μέγεθος του νοσοκομείου (>500 κλίνες), ο εκπαιδευτικός χαρακτήρας του νοσοκομείου και ο τύπος της ΜΕΘ, καθώς οι καρδιοχειρουργικές και οι νευροχειρουργικές μονάδες είχαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές επιπολασμού από VRE (119).

Ως παράγοντες κινδύνου για αποικισμό από VRE προσδιορίστηκαν η διάρκεια νοσηλείας στο νοσοκομείο, η διάρκεια νοσηλείας στην αιματολογική κλινική όπου βρέθηκε και ο υψηλότερος επιπολασμός και η προηγηθείσα χορήγηση βανκομυκίνης σε αντίστοιχη με την δική μας μελέτη επιπολασμού για αποικισμό από VRE ασθενών νοσηλευόμενων σε πανεπιστημιακό νοσοκομείο του Βελγίου (132).

Συνοψίζοντας, πολλές μελέτες συγκλίνουν στον χαρακτηρισμό ως παραγόντων κινδύνου για αποικισμό: την παρατεταμένη διάρκεια νοσηλείας, την χορήγηση αντιβιοτικών, την διενέργεια παρεμβατικών ιατρικών πράξεων, εντερική θρέψη, υποβολή σε νεφρική κάθαρση, την προηγηθείσα νοσηλεία σε τμήμα με επιβάρυνση από την παρουσία του VRE, ή την έκθεση σε νοσηλευτικούς χειρισμούς σε περιβάλλον βεβαρημένο από την παρουσία VRE (25, 28, 119, 132, 165, 196, 199, 206, 224, 294, 299).

Προκειμένου για λοίμωξη από VRE, ως κοινοί παράγοντες κινδύνου όπου συγκλίνουν πολλές μελέτες χαρακτηρίζονται επιπρόσθετα: η προχωρημένη ηλικία του ασθενούς, η παρουσία κακοήθειας, χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, σακχαρώδους διαβήτη, και η υποβολή σε μεταμόσχευση οργάνου, κυρίως ήπατος (50, 135, 143, 218, 253, 343)

Ειδικά για την σημασία της χορήγησης αντιβιοτικών, ενώ υπάρχει κοινός τόπος αναφορικά με την χορήγηση περισσότερων του ενός αντιβιοτικών και την διάρκεια της θεραπείας, αντικρουόμενα είναι τα ευρήματα αναφορικά με την κατηγορία των αντιβιοτικών που ενοχοποιείται από τους εκάστοτε ερευνητές. Οι ομάδες αντιβιοτικών που έχουν ενοχοποιηθεί είναι: γλυκοπεπτίδια, πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες και ιδίως τρίτης γενεάς, μονολακτάμες και αντιαναερόβια (25, 119, 124, 132, 143, 199, 343).

## Δ. ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΠΟ VRE

### Δ. 1. Εντόπιση λοίμωξης

Οι λοιμώξεις από VRE είναι κατ' εξοχήν νοσοκομειακές λοιμώξεις. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα της μελέτης των περιστατικών λοίμωξης, όπου τα 50 από τα 54 περιστατικά (92,6%) χαρακτηρίστηκαν ως νοσοκομειακές λοιμώξεις. Η συχνότερη θέση λοίμωξης είναι το ουροποιητικό, 15/54 (27,8%) και ακολουθούν οι ενδοκοιλιακές φλεγμονές 11/54 (20,4%), ενώ οι βακτηριαίμιες είναι τρίτες σε συχνότητα 9/54 (16,6%). Ανάλογη κατανομή στην εντόπιση της λοίμωξης από VRE αναφέρεται και σε άλλες μελέτες (22, 121).

Σε αναφορά του NNIS για τις νοσοκομειακές λοιμώξεις από εντερόκοκκο στις ΗΠΑ (243), αναφέρεται ότι, από 1 Ιανουαρίου 1989 έως 31 Μαρτίου 1993, παρατηρείται αύξηση της αναλογίας των ανθεκτικών στην βανκομυκίνη εντεροκόκκων από 0,3% το 1989 σε 7,9% το 1993. Η αύξηση αυτή είναι ακόμη μεγαλύτερη στις μονάδες εντατικής νοσηλείας (από 0,4% σε 13,6%). Η αντοχή στην βανκομυκίνη διέφερε ανάλογα με την θέση της λοίμωξης. Το γαστρεντερικό σύστημα (ενδοκοιλιακά αποστήματα κ.α.) έχουν την υψηλότερη αναλογία VRE (7,8%), ακολουθούν το δέρμα και τα μαλακά μόρια (4,1%) και οι βακτηριαίμιες (3,8%).

### Δ. 2. Παθολογικό υπόστρωμα ασθενών και προδιαθεσικοί παράγοντες.

Τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των περιστατικών λοίμωξης στην μελέτη μας είναι: η **παρατεταμένη νοσηλεία**, οι πολλές **διακινήσεις** εντός του νοσοκομείου με ιδιαίτερη έμφαση την μεταφορά από και προς την **ΜΕΘ** ενηλίκων, η παρουσία σοβαρής **υποκείμενης** νόσου (κακοήθειας, φλεγμονής ενδοκοιλιακών οργάνων), η διενέργεια **χειρουργικής** επέμβασης, η διενέργεια **παρεμβατικών** ιατρικών πράξεων και η χορήγηση **αντιβιοτικών**.

Οι αναφορές από την διεθνή βιβλιογραφία συνηγορούν υπέρ αυτών των ευρημάτων. Οι ασθενείς που αναπτύσσουν λοίμωξη από VRE είναι συνήθως ηλικιωμένοι, καταβεβλημένοι, με πολλαπλά υποκείμενα ιατρικά

προβλήματα, ή ανοσοκατασταλμένοι (147). Νεφρική ανεπάρκεια, παρατεταμένη νοσηλεία, ουδετεροπενία, διάρκεια αντιβιοτικής θεραπείας και ιδίως χορήγηση βανκομυκίνης, αποτελούν παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη λοίμωξης από VRE (143, 184).

### **Δ. 3. Βακτηριαμία από VRE**

Η μορφή λοίμωξης που έχει μελετηθεί περισσότερο είναι η βακτηριαμία. Η βακτηριαμία από VRE δεν είναι η συχνότερη, είναι όμως η σοβαρότερη μορφή. Η πιθανότητα ανάπτυξης βακτηριαμίας από VRE αυξάνει σε σχέση με παρατεταμένη νοσηλεία, εισαγωγή στη ΜΕΘ, χορήγηση πολλών αντιβιοτικών, χορήγηση αντιόξινων φαρμάκων, εντερική διατροφή, παρουσία κεντρικού φλεβοκαθετήρα και βαρύτητα της νόσου (124). Αυτό που κυρίως ενδιαφέρει τους μελετητές της βακτηριαμίας από VRE είναι η τελική έκβαση. Ούτως ή άλλως η εντεροκοκκική βακτηριαμία είναι μια σοβαρή λοίμωξη και η θνητότητά της υπολογίζεται σε διάφορες μελέτες από 17-54% (85, 124, 243). Παλαιότερες μελέτες αναφέρουν θνητότητα στις εντεροκοκκικές βακτηριαμίες 45-54% και για τις περιπτώσεις που η πρωτοπαθής εστία ήταν ενδοκοιλιακή λοίμωξη 83% (85). Σε αναφορά του NISS (243), η θνητότητα των νοσοκομειακών εντεροκοκκικών βακτηριαμιών προσδιορίζεται στο 17,2%. Για τις περιπτώσεις με ανθεκτικά στην βανκομυκίνη στελέχη η θνητότητα ήταν 36,6%, έναντι των ευαίσθητων στελεχών που ήταν 16,4%. Όμως δεν υπήρχαν στοιχεία επαρκή για την αξιολόγηση της λοίμωξης ως αιτίας θανάτου σε αυτούς τους ασθενείς. Η θνητότητα για τις νοσοκομειακές βακτηριαμίες στο σύνολό τους προσδιορίζεται στο 27% (332).

Στο συμπέρασμα, ότι η θνητότητα της εντεροκοκκικής βακτηριαμίας δεν επηρεάζεται από την αντοχή στην βανκομυκίνη, αλλά σχετίζεται με την σοβαρότητα της κατάστασης του ασθενούς, οδηγούνται άλλες μελέτες (124, 184). Τα αντιφατικά αυτά ευρήματα επί της έκβασης των VRE βακτηριαμιών οδήγησαν τους Salgado και Farr να διερευνήσουν 13 τέτοιες μελέτες, για να καταλήξουν ότι, παρά τις ανεπάρκειες και τις αδυναμίες



αυτών των μελετών, το τελικό συμπέρασμα είναι ότι η VRE βακτηριαμία σχετίζεται με συχνότερη υποτροπή, υψηλότερη θνητότητα και μεγαλύτερο κόστος (283).

Στα δικά μας περιστατικά, η θνητότητα ήταν 37% για το σύνολο των λοιμώξεων από VRE και 55,6% για τα 9 περιστατικά βακτηριαμίας. Αν και οι αριθμοί των περιστατικών δεν είναι αρκετά μεγάλοι και υπάρχουν όλοι οι προαναφερθέντες περιορισμοί για τον χαρακτηρισμό της θνητότητας, όμως το ποσοστά αυτά δίνουν μια εικόνα της σοβαρότητας των λοιμώξεων από VRE.

#### **Δ. 4. Επίπτωση και διασπορά VRE λοιμώξεων σε τμήματα.**

Η μέση επίπτωση λοίμωξης από VRE υπολογίσθηκε σε 0,221/1000 εισαγωγές, ή 0,061/1000 ημέρες νοσηλείας. Οι χαμηλότερες και υψηλότερες τιμές σημειώθηκαν κατά τα έτη 2002 και 2004, αντίστοιχα. Η διακύμανση ήταν από 0,049/1000 εισαγωγές ως 0,400/1000 εισαγωγές, ή 0,014/1000 ημέρες νοσηλείας ως 0,109/1000 ημέρες νοσηλείας. Οι τιμές αυτές συγκρινόμενες με αντίστοιχες άλλων μελετών διεθνώς δεν χαρακτηρίζονται ως ιδιαίτερα υψηλές. Αύξηση από 1,1/1000 ημέρες νοσηλείας σε 3,3/1000 ημέρες νοσηλείας αναφέρεται σε μελέτη σε νοσοκομείο των ΗΠΑ (22). Από 0,2/1000 σε 0,6/1000 ημέρες νοσηλείας διακυμάνθηκε η επίπτωση λοίμωξης από VRE σε νοσοκομείο της Βοστώνης (121).

Η μεγαλύτερη επίπτωση λοίμωξης σημειώθηκε στην ΜΕΘ (3,844 έναντι 0,221/1000 εισαγωγές επί του συνόλου). Αυτό το εύρημα είναι συμβατό με την γενικότερη παρατήρηση της παρουσίας του VRE στην ΜΕΘ. Εκεί σημειώθηκαν δύο από τα πέντε πρώτα κρούσματα και η πρώτη μελέτη επιπολασμού για αποικισμό, που επακολούθησε, έδειξε υψηλό επιπολασμό (50%) του VRE στο έντερο των ασθενών της ΜΕΘ, μολονότι ο αριθμός των νοσηλευόμενων ασθενών εκείνη την ημέρα ήταν μικρός (4 ασθενείς). Στην δεύτερη μελέτη επιπολασμού, μόνο ένας από τους 11 νοσηλευόμενους ασθενείς βρέθηκε αποικισμένος από *E. gallinarum*. Έτσι, η δεύτερη μελέτη

επιπολασμού στην περίπτωση της ΜΕΘ δεν μπόρεσε να προβλέψει την μεγάλη επίπτωση λοιμώξεων από VRE που επακολούθησε.

Η ΜΕΘ αποτελεί μονάδα του νοσοκομείου, όπου οι νοσηλεύόμενοι ασθενείς διακινούνται συνήθως από και προς άλλες κλινικές. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το εύρημα από τα στοιχεία διακίνησης των ασθενών με λοίμωξη VRE, ότι 6 ασθενείς μεταφέρθηκαν στη ΜΕΘ, ενώ είχαν ήδη αναπτύξει λοίμωξη από VRE στο τμήμα όπου νοσηλεύονταν, ενώ 8 άλλοι ασθενείς ανέπτυξαν λοίμωξη από VRE στα τμήματα που μεταφέρθηκαν, αφού όμως είχαν προηγουμένως νοσηλευτεί στη ΜΕΘ. Έτσι η ΜΕΘ αποδεικνύεται χώρος εισαγωγής και εξαγωγής VRE. Επίσης, από την διερεύνηση των στοιχείων των ασθενών προκύπτει ότι, αρκετοί από τους ασθενείς με λοίμωξη VRE στην μονάδα, ήταν χειρουργικοί ασθενείς, επομένως βρίσκεται μία σύνδεση μεταξύ ΜΕΘ και χειρουργικών κλινικών, που επίσης είχαν σημαντική επίπτωση λοίμωξης από VRE. Οι ασθενείς της ΜΕΘ είναι συνήθως ασθενείς βεβαρημένοι, με μακρά νοσηλεία, με σημαντική διακίνηση μέσα στο νοσοκομείο, υφίστανται πολλαπλές παρεμβατικές νοσηλευτικές και ιατρικές πράξεις, και γίνεται αυξημένη χρήση αντιβιοτικών λόγω του κινδύνου ανάπτυξης νοσοκομειακών λοιμώξεων. Έχουν επομένως αρκετούς από τους παράγοντες κινδύνου για απόκτηση VRE.

Η επιβάρυνση των μονάδων εντατικής νοσηλείας από VRE έχει επισημανθεί από διεθνείς μελέτες. Η αναφορά του NNIS στις ΗΠΑ, για αύξηση των νοσοκομειακών λοιμώξεων από VRE μεταξύ των ετών 1989-1993, αναφέρει ότι αυτή είναι πολύ μεγαλύτερη στις μονάδες εντατικής νοσηλείας (243). Σε επιδημίες από VRE σε μονάδες εντατικής νοσηλείας (30, 143), ή σε αυξημένη παρουσία του VRE σ' αυτές αναφέρονται αρκετές μελέτες (24, 119, 170, 249).

Στη δεύτερη και τέταρτη θέση (σειρά κατά επίπτωση) βρίσκονται η νεφρολογική και αιματολογική κλινική, αντίστοιχα. Οι δύο αυτές κλινικές συστεγάζονται στην ίδια πτέρυγα και στην πρώτη μελέτη επιπολασμού για αποικισμό από VRE εξετάστηκαν από κοινού. Ο επιπολασμός τότε ήταν 14,3%. Στη δεύτερη μελέτη (πολυκεντρική) επιπολασμού για αποικισμό, οι

τιμές ήταν 60% και 71,4%, αντίστοιχα. Θα πρέπει επίσης να τονισθεί, ότι στενή σχέση με την νεφρολογική κλινική έχει η ομάδα των ασθενών που υποβάλλονται σε τεχνητό νεφρό, η οποία έδωσε τιμές επιπολασμού αποίκισης από VRE 29,2% και 35%, στην πρώτη και την δεύτερη μελέτη, αντίστοιχα. Άλλωστε και το πρώτα περιστατικό λοίμωξης από VRE, σημειώθηκε στην νεφρολογική κλινική. Η ομάδα των νεφροπαθών έχει χαρακτηριστεί σαν ομάδα υψηλού κινδύνου από το ξεκίνημα της ιστορίας του VRE, αφού η πρώτη περιγραφή αφορούσε ομάδα νεφροπαθών (311). Έκτοτε, επακολούθησαν πολλές μελέτες, που αναφέρονται στον υψηλού βαθμού κίνδυνο που διατρέχουν οι νεφροπαθείς, ώστε να αναπτύξουν λοίμωξη από VRE (78, 143, 164, 184, 220). Οι αιματολογικοί ασθενείς αποτελούν και αυτοί ομάδα υψηλού κινδύνου για VRE λοίμωξη. Σε αιματολογικούς ασθενείς αναφέρεται η δεύτερη κατά σειρά ανακοίνωση που αφορά την εμφάνιση του VRE (187). Η μελέτη των περιστατικών λοίμωξης από VRE στις δύο αυτές κλινικές δείχνει ότι υπάρχει μία συνεχής ενδημία και πιθανόν εστία διασποράς.

Υψηλή επίπτωση λοιμώξεων παρουσιάζει και η γαστρεντερολογική κλινική, όμως εκεί τα κρούσματα εμφανίστηκαν συρρέοντα και διαχωρίζονται μεταξύ τους από μεγάλα χρονικά διαστήματα. Τέλος, ένα άλλο σύμπλεγμα κλινικών με σημαντική επίπτωση λοιμώξεων είναι οι χειρουργικές κλινικές, οι οποίες μάλιστα βρίσκονται σε στενή συνάφεια με την ΜΕΘ, αφού αρκετά από τα περιστατικά λοίμωξης VRE, διακινήθηκαν μεταξύ χειρουργικών κλινικών, χειρουργείων και ΜΕΘ.

Στα ΣΧΗΜΑΤΑ Δ3, Δ4, και Δ5 επιχειρείται η συνολική παρουσίαση της μηνιαίας κατανομής κατά τμήματα του συνόλου των στελεχών VRE με επίκτητο τύπο αντοχής (VanA, VanB) που απομονώθηκαν στο ΠΑΓΝΗ, τόσο κατά τις δύο μελέτες επιπολασμού για αποικισμό του γαστρεντερικού των νοσηλεύομενων ασθενών, όσο και αυτών που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ασθενών, καθώς και τα στελέχη που απομονώθηκαν από ασθενείς που βρέθηκαν αποικισμένοι στα πλαίσια σποραδικών ελέγχων επιτήρησης.

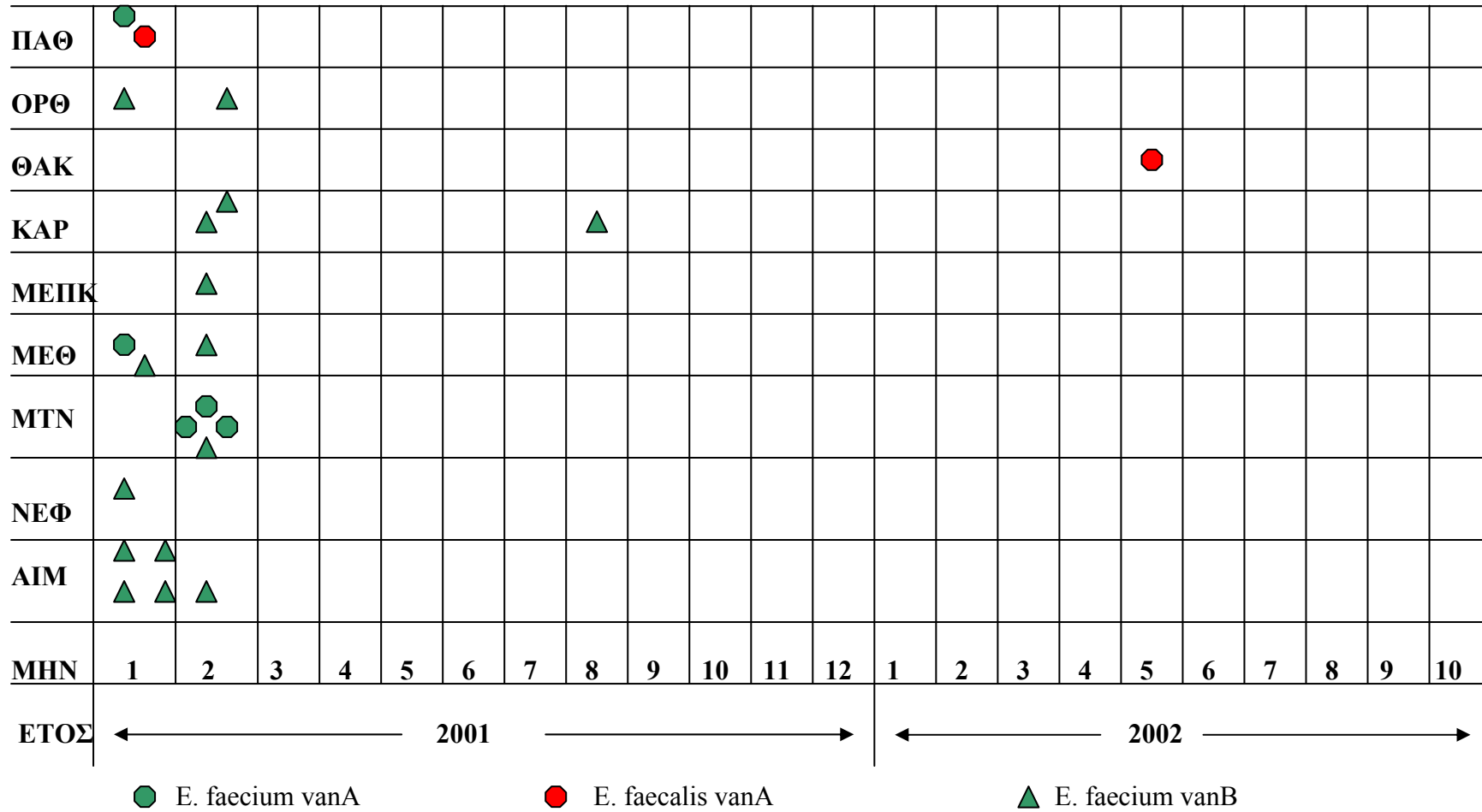
Στο ΣΧΗΜΑ Δ3 απεικονίζονται τα στελέχη που απομονώθηκαν κατά την πρώτη περίοδο (18/12/2000-31/1/2001) στην στήλη 1 του 2001, ενώ στην διπλανή στήλη 2 απεικονίζονται τα στελέχη που απομονώθηκαν στην πρώτη μελέτη επιπολασμού για αποικισμό του γαστρεντερικού. Στις υπόλοιπες στήλες αυτού του σχήματος απεικονίζονται τα στελέχη ( 2 σε αριθμό) που απομονώθηκαν κατά την δεύτερη περίοδο (1/2/2001-31/10/2002) και η οποία χαρακτηρίζεται από ύφεση των περιστατικών VRE λοίμωξης.

Στο ΣΧΗΜΑ Δ4, στην στήλη 11 του έτους 2002, απεικονίζονται τα στελέχη που απομονώθηκαν κατά την δεύτερη (πολυκεντρική) μελέτη επιπολασμού για αποικισμό του γαστρεντερικού από VRE. Στις υπόλοιπες στήλες απεικονίζονται τα στελέχη που απομονώθηκαν κατά την περίοδο 1/12/2002-1/8/2003. αυτό που φαίνεται σε αυτό το σχήμα είναι το γεγονός ότι κατά το τρίμηνο που επακολούθησε μετά την δεύτερη μελέτη επιπολασμού δεν εμφανίζονται νέα κρούσματα. Στους επόμενους μήνες εμφανίζονται είτε με την μορφή μικρών αθροισμάτων σε κάποια τμήματα (ΓΑΣΤΡ, ΠΑΘ), είτε ως μεμονωμένα σποραδικά κρούσματα σε άλλες (π.χ. ΠΟΓΚ, ΜΕΘ/Π).

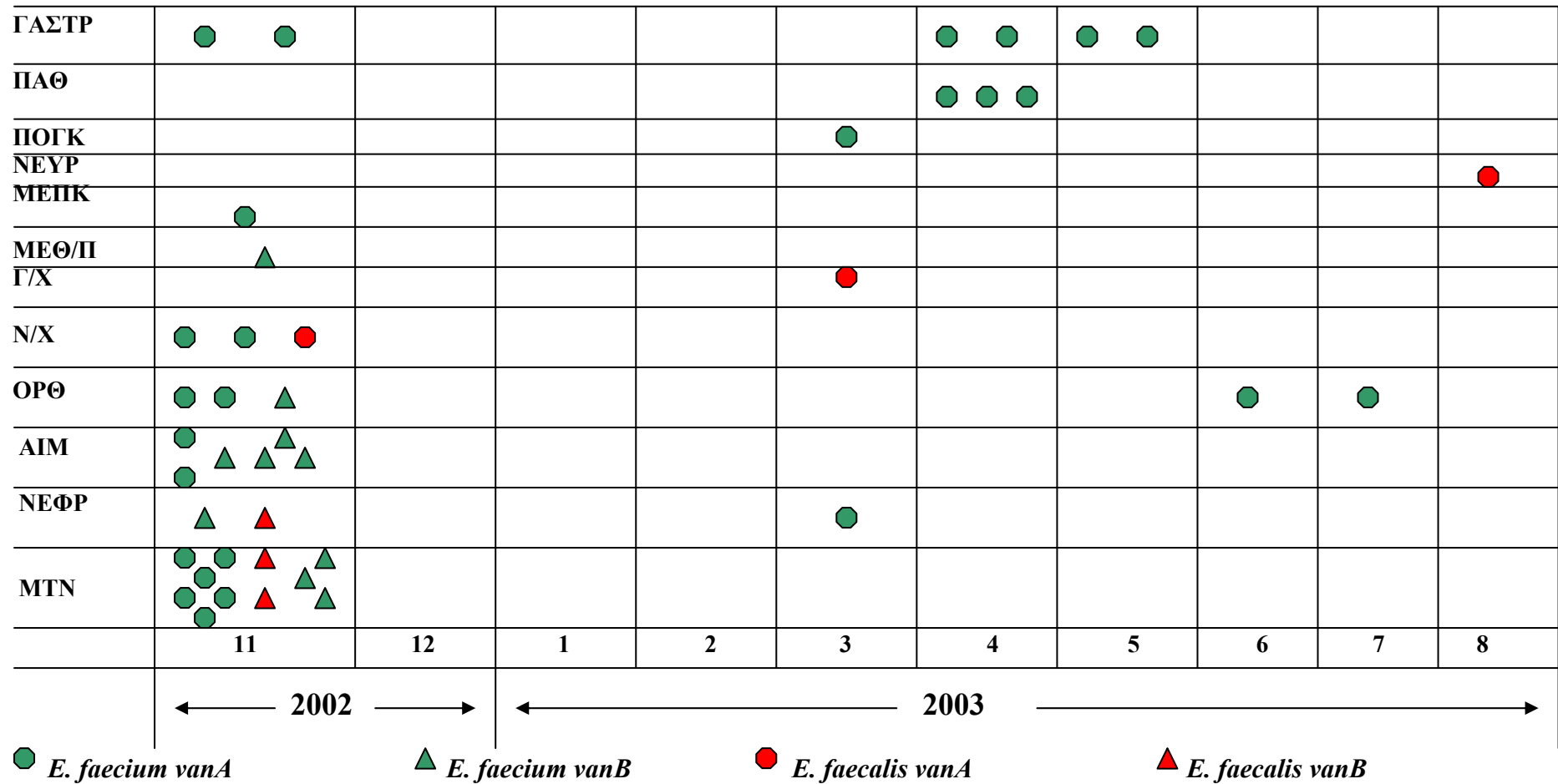
Στο ΣΧΗΜΑ Δ5 απεικονίζονται τα στελέχη που απομονώθηκαν κατά την περίοδο 1/9/2003-1/12/2004. Η συγκέντρωση στελεχών πυκνώνει κατά το πρώτο και τελευταίο τρίμηνο του 2004. Σε κάποιες κλινικές τα απομονωθέντα στελέχη παρουσιάζουν κάποια χρονική συσσώρευση (π.χ. ΑΙΜ, ΠΑΘ), ενώ σε άλλες είναι φανερός ο διάσπαρτος ενδημικός χαρακτήρας (π.χ. ΜΕΘ, ΝΕΦΡ, ΓΧ).

Ένα άλλο στοιχείο που γίνεται φανερό σε αυτά τα σχήματα είναι το γεγονός της βαθμιαίας επικράτησης του *E. faecium vanA*. Ενώ στο ΣΧΗΜΑ Δ3 επικρατεί ο *E. faecium vanB* και υπολείπεται η παρουσία του *E. faecium vanA*, στο ΣΧΗΜΑ Δ4 η παρουσία του *E. faecium vanA* καθίσταται εντονότερη και στο ΣΧΗΜΑ Δ5 έχει σχεδόν επικρατήσει συνολικά.

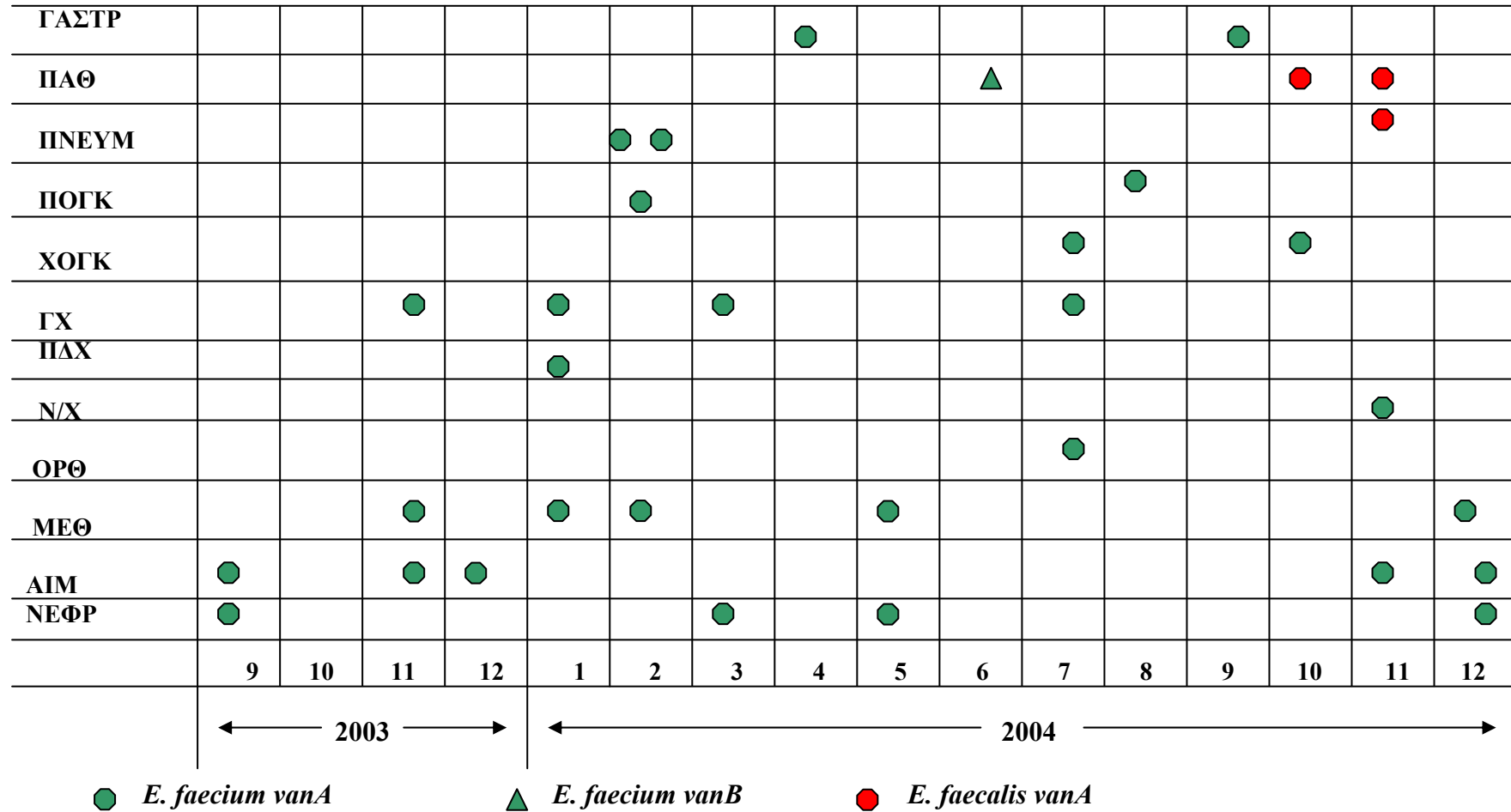
**ΣΧΗΜΑ Δ3. ΜΗΝΙΑΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΚΑΙ ΔΕΥΤΕΡΗ ΠΕΡΙΟΔΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ (18/12/2000 –31/10/2002)**



**ΣΧΗΜΑ Δ4. ΜΗΝΙΑΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΕΥΤΕΡΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΧΡΟΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟ (1/11/2002 –31/8/2003)**



**ΣΧΗΜΑ Δ5. ΜΗΝΙΑΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΧΡΟΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟ (1/9/2003 –31/12/2004)**



## Ε. ΦΑΣΜΑ ΑΝΤΟΧΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ VRE ΣΤΑ ΆΛΛΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Το πρώτο ερώτημα που τίθεται από τον θεράποντα ιατρό, μόλις διαπιστωθεί ότι το υπεύθυνο για την λοίμωξη ενός ασθενούς στέλεχος εντεροκόκκου είναι ανθεκτικό στην βανκομυκίνη, είναι: και τώρα τι μπορούμε να χορηγήσουμε στον ασθενή; Γι' αυτόν τον λόγο, από την αρχή της εμφάνισης του VRE, αρκετές μελέτες προσπάθησαν να δώσουν το συνολικό φάσμα των αντοχών αυτών των στελεχών στα άλλα αντιβιοτικά (21, 36, 103, 211).

Τα αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας του συνόλου των στελεχών VRE, που απομονώθηκαν κατά την παρούσα μελέτη στα συνήθως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά, είναι απόλυτα συμβατά με αυτά που διεθνώς έχουν δημοσιευθεί.

Κοινή είναι η διαπίστωση της διαφοροποίησης των αποτελεσμάτων κατά είδος εντεροκόκκου. Γι' αυτό και οι περισσότερες μελέτες παρουσιάζουν τα αποτελέσματα κατά είδος.

Τα στελέχη με φυσική αντοχή στην βανκομυκίνη παρουσιάζουν πολύ χαμηλά ποσοστά αντοχής στα συνήθως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά και ως εκ τούτου δεν αποτελούν θεραπευτικό πρόβλημα. Γι' αυτό διαχωρίζονται στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων.

Το πλέον χαρακτηριστικό παράδειγμα διαφοροποίησης είναι το profile αντοχής σε πενικιλίνη και αμπικιλίνη των ειδών *E. faecium* και *E. faecalis*.

Ενώ η αναλογία των ανθεκτικών στελεχών *E. faecium* σε πενικιλίνη και αμπικιλίνη ανέρχεται σε 95,2% και 91,8% αντίστοιχα, για τα είδη *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. faecalis* είναι μηδενική.

Η αντοχή υψηλού επιπέδου για την γενταμικίνη, ενώ ήταν ανύπαρκτη για τα στελέχη με φυσική αντοχή στην βανκομυκίνη, προσδιορίστηκε στο 50% των στελεχών VanA/VanB.

Πλάι σε ένα καινούργιο αντιβιοτικό, την λινεζολίδη, που αποδείχθηκε το πιο δραστικό, αφού δεν βρέθηκε κανένα στέλεχος με αντοχή σ' αυτό,



βρέθηκε και ένα παλαιό αντιβιοτικό, που πολύ χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν, αλλά η σημερινή χρήση του είναι πολύ περιορισμένη: η χλωραμφενικόλη, με ποσοστό αντοχής 5,6% επί του συνόλου των στελεχών.

Αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν και χρησιμοποιούνται πολύ, όπως η ερυθρομυκίνη και οι κινολόνες, έδωσαν υψηλά ποσοστά αντοχών (ερυθρομυκίνη 100%, σιπροφλοξασίνη 88,5%).

Οι αντοχές σε τετρακυκλίνη και ριφαμπικίνη αφορούσαν περίπου τα μισά στελέχη με VanA/VanB τύπο αντοχής.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματα άλλων μελετών. Κοινή είναι η διαπίστωση της διαφοροποίησης των αντοχών αναλόγως των ειδών και τα χαμηλά ποσοστά αντοχών για τα είδη με φυσική αντοχή στην βανκομυκίνη (167, 183, 211, 257).

Συμφωνία υπάρχει και στην διαπίστωση της αντοχής στην πενικιλίνη και αμπικιλίνη σε μεγάλο ποσοστό των στελεχών *E. faecium*, σε αντίθεση με το χαμηλό ποσοστό του *E. faecalis* (51, 103, 183, 257, 345)

Η δραστικότητα της λινεζολίδης και της χλωραμφενικόλης διαπιστώνεται στις περισσότερες μελέτες (51, 103, 183, 211, 257, 276, 345), ενώ όλοι συμφωνούν για τα υψηλά ποσοστά αντοχών σε ερυθρομυκίνη και κινολόνες (51, 103, 276, 345). Η αντοχή υψηλού επιπέδου στη γενταμικίνη προσδιορίζεται γύρω από το 50% των στελεχών (103, 211, 345), ενώ οι αντοχές σε τετρακυκλίνες κυμαίνονται από 27% ως 78,8% (51, 103, 211, 257, 276, 345).

## ΣΤ. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ ΑΝΤΟΧΗΣ ΜΕ MULTIPLEX PCR.

### ΣΤ. 1. Φαινότυπος αντοχής και μοριακός χαρακτηρισμός του γονότυπου αντοχής στα γλυκοπεπτίδια.

Ο χαρακτηρισμός του φαινότυπου αντοχής στα γλυκοπεπτίδια ξεκινά από την ακριβή ταυτοποίηση του είδους του εντεροκόκκου (5). Μία πρώτη δυσκολία είναι το γεγονός της ύπαρξης μικροβίων που συγγενεύουν με τον εντερόκοκκο και παρουσιάζουν φυσική αντοχή στα γλυκοπεπτίδια. Πρόκειται για κόκκους gram θετικούς, με αρνητική την δοκιμασία παραγωγής καταλάσης (*Leuconostoc*, *Pediococcus*), ή για βακτηρίδια gram θετικά με επίσης αρνητική την δοκιμασία παραγωγής καταλάσης, που συχνά αναπτύσσονται στα υλικά καλλιέργειας του VRE και πρέπει να γίνει διαφορική διάγνωση από εντερόκοκκο.

Ακολούθως θα πρέπει να γίνει σωστή ταυτοποίηση του είδους, ώστε να γνωρίζουμε αν το απομονωθέν στέλεχος ανήκει στα είδη με φυσική αντοχή στα γλυκοπεπτίδια. Η ταυτοποίηση των ειδών εντεροκόκκου με φυσική αντοχή στην βανκομυκίνη (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens*) με χρήση συμβατικών μεθόδων (δοκιμασία κινητικότητας και παραγωγή χρωστικής) μπορεί να δώσει αποτελέσματα συγκρίσιμα με τον μοριακό προσδιορισμό των ειδών (44). Ωστόσο, τα καλλιεργητικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά πολλές φορές δεν αρκούν και πρέπει πάντα να συμπληρώνονται με τις δοκιμασίες κινητικότητας και παραγωγής της χρωστικής. Τα είδη με φυσική αντοχή στην βανκομυκίνη είναι τα κινητά είδη, όμως η ανεύρεση στελεχών *E. gallinarum* που είναι ακίνητα καθιστά την δοκιμασία κινητικότητας ανεπαρκή (318).

Ο χαρακτηρισμός του φαινότυπου στηρίζεται στον καθορισμό της αντοχής, με προσδιορισμό της MIC σε βανκομυκίνη και τεϊκοπλανίνη σε συνδυασμό με την ταυτοποίηση σε είδος (5). Δεν πρέπει όμως να ξεχνάμε και την ανεύρεση και άλλων δύο τύπων (*VanD*, *VanE*) που ο χαρακτηρισμός

τους δεν μπορεί να γίνει φαινοτυπικά, καθώς και την ανεύρεση στελεχών με *vanB* γονότυπο που εκφράζεται με αντοχή και στην τεϊκοπλανίνη (112, 250, 256).

Παράλληλα, αυξάνουν παγκοσμίως οι αναφορές για ανεύρεση στελεχών που, παράλληλα με την φυσική αντοχή διαθέτουν και επίκτητη αντοχή στα γλυκοπεπίδια. Ο μοριακός χαρακτηρισμός του τύπου αντοχής αυτών των στελεχών είναι απόλυτα επιβεβλημένος (67).

## **ΣΤ. 2. Επιδημιολογική σημασία του *E. gallinarum* και *E. casseliflavus***

Μεταξύ των στελεχών των υπεύθυνων για λοίμωξη από VRE, συμπεριλαμβάνονται και 8 στελέχη με φυσική αντοχή στην βανκομυκίνη (φαινότυπος VanC). Πρόκειται για 6 στελέχη *E. gallinarum* (*vanC1*) και 2 στελέχη *E. casseliflavus* (*vanC2/C3*). Και στις δύο μελέτες επιπολασμού του VRE στο έντερο ασθενών, τα στελέχη με φυσική αντοχή στα γλυκοπεπίδια (φαινότυπος VanC), αντιπροσώπευαν ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των απομονωθέντων στελεχών VRE.

Η κλινική και επιδημιολογική σημασία των στελεχών αυτών αποτελεί αντικείμενο προβληματισμού και μελέτης, καθ' όσον διαφέρει από αυτήν των στελεχών με επίκτητο μηχανισμό αντοχής. Περιστατικά λοίμωξης, ή αποικισμού από στελέχη εντεροκόκκων με φυσική αντοχή στην βανκομυκίνη, μελετήθηκαν και βρέθηκε ότι δεν παρουσίαζαν κάποια ιδιαίτερη κλινική ή επιδημιολογική σημασία έναντι των ευαίσθητων στην βανκομυκίνη εντεροκόκκων (308). Ωστόσο, δεν αμφισβητείται η δυνατότητα αυτών των στελεχών να προκαλέσουν σοβαρές λοιμώξεις, όπως βακτηραιμία, περιτονίτιδα, λοιμώξεις κεντρικού νευρικού συστήματος. Οι βακτηραιμίες από αυτά τα στελέχη είναι συχνά πολυμικροβιακές και σχετίζονται με φλεγμονές των χοληφόρων (315). Η θνητότητά τους υπολογίζεται στο 13% (53, 266).

Επίσης δεν έχει διευκρινισθεί η σημασία τους σε περιπτώσεις αποικισμού του εντέρου. Στις έρευνες για αποικισμό από VRE απομονώνονται συχνά και στελέχη *E. gallinarum* και *E. casseliflavus/flavescens*. Πολλοί ερευνητές συμπεριλαμβάνουν και αυτά μαζί με τα στελέχη που φέρουν επίκτητο μηχανισμό αντοχής, ενώ άλλοι τα διαχωρίζουν. Στην πρώτη μελέτη επιπολασμού στο ΠΑΓΝΗ, αν και τα στελέχη αναφέρθηκαν ξεχωριστά κατά είδος και τύπο αντοχής, η ανάλυση των παραγόντων κινδύνου έγινε επί του συνόλου των αποικισμένων. Στην πολυκεντρική όμως μελέτη, η ανάλυση των παραγόντων κινδύνου έγινε επί των ασθενών που ήταν αποικισμένοι από VanA/VanB στελέχη.

Ωστόσο και αυτά τα είδη είναι δυνατόν να αποκτήσουν επιπρόσθετο μεταφερόμενο μηχανισμό αντοχής. Αυτή η δυνατότητα έχει περιγραφεί από τα πρώτα κιόλας χρόνια της εμφάνισης του VRE (88). Έκτοτε πυκνώνουν οι αναφορές για ανίχνευση στελεχών που παράλληλα με την φυσική αντοχή, διαθέτουν και επίκτητη αντοχή τύπου VanB (192, 288), ή VanA (42, 78, 113). Στην Αργεντινή μάλιστα περιγράφηκε ευρεία διασπορά σε μονάδα εντατικής νοσηλείας στελέχους *E. gallinarum vanA* (69). Στην δική μας μελέτη, ανιχνεύθηκαν σε πανεπιστημιακό νοσοκομείο της Κεντρικής Ελλάδος, στα πλαίσια της πολυκεντρικής μελέτης επιπολασμού για αποικισμό από VRE, ένα στέλεχος *E. gallinarum* και ένα στέλεχος *E. casseliflavus* που, εκτός από τον φυσικό τους γονότυπο, έφεραν και γονότυπο *vanA*. Αμφότερα τα στελέχη απομονώθηκαν από ασθενείς που παράλληλα έφεραν και στελέχη *E. faecium vanA*. Η κλινική και επιδημιολογική σημασία αυτών των στελεχών δεν διαφέρει των υπολοίπων ειδών εντεροκόκκων που διαθέτουν επίκτητη αντοχή στα γλυκοπεπτίδια. Ο κίνδυνος βρίσκεται στο ενδεχόμενο ανεπαρκούς προσδιορισμού αυτών. Αν δηλαδή, αρκεστεί κάποιος μόνο στην φαινοτυπική ταυτοποίηση του είδους και δεν προχωρήσει σε χαρακτηρισμό του γονότυπου αντοχής με μοριακές μεθόδους (67). Η δυσκολία είναι ακόμη μεγαλύτερη προκειμένου για στελέχη με *vanB* γονότυπο, γιατί και αυτός συνήθως εκφράζεται με

ευαισθησία στην τεϊκοπλανίνη και ενδιάμεση αντοχή (MIC από 8-64 µg/ml) στην βανκομυκίνη.

## **Z. ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ VRE.**

### **Z. 1. Σηµασία µοριακής διερεύνησης της επιδηµιολογίας του VRE.**

Η µοριακή ανάλυση στελεχών VRE µε PFGE χρησιµοποιήθηκε για την διερεύνηση επιδηµιών σε νοσοκοµεία (168, 169), για την διερεύνηση ενδηµικών στελεχών σε νοσοκοµεία (121, 192, 247), για την ανεύρεση γενετικής σχέσης µεταξύ στελεχών VRE αποµονωθέντων σε διαφορετικά νοσοκοµεία (78, 257, 223, 276, 318) και για την ανεύρεση γενετικής σχέσης µεταξύ στελεχών VRE ζωικής προέλευσης αφ' ενός και στελεχών αποµονωθέντων από ανθρώπους αφ' ετέρου (2, 139).

Στην παρούσα µελέτη, η ανάλυση µε PFGE αποσκοπούσε στην ανεύρεση στελεχών γενετικά όµοιων, αφ' ενός µεν σε καθένα από τα συµµετέχοντα νοσοκοµεία, αφ' ετέρου δε µεταξύ των νοσοκοµείων των συµµετεχόντων στην πολυκεντρική µελέτη. Το αποτέλεσµα ήταν να βρεθεί µικρότερη ή µεγαλύτερη διασπορά σε οµάδες µε κοινό πρότυπο κατά την PFGE ανάλυση, αλλά και κάποιες συσσωρεύσεις στελεχών µε κοινό PFGE πρότυπο σε κοινές οµάδες. Μόνο σε δύο νοσοκοµεία της ίδιας πόλης (HPA-1 και HPA-2) βρέθηκαν στελέχη µε κοινό PFGE πρότυπο.

Ο δεύτερος στόχος ήταν να διερευνηθούν τα στελέχη που αποµονώθηκαν στο HPA-1 (ΠΑΓΝΗ), να µελετηθούν οι γενετικές οµοιότητες και να διερευνηθεί το ενδεχόµενο διασποράς ενός, ή περισσότερων κλώνων. Το πλέον χαρακτηριστικό εύρηµα είναι ο µεγάλος κατακερµατισµός σε πολλές οµάδες από την εμφάνιση των πρώτων κιάλας κρουσµάτων. Δηλαδή, τα στελέχη της πρώτης περιόδου, αυτά που προκάλεσαν τα πρώτα κρούσµατα λοίµωξης και αυτά που αποµονώθηκαν στην πρώτη µελέτη επιπολασµού, ήταν γενετικά διαφορετικά µεταξύ τους, ανιχνεύθηκε για το καθένα ένα και

μοναδικό κρούσμα και εξαφανίστηκαν. Αντίθετα, στην τρίτη περίοδο παρατηρούνται συσσωρεύσεις στελεχών σε κοινό PFGE πρότυπο, γεγονός που δηλώνει την διασπορά κάποιων κλώνων σε τμήματα του νοσοκομείου, όπου οι συσχετίσεις είναι περισσότερο ή λιγότερο εμφανείς. Τρεις είναι οι μεγαλύτερες ομάδες στελεχών με κοινό PFGE πρότυπο: 2 ομάδες *E. faecium vanA* και 1 ομάδα *E. faecium vanB*. Και στις τρεις ομάδες η πλειονότητα των στελεχών τους προέρχεται από ασθενείς του συμπλέγματος αιματολογικής-νεφρολογικής-μονάδος τεχνητού νεφρού. Φαίνεται ότι το σύμπλεγμα αυτό λειτουργεί σαν εστία επώασης και διασποράς αυτών των στελεχών. Αντίθετα, τα στελέχη της MEΘ και των χειρουργικών κλινικών παρουσιάζονται διασπαρμένα σε πολλές PFGE ομάδες.

Από αυτές τις διαπιστώσεις φαίνεται ότι τελικά οι μέθοδοι μοριακής ανάλυσης μπορούν να βοηθήσουν στην κατανόηση της επιδημιολογίας μικροβίων, όπως ο VRE.

Αντίστοιχες διεθνείς μελέτες δίνουν ανάλογα αποτελέσματα. Με την χρήση μεθόδων μοριακής ανάλυσης από τους Bodnar και συν, αποδείχθηκε ότι, επιδημία από *E. faecalis vanB* ήταν μονοκλωνική και διερευνήθηκε η συσχέτιση των ασθενών και ο τρόπος διασποράς, που δεν ήταν κατανοητός σε πρώτη ανάγνωση, αλλά απαιτούσε διερεύνηση σε βάθος (23). Ομοίως, σε άλλη μελέτη από τους Bischoff και συν, με μεθόδους μοριακής ανάλυσης, παρακολουθείται η τοπική και χρονική διασπορά διαφορετικών κλώνων σε νοσοκομείο με ενδημική παρουσία του VRE για μια πενταετία. Στην διάρκεια της πενταετίας, το αρχικό ενδημικό στέλεχος εξαφανίζεται, ενώ νέοι κλώνοι εμφανίζονται και επικρατούν (22).

Όμως η μοριακή ανάλυση και μελέτη μπορεί να εντοπίζεται μόνο στα μεταθετά στοιχεία που φέρουν και μεταφέρουν το σύμπλεγμα των γονιδίων αντοχής στα γλυκοπεπτίδια και να αναζητεί την γενετική συσχέτιση αυτών των στοιχείων. Δεκαοκτώ *vanA* στελέχη προερχόμενα από διαφορετικές χώρες μελετήθηκαν από τους Schouten και συν με μοριακή ανάλυση του Tn1546-like transposon. Η ανάλυση αυτή έγινε με RFLP (restriction

fragment length polymorphism) και DNA sequencing τμημάτων του transposon που ελήφθησαν με PCR. Απέδειξε την παρουσία υποτύπων του transposon και με βάση την γενετική τους συσχέτιση κατετάγησαν σε δύο ομάδες συγγένειας (lineages) που είχαν ξεχωριστή γεωγραφική κατανομή. Η μία ομάδα κατανέμεται σε στελέχη προερχόμενα από την κυρίως Ευρώπη και η άλλη σε στελέχη από το Ηνωμένο Βασίλειο και το Ισραήλ (290).

## **Z. 2. Επιδημιολογικά πρότυπα**

Δύο ακραία επιδημιολογικά πρότυπα που έχουν διερευνηθεί και αφορούν μονάδες εντατικής νοσηλείας αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα της πολυπλοκότητας στην επιδημιολογία του VRE.

Οι Boyce και συν περιέγραψαν την διερεύνηση μιας μονοκλωνικής επιδημίας από VanB *E. faecium* σε μία μονάδα εντατικής νοσηλείας (30). Η επιδημιολογική διερεύνηση οδήγησε στην διαπίστωση, ότι ο σημαντικός παράγοντας κινδύνου για αποικισμό, ή νόσηση από VRE ήταν η γειτνίαση με άλλο ασθενή που είχε VRE και η νοσηλεία από νοσηλευτή που, στην ίδια βάρδια, φρόντιζε και κάποιο άλλον ασθενή με VRE. Δηλαδή, ο σημαντικότερος τρόπος μετάδοσης ήταν οι νοσηλευτικοί χειρισμοί. Παράλληλα, από τις καλλιέργειες περιβάλλοντος, το επιδημικό στέλεχος απομονώθηκε από πολλές επιφάνειες στο δωμάτιο του πάσχοντα, ιδιαίτερα αν αυτός είχε διαρροϊκές κενώσεις. Πρόκειται για ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα μονοκλωνικής επιδημίας που η διασπορά του στελέχους έγινε κυρίως από νοσηλευτικούς χειρισμούς.

Στον αντίποδα αυτής της μελέτης, οι Bonten και συν σε μία προοπτική μελέτη (25), παρακολούθησαν τον αποικισμό των ασθενών και την επιμόλυνση του περιβάλλοντος σε μια 16-κλινη παθολογική μονάδα εντατικής νοσηλείας. Σε διάστημα 7 εβδομάδων παρακολούθησαν 38 ασθενείς, εκ των οποίων 9 (24%) ήταν ήδη αποικισμένοι από VRE όταν μπήκαν στην μονάδα, ενώ άλλοι 12 (41%) αποικίσθηκαν κατά την διάρκεια της νοσηλείας τους στην μονάδα. Οι ασθενείς παρέμειναν αποικισμένοι για

αρκετό διάστημα. Διαπιστώθηκε επίσης επιμόλυνση του περιβάλλοντος. Η μοριακή επιδημιολογική ανάλυση έδειξε ότι η διασταυρούμενη μεταφορά ήταν και εδώ ο σημαντικότερος τρόπος μετάδοσης, όμως, επειδή ο VRE ενδημούσε για αρκετό διάστημα στο εν λόγω νοσοκομείο, ταυτοποιήθηκαν 20 διαφορετικά στελέχη στην μονάδα για την συγκεκριμένη περίοδο. Ένα άλλο σημαντικό εύρημα αυτής της μελέτης είναι ότι μόνο σε 5 από αυτούς τους ασθενείς διαγνώστηκε VRE λοίμωξη. Οι υπόλοιποι ήταν απλώς αποικισμένοι και θα μπορούσαν να μην διαγνωστούν αν δεν γίνονταν οι ειδικές εξετάσεις αποικισμού.

Η μελέτη της επιδημιολογίας των βακτηριαμιών από VRE από τους Kim και συν (170), σε ένα νοσοκομείο όπου ενδημούσε για 6 έτη, έδειξε ότι για τα τρία πρώτα χρόνια ένα στέλεχος *E. faecium vanB* ήταν υπεύθυνο για την πλειονότητα (75%) των περιστατικών. Αλλά και μεταγενέστερα συνέβησαν αθροίσματα περιστατικών που οφείλονταν σε ένα κοινό στέλεχος. Έτσι, κατά την διαδρομή των 6 χρόνων, μέσα στην πολυκλωνικότητα, υπήρχαν αθροίσματα οφειλόμενα σε μονοκλωνική διασπορά.

Έχοντας κατά νουν τα επιδημιολογικά πρότυπα του VRE, που έχουν ήδη περιγραφεί, προσπαθούμε να κατανοήσουμε την επιδημιολογία του VRE στο δικό μας χώρο. Επικρατεί η αντίληψη, ότι η αρχική είσοδος του VRE σε ένα νοσοκομείο προκαλεί αρχικά μία μονοκλωνική διασπορά, που με την παρέλευση του χρόνου καταλήγει σε πολυκλωνικότητα, και μπορεί να εκφραστεί είτε ως επιδημία (μονοκλωνική, ή πολυκλωνική), είτε ως ενδημία (147). Στη δική μας περίπτωση, τα γεγονότα εξελίχθηκαν διαφορετικά. Μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα εμφανίστηκαν κρούσματα σε συρροή, αλλά οφειλόμενα σε στελέχη γενετικά ανόμοια, τα οποία στην συνέχεια εξαφανίστηκαν. Μεταγενέστερα αναδύθηκαν διαφορετικά στελέχη με ευρύτερη διασπορά στο νοσοκομείο, αλλά και με εστίες μονοκλωνικής διασποράς που παρουσιάζουν και συγκεκριμένη χωροταξική προτίμηση. Ένα άλλο εύρημα είναι η κοινή ομάδα με το Βενιζέλειο. Το ενδημικό στέλεχος του Βενιζελείου, εντοπίστηκε και στο δικό μας νοσοκομείο, αρχικά σε



αποικισμένους ασθενείς κατά την πολυκεντρική μελέτη επιπολασμού και αργότερα απομονώθηκε από ασθενείς με λοίμωξη. Το ερώτημα είναι αν έγινε εισαγωγή αυτού του στελέχους από το Βενιζέλειο και προστέθηκε και αυτό στα υπόλοιπα στελέχη, ή αν έγινε εξαγωγή από το δικό μας νοσοκομείο προς το Βενιζέλειο, όπου για κάποιο λόγο προκάλεσε αυτήν την μονοκλωνική διασπορά.

Άλλες μελέτες δείχνουν ότι, σε περιπτώσεις πολυκλωνικής ενδημίας, στην πορεία του χρόνου, κάποιοι κλώνοι επικρατούν και καθίστανται κυρίαρχοι (121). Τέτοιοι κλώνοι μάλιστα, φαίνεται να διαπερνούν τα όρια των νοσοκομείων, ακόμη και των κρατών και να παρουσιάζουν παγκόσμια διασπορά. Η υπόθεση ότι κάποια στελέχη εντεροκόκκων συνδυάζουν περισσότερα του ενός χαρακτηριστικά που τους δίνουν συγκριτικό πλεονέκτημα και ενδεχομένως μεταφέρονται με το ίδιο όχημα, οδήγησε στην διερεύνηση τέτοιων συνδυασμών. Ο συνδυασμός γονιδίων αντοχής και γονιδίων παθογενετικότητας φαίνεται πως είναι ο συνδυασμός που καθιστά κάποια στελέχη ιδιαίτερα επιθετικά. Στελέχη VRE από 19 νοσοκομεία της Ιταλίας σε διαφορετικές περιοχές που είχαν προκαλέσει βακτηριαιμίες, *E. faecium vanA* με PFGE ανάλυση κατετάγησαν στην ίδια ομάδα, είχαν τον ίδιο φαινότυπο αντοχής στα αντιβιοτικά και έφεραν το *esp* γονίδιο (296). Γονίδια παθογενετικότητας αναζητήθηκαν και σε στελέχη VRE προερχόμενα από 8 Ευρωπαϊκές χώρες. Η παρουσία του *esp* γονιδίου ήταν συχνότερη στα κλινικά στελέχη απ' ό,τι στα εντερικά και επικρατούσε στα στελέχη τα προερχόμενα από την Ιταλία, ενώ στα στελέχη από το Ηνωμένο Βασίλειο επικρατούσε η παρουσία του *hyl* γονιδίου. Η ανάλυση κατά PFGE έδειξε την παρουσία δύο κλώνων θετικών για *esp* στην Ιταλία και ενός κλώνου θετικού για *hyl* στο Ηνωμένο Βασίλειο (316). Κλώνος *E. faecium* που συνδυάζει 1) αντοχή στην αμικικιλίνη, 2) ένα νησίδιο παθογενετικότητας και 3) πρόκληση νοσοκομειακών επιδημιών (complex-17), παρουσιάζει ήδη παγκόσμια διασπορά και με την οριζόντια γενετική μεταφορά *vanA*, ή *vanB* μεταθετού στοιχείου κατέληξε σε VRE που έχει

διασπαρεί και στις 5 ηπείρους και αποτελεί παγκόσμια απειλή, ιδίως από το γεγονός της δυνατότητας μεταφοράς του γονιδιακού συμπλέγματος σε πιο επιθετικά μικρόβια, όπως οι MRSA (331).

Ένα άλλο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό στην επιδημιολογία του VRE στο νοσοκομείο μας είναι το γεγονός της αρχικής επικράτησης του VanB τύπου αντοχής, σε αντίθεση με το ευρωπαϊκό πρότυπο, που θέλει επικρατέστερο τον φαινότυπο VanA (289) και κατ' αναλογία με το αμερικανικό πρότυπο αρχικής επικράτησης του VanB (30, 257). Αλλά, και η μετέπειτα εξέλιξη προς εξαφάνιση του VanB και επικράτηση του VanA, σε εναρμόνιση με το ελληνικό και ευρωπαϊκό γίνεσθαι, ομοιάζει με την περιγραφείσα από τους Kim και συν επιδημιολογία (170) και την γενικότερη τάση που επικρατεί και στην Αμερική για υποχώρηση του VanB και επικράτηση του VanA (235).

### **Z. 3. Ποικιλομορφία στελεχών VRE απομονωθέντων από τον ίδιο ασθενή.**

Η απομόνωση πολλαπλών στελεχών από τον ίδιο ασθενή που έχουν τον ίδιο τύπο αντοχής, όμως ανήκουν σε διαφορετικά είδη και διαφοροποιούνται σε διαφορετικές ομάδες κατά την PFGE ανάλυση, έχει ήδη περιγραφεί (309). Σε αυτήν την μελέτη βρέθηκε επίσης, ότι στελέχη που κατατάχθηκαν στην ίδια PFGE ομάδα έφεραν διαφορετικά VanA στοιχεία. Αυτή η διαφοροποίηση στο γενετικό υλικό του VanA συμπλέγματος ή μεταθετού του στοιχείου οφείλεται σε εισαγωγή ή απόσπαση IS (insertion sequences) και αποτελεί άλλη μία πτυχή στην ούτως ή άλλως πολυσύνθετη μοριακή επιδημιολογία του VRE. Ανάλογη ποικιλομορφία στελεχών διαγνώσθηκε και σε ένα από τα δικά μας περιστατικά λοίμωξης. Πρόκειται για το τρίτο κατά σειρά εμφάνισης περιστατικό, που αναφέρεται ως ΠΕΡ Γ και περιγράφεται αναλυτικά στην πρώτη ενότητα. Στη διάρκεια της τριακονταήμερης νοσηλείας, που επακολούθησε μετά την αρχική διάγνωση της VRE λοίμωξης, απομονώθηκαν στελέχη που κατετάγησαν σε 5 διαφορετικές PFGE ομάδες. Παράλληλα, τα στελέχη αυτά διέφεραν και ως προς τον

φαινότυπο αντοχής στα άλλα αντιβιοτικά. Αλλά, και σε 5 από τις άλλες 7 περιπτώσεις απομόνωσης διπλών στελεχών από τον ίδιο ασθενή, η PFGE ανάλυση έδειξε ότι παρουσίαζαν διαφορετικό πρότυπο και κατά συνέπεια δεν ήταν ταυτόσημα γενετικά.

Τα ευρήματα αυτά δείχνουν πόσο γρήγορα τα στελέχη VRE διαφοροποιούνται ακόμα και επί του ίδιου ασθενούς, πόσο μάλλον κατά την μετάδοση από ασθενή σε ασθενή. Αν αυτό γίνεται μέσω προσάρτησης άλλου γενετικού υλικού από το ήδη ανθεκτικό στέλεχος, ή μέσω μεταφοράς του συμπλέγματος γονιδίων σε άλλο διαφορετικό στέλεχος, απαιτεί βαθύτερη μοριακή διερεύνηση. Φαίνεται όμως ότι και οι δύο μηχανισμοί λαμβάνουν χώρα.

## **Η. ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΥΤΩΝ**

Η παρούσα μελέτη αποσκοπούσε στην καταγραφή, παρακολούθηση και διερεύνηση και με μοριακές μεθόδους της επιδημιολογίας του VRE. Η μελέτη ξεκίνησε με την πρώτη εμφάνιση του VRE στο ΠΑΓΝΗ, την διεξαγωγή της πρώτης μελέτης επιπολασμού για αποικισμό του γαστρεντερικού από VRE στους ασθενείς του νοσοκομείου και παρακολούθησε την πορεία του μέσα στο νοσοκομείο για μία τετραετία. Παράλληλα, με την διεξαγωγή της πολυκεντρικής μελέτης επιπολασμού του γαστρεντερικού από VRE σε 13 Ελληνικά νοσοκομεία (μεταξύ των οποίων και το ΠΑΓΝΗ), επιχειρήθηκε η καταγραφή του προβλήματος σε ευρύτερη κλίμακα εντός της χώρας και η συσχέτιση της επικρατούσας κατάστασης στο ΠΑΓΝΗ με αυτήν την καταγραφή. Ωστόσο πρέπει να επισημανθεί ότι δεν πρόκειται για καταγραφή και μελέτη ενός φαινομένου που εξελίσσεται απρόσκοπτα, αλλά υπόκειται στις παρεμβάσεις και στην εφαρμογή μέτρων ελέγχου και περιορισμού της εξάπλωσης του VRE, τα οποία εφαρμόζονται με άλλοτε μικρότερη και άλλοτε μεγαλύτερη αυστηρότητα.

Τα αποτελέσματα της μελέτης συνοψίζονται στα εξής:

- Ο VRE έκανε την εμφάνισή του στο ΠΑΓΝΗ, ενώ είχε ήδη καταγραφεί η παρουσία του σε άλλα ελληνικά νοσοκομεία.
- Η εμφάνισή του ήταν αρκετά ανησυχητική, αφού προκάλεσε 5 περιστατικά λοίμωξης σε 30 ημέρες και η μελέτη επιπολασμού που ακολούθησε έδειξε διασπορά αυτού σε αρκετά τμήματα του νοσοκομείου.
- Η εξάπλωση αυτού περιορίστηκε, αφού στο διάστημα που ακολούθησε μειώθηκαν εντυπωσιακά τα περιστατικά λοίμωξης από VRE ( 4 περιστατικά σε 21 μήνες ).
- Παρά την μείωση των περιστατικών λοίμωξης, η μελέτη επιπολασμού για αποικισμό που έγινε στα πλαίσια της πολυκεντρικής μελέτης, έδειξε μεγαλύτερο επιπολασμό και ευρύτερη διασπορά στο νοσοκομείο.
- Έκτοτε ο αριθμός των περιστατικών λοίμωξης από VRE βαίνει αυξανόμενος, πιθανόν επειδή ατόνησαν τα μέτρα ελέγχου και περιορισμού της διασποράς αυτού.
- Ο προσδιορισμός της επίπτωσης των λοιμώξεων από VRE κατά τμήματα, οι τιμές επιπολασμού για αποικισμό του γαστρεντερικού κατά τμήματα και η μελέτη με μοριακές μεθόδους των απομονωθέντων στελεχών, ανέδειξαν την αυξημένη παρουσία του VRE σε κάποια τμήματα του νοσοκομείου και σε κάποιες ομάδες ασθενών που πιθανόν λειτουργούν σαν εστίες διατήρησης και διασποράς αυτού.
- Οι δύο μελέτες επιπολασμού για αποικισμό του γαστρεντερικού ανέδειξαν και παράγοντες κινδύνου, μεταξύ των οποίων προεξάρχουσα θέση κατέχει η χορήγηση αντιβιοτικών.
- Η μελέτη της ευαισθησίας των VRE σε ένα φάσμα αποτελούμενο από 14 αντιβιοτικά ανέδειξε τον πολυανθεκτικό χαρακτήρα των στελεχών αυτών και τις περιορισμένες επί του παρόντος δυνατότητες

θεραπευτικής αντιμετώπισης των λοιμώξεων από VRE με την χρήση αντιβιοτικών.

Ο προβληματισμός για τον τρόπο αντιμετώπισης του VRE που κάνει όλο και εντονότερη την παρουσία του παραμένει ισχυρός. Η ανησυχία για την εξάπλωσή του παραμένει και πρέπει να παραμείνει έντονη και να οδηγήσει στην λήψη αυστηρότερων μέτρων ελέγχου. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης μπορούν να αξιοποιηθούν κατάλληλα.

- Εφαρμογή με συνέπεια και αυστηρότητα των ενδεδειγμένων μέτρων απομόνωσης και περιορισμού σε κάθε περίπτωση λοίμωξης ή αποικισμού από VRE.
- Έλεγχος για αποικισμό από VRE όλων των ασθενών που νοσηλεύονται στον ίδιο θάλαμο σε κάθε νέο περιστατικό που διαγιγνώσκεται.
- Επισήμανση των ασθενών που φέρουν VRE, ώστε να λαμβάνονται τα απαραίτητα μέτρα σε κάθε μετακίνηση, ή νέα εισαγωγή αυτών μέχρι να αποδειχθεί με ασφαλή τρόπο ότι δεν φέρουν πλέον VRE.
- Οι ασθενείς που φέρουν VRE θα πρέπει να προστατεύονται από άσκοπη και αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών, η οποία εκτός των άλλων συντηρεί την παρουσία του VRE και αυξάνει τις πιθανότητες να αποκτήσει και νέες αντοχές.
- Ορθολογική χρήση αντιβιοτικών, ιδίως των γλυκοπεπτιδίων και προστασία των αντιβιοτικών εκείνων, όπως της λινεζολίδης, που παραμένουν ακόμη δραστικά έναντι του εντεροκόκκου.
- Η παρέμβαση μπορεί να είναι μεγαλύτερη και πιο ουσιαστική στα τμήματα του νοσοκομείου και στις ομάδες ασθενών με την μεγαλύτερη επιβάρυνση. Σε αυτές τις περιπτώσεις δυνατόν να ληφθούν και επιπρόσθετα μέτρα ανάλογα με τις εκάστοτε ιδιαιτερότητες, π.χ. να γίνει ενημέρωση του ιατρικού και νοσηλευτικού προσωπικού, ή να προσαρμοσθούν τα μέτρα στις ιδιαιτερότητες της ομάδος. Σε ομάδες ασθενών που προσέρχονται

σταθερά και κατά διαστήματα στο νοσοκομείο για μακρό χρονικό διάστημα (π.χ. νεφροπαθείς) μπορεί να γίνει έλεγχος για αποικισμό όλων των ασθενών και κάθε νέο-εισερχόμενου, ώστε ο κάθε ασθενής να αντιμετωπίζεται και να προστατεύεται ανάλογα.

- Χρήσιμο θα ήταν επίσης να μελετηθεί και το γεγονός της παρουσίας του VRE σε εξωνοσοκομειακό περιβάλλον, γιατί ενδέχεται τα στελέχη να εισάγονται από την κοινότητα, ή από άλλα νοσοκομεία.

## **ΕΠΙΛΟΓΟΣ**

Το γεγονός της εμφάνισης της αντοχής στην βανκομυκίνη υπενθυμίζει τι μπορούν να κάνουν τα μικρόβια για να επιβιώσουν κάτω από εντατική πίεση. Για ένα τέταρτο του αιώνα, όταν η βανκομυκίνη ήταν αντιβιοτικό δεύτερης και τρίτης επιλογής, η αντοχή σ' αυτήν παρέμεινε άγνωστη. Όταν η χρήση της στη θεραπεία των λοιμώξεων αυξήθηκε σημαντικά και συνδυάστηκε με την αλόγιστη χρήση γλυκοπεπτιδίων στην κτηνοτροφία, ως παραγόντων ανάπτυξης των εκτρεφόμενων ζώων, τότε αναδύθηκε με δραματικό τρόπο το φαινόμενο της αντοχής στα γλυκοπεπτίδια.

Η επιδημιολογία του VRE κρύβει πολλές αθέατες πλευρές και ανεξερεύνητες πτυχές παρά την πληθώρα των μελετών επ' αυτής. Με την διερεύνηση του VRE δημιουργείται η εντύπωση ότι αυτό που τελικά βλέπουμε είναι η κορυφή του παγόβουνου. Τα πιο σημαντικά γεγονότα συντελούνται κάτω από την επιφάνεια του νερού, δηλαδή στους χώρους παραμονής και στις εστίες διασποράς του εντεροκόκκου όπου τα στελέχη μεταλλάσσονται και ενδεχομένως νέοι μηχανισμοί αντοχής διαμορφώνονται.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Aarestrup FM, Seyfarth AM, Emborg HD, Pedersen K, Hendriksen RS, and Bager F.** Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2054-9.
2. **Aarestrup FM.** Characterization of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* (GRE) from broilers and pigs in Denmark: genetic evidence that persistence of GRE in pig herds is associated with coselection by resistance to macrolides. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2774-7.
3. **Aarestrup FM.** Occurrence of glycopeptide resistance among *E. faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. *Microb Drug Resist* 1995; 1: 255-7.
4. **Al-Obeid S, Billot-Klein D, van Heijenoort J, Collatz E, and Gutmann L.** Replacement of the essential penicillin-binding protein 5 by high-molecular mass PBPs may explain vancomycin- $\beta$ -lactam synergy in low-level vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* D366. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 91: 79-84
5. **Arthur M, and Courvalin P.** Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1563-71.
6. **Arthur M, Depardieu F, Gerbaud G, Gallimand M, Leclercq R, and Courvalin P.** The VanS sensor negatively controls VanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction. *J Bacteriol* 1997; 179: 97-106.
7. **Arthur M, Depardieu F, Molinas C, Reynolds P, and Courvalin P.** The VanZ gene of Tn1546 from *Enterococcus* BM4147 confers resistance to teicoplanin. *Gene* 1995; 154: 87-92.
8. **Arthur M, Depardieu F, Reynolds P, and Courvalin P.** Quantitative analysis of the metabolism of soluble cytoplasmic peptidoglycan precursors of glycopeptide resistance enterococci. *Mol Microbiol* 1996; 21: 33-44.
9. **Arthur M, Molinas C, Depardieu F, and Courvalin P.** Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol* 1993; 175: 117-27.
10. **Arthur M, Molinas C, Dutka-Malen S, and Courvalin P.** Structural relationship between the vancomycin resistance protein VanH and 2-hydroxycarboxylic acid dehydrogenases. *Gene* 1991; 103: 133-4.
11. **Ballow CH, Jones RN, and Biedenbach DJ.** A multicenter evaluation of linezolid antimicrobial activity in North America. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 43: 75-83.
12. **Baptista M, Depardieu F, Courvalin P, and Arthur M.** Specificity of induction of glycopeptide resistance genes in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2291-5.
13. **Barna JCJ, Williams DH.** The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of vancomycin group. *Ann Rev Microbiol* 1984; 38: 339-57.
14. **Barbier N, Saulnier P, Chachaty E, Dumontier S, and Andremont A.** Random amplified polymorphic DNA typing versus pulsed-field gel

- electrophoresis for epidemiological typing of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1096-9.
15. **Bartoloni A, Colao MG, Orsi A, Dei R, Giganti E, and Parenti F.** In vitro activity of vancomycin, teicoplanin, daptomycin, MDL 62873 and other agents against staphylococci, enterococci and *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother* 1990; 26: 627-33.
  16. **Bates J, Jordens JZ, and Griffiths DT.** Farm animal as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34: 507-16.
  17. **Bavikatte K, Schreiner RL, Lemons JA and Gresham EL.** Group D streptococcal septicaemia in the neonate. *Am J Dis Child* 1979; 133: 493-6.
  18. **Beezhold DW, Slaughter S, Hayden MK, Matushek M, Nathan C, Trenholme GM, and Weinstein RA.** Skin colonization with vancomycin-resistant enterococci among hospitalized patients with bacteremia. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 704-6.
  19. **Bell JM, Paton JC, and Turnidge J.** Emergence of vancomycin-resistant Enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2187-90.
  20. **Biavasco F, Paladini C, Vignaroli C, Foglia G, Manso E, and Varaldo PE.** Recovery from a single blood culture of two *Enterococcus gallinarum* isolates carrying both *vanC-1* and *vanA* cluster genes and differing in glycopeptide susceptibility. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2001; 20: 309-314.
  21. **Bingen E, Lambert-Zechovsky N, Leclercq R, Doit C, and Mariani-Kurkdjian.** Bactericidal activity of vancomycin, daptomycin, ampicillin and aminoglycosides against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother* 1990; 26: 619-26.
  22. **Bischoff WE, Reynolds TM, Hall GO, Wenzel RP, and Edmond MB.** Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a large urban hospital over a 5-year period. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3912-6.
  23. **Bodnar UR, Noskin GA, Suriano T, Cooper I, Reisberg BE, and Peterson LR.** Use of in-house studies of molecular epidemiology and full species identification for controlling spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolates. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2129-32.
  24. **Boisivon A, Thibault M, and Leclercq R.** Colonization by vancomycin-resistant enterococci of the intestinal tract of patients in intensive care units from French general hospitals. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3: 175-9.
  25. **Bonten MJ, Hayden MK, Nathan C, Rice TW, and Weinstein RA.** The epidemiology of patient colonization and environmental contamination with vancomycin-resistant enterococci: the challenge for infection control. *Lancet* 1996; 348: 1615-9.
  26. **Bonten MJ, Slaughter S, Ambergen AW, Hayden MK, van Voorhis J, Nathan C, and Weinstein RA.** The role of "colonization pressure" in the spread of vancomycin-resistant enterococci. *Arch Intern Med* 1998; 158: 1127-32.
  27. **Boyce JM.** Vancomycin-resistant enterococci: pervasive and persistent pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 116: 676-9.
  28. **Boyce JM.** Vancomycin-resistant enterococcus: detection, epidemiology and control measures. *Infect Dis North Am* 1997; 11: 367-84.



29. **Boyce JM, Mermel LA, Zervos MJ, Rice BL, Potter-Bynoe G, Giorgio C, and Medeiros AA.** Controlling vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16: 634–7.
30. **Boyce JM, Opal SM, Chow JW, Zervos MJ, Potter-Bynoe G, Sherman CB, Romulo RL, Fortna S, and Medeiros AA.** Outbreak of multi-drug resistant *Enterococcus faecium* with transferable VanB class vancomycin resistance. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1148–53.
31. **Boyd DA, Conly J, Dedier H, Peters G, Robertson L, Slater E, and Mulvey MR.** Molecular characterization of the *vanD* gene cluster and a novel insertion element in a vancomycin-resistant *Enterococcus* isolated in Canada. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2392-4.
32. **Boyd DA, Kibsey P, Roscoe D, and Mulvey MR.** *Enterococcus faecium* N03-0072 carries a new VanD-type vancomycin resistance determinant: Characterization of the VanD5 operon. *J Antimicrob Chemother* 2004;
33. **Boyle JF, Soumakis SA, Rondo A, Herrington JA, Gianarkis DG, Thurberg BE, and Painter BG.** Epidemiologic analysis and genotypic characterization of nosocomial outbreak of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1280-5.
34. **Brandt CM, Rouse MS, Laue NW, Stratton CW, Wilson WR, and Steckelberg JM.** Effective treatment of multi-drug resistant enterococcal experimental endocarditis with combinations of cell-wall active agents. *J Infect Dis* 1996; 173: 909-13.
35. **Bryan Le, and Van Den Elzen HM.** Effects of membrane-energy mutations and cations on streptomycin and gentamicin accumulation by bacteria: a model for entry of streptomycin and gentamicin in susceptible and resistant bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; 12: 163-77.
36. **Bryce EA, Zemcov SJV, Clarke AM.** Species identification and antibiotic resistance patterns of the enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 745-7.
37. **Bugg TDH, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P, and Walsh CT.** Identification of vancomycin resistant protein VanA as a D-alanine- D-alanine lidase of altered substrate specificity. *Biochemistry* 1991; 30: 2017-21.
38. **Bugg TDH, Wright GD, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P, and Walsh CT.** Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry* 1991; 30: 1408-15.
39. **Burney S, Landman D, and Quale JM.** Activity of clinafloxacin against multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 68-70.
40. **Buschelman BJ, Bale MJ, and Jones RN.** Species identification and determination of high-level aminoglycosides resistance among enterococci; comparison study of sterile body fluid isolates, 1985-1991. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993; 16: 119-22.
41. **Butz AM, Laughon BE, Gulette DL, and Larson E.** Alcohol impregnated wipes as an alternative in hand hygiene. *Am J Infect Control* 1990; 18: 70-6.
42. **Camargo ILCB, Barth AL, Pilger K, Seligman BGS, Machado ARL and Darini ALC.** *Enterococcus gallinarum* carrying the *vanA* gene cluster: first report in Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2004; 37: 1669-1671.

43. **Caron F, Pestel M, Kitzis MD, Lemeland JF, Hambert G, and Gutmann L.** Comparison of different  $\beta$ -lactam-glycopeptide-gentamicin combinations for an experimental endocarditis caused by a highly  $\beta$ -lactam-resistant and highly glycopeptide resistant isolate of *Enterococcus faecium*. *J Infect Dis* 1995; 17: 106-12.
44. **Cartwright CP, Stock F, Fahle GA and Gill V.** Comparison of pigment production and motility tests with PCR for reliable identification of intrinsically vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1931-3.
45. **Centers for Disease Control and Prevention.** Nosocomial Enterococci resistant to vancomycin-United States, 1989–1993. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1993; 42: 597–9.
46. **Centers for Disease Control and Prevention.** National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. *Am. J. Infect. Control* 27:520-532.
47. **Centers for Disease Control and Prevention.** Preventing the spread of vancomycin resistance-report from the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Federal Register* 1994; 59: 25758-63.
48. **Centers for Disease Control and Prevention.** Recommendations for preventing spread of vancomycin resistance. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16: 105-13.
49. **Cercenado A, Eliopoulos GM, Wennersten CB, and Moellering RC.** Absence of synergistic activity between ampicillin and vancomycin against highly vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 2201-3.
50. **Cetinkaya Y, Falk P, and Mayhall CG.** Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev* 2000; 13:686-707.
51. **Chavers LS, Moseri SA, Benjamin Jr WH, Banks SE, Steinhauer JR, Smith AM, Johnson CN, Funkhouser E, Chavers LP, Stamm AM, and Waites KB.** Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. *J Hospit Infect* 2002; 53: 159-71.
52. **Chia JKS, Nakata MM, Park SS, Lewis RP, and McKnee B.** Use of bacitracin therapy for infection due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 1520.
53. **Choi SH, Lee SO, Kim TH, Chung JW, Choo EJ, Kwak YG, Kim MN, Kim YS, Woo JH, Ryu J, and Kim NJ.** Clinical features and outcomes of bacteremia caused by *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum*: analysis of 56 cases. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 53-61.
54. **Chow JW, Davidson A, Sanford III E, and Zervos MJ.** Superinfection with *Enterococcus faecalis* during quinupristin/dalfopristin therapy. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 91-2.
55. **Chow JW, Donabedian SM, and Zervos MJ.** Emergence of increased resistance to quinupristin/dalfopristin during therapy for *Enterococcus faecium* bacteremia. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 90-1.
56. **Chow JW, Kuritza A, Shlaes DM, Green M, Sahm DF, and Zervos MJ.** Clonal spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* between patients in three hospitals in two states. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1609-11.
57. **Chow JW, Thal LA, Perri MB, Vazquez JA, Donabedian SM, Clewell DB, and Zervos MJ.** Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance

- production contributes to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2472-7.
58. **Christenson JC, Korgenski EK, Jenkins E, and Daly JA.** Detection of vancomycin-resistant enterococci colonization in a children's hospital. *Am. J. Infect. Control* 1998; 26:569-571.
  59. **Clark NC, Cooksey RC, Hill BC, Swenson JM, and Tenover FC.** Characterization of glycopeptide-resistant Enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2311-7.
  60. **Clark NC, Teixeira LM, Facklam RR, and Tenover FC.** Detection and differentiation of *vanC-1*, *vanC-2*, and *vanC-3* glycopeptide resistance genes in enterococci. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2295-7.
  61. **Clark NC, Weigel LM, Patel JB, Tenover FC.** Comparison of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Michigan and Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(1): 470-2.
  62. **Clewell DB.** Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9: 90-102.
  63. **Clewell DB.** Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell* 1993; 73: 9-12.
  64. **Clewell DB.** Plasmids, drug resistance, and gene transfer in the genus *Streptococcus*. *Microbiol Rev* 1981; 45: 409-36.
  65. **Clewell DB.** Conjugative transposon and the dissemination of antibiotic resistance in streptococci. *Annu Rev Microbiol* 1986; 40: 635-59.
  66. **Collins LA, Eliopoulos GM, Wennersten CB, Ferrara MJ, and Moellering RC, Jr.** In vitro activity of ramoplanin against vancomycin-resistant gram-positive organisms. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1363-6.
  67. **Coombs GW, Kay ID, Steven RA, Pearman JW, Bertolatti D, and Grubb WB.** Should genotypic testing be done on all phenotypically vancomycin-resistant enterococci detected in hospitals? *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1229-30.
  68. **Coque TM, Tomayko JF, Ricke SC, Okhyusen PC, and Murray BE.** Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40: 2605-2609.
  69. **Corso A, Faccone D, Gagetti P, Togneri A, Lopardo H, Melano R, Rodriguez V, Rodriguez M, and Galas M.** First report of VanA *Enterococcus gallinarum* dissemination within an intensive care unit in Argentina. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2005; 25: 51-56.
  70. **Costa Y, Galimand M, Leclercq R, Duval J, and Courvalin P.** Characterization of chromosomal *aac(6')-Ii* gene specific for *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1896-903.
  71. **Costa LMD, Reynolds PE, Souza APHM, Souza DC, Palepou MFI, and Woodford N.** Characterization of a divergent *vanD*-type resistance element from the first glycopeptide-resistant strain of *Enterococcus faecium* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3444-6.
  72. **Courvalin P.** Resistance of enterococci to glycopeptides. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 2291-4.
  73. **Courvalin P, Carlier C, and Collatz E.** Structural and functional relationships between aminoglycoside-modifying enzymes from streptococci

- and staphylococci. Mitsuhashi S, Rosival L, Kremery V, eds. Medical and biological aspects of resistant strains. Berlin: Springer-Verlag, 1980; 309-20.
74. **Dahl KH, Simonsen GS, Olsvik O, and Sundsfjord.** Heterogeneity in the *vanB* gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1105-10.
  75. **Dahms RA, Johnson E, Statz CL, Lee JT, Dunn DL, and Beilman GJ.** Third generation cephalosporins and vancomycin as risk factors for postoperative vancomycin-resistant *Enterococcus* infection. *Arch Surg* 1998; 133: 1343-6.
  76. **DeGroot-Kosolcharoen J, and Jones JM.** Permeability of latex and vinyl glove to water and blood. *Am J Infect Control* 1989; 17: 196-202.
  77. **Demertzi E, Palepou MF, Kaufmann ME, Avlami A, Woodford N.** Characterization of VanA and VanB elements from glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* from Greece. *J Med Microbiol* 2001; 50: 682-7.
  78. **Descheemaeker P, Ieven M, Chapelle S, Lammens C, Hauchecorne M, Wijdooghe M, Vandamme P, Goossens H.** Prevalence and molecular epidemiology of glycopeptide-resistant enterococci in Belgian renal units. *J Infect Dis* 2000; 181: 235-41.
  79. **Dever LL, Smith SM, Handwerker S, and Eng RH.** Vancomycin-dependent *Enterococcus faecium* isolated from stool following oral vancomycin therapy. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2770-3.
  80. **Devriese LA, Ieven M, Goossens H, Vandamme P, Pot B, Hommez J, and Haesebrouck F.** Presence of vancomycin-resistant enterococci in farm and pet animals. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2285-7.
  81. **Devriese LA, Pot B, Kersters K, Lauwers S, and Haesebrouck F.** Acidification of methyl-alpha-D-glucopyranoside: a useful test to differentiate *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum* from *Enterococcus faecium* species group and *Enterococcus faecalis*. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2607-8.
  82. **Diekema DJ, and Jones RN.** Oxazolidinones: a review. *Drugs* 2000; 59: 7-16.
  83. **Doebbeling BN, Stanley GL, Sheetz CT, Pfaller MA, Houston AK, Annis L, Li N, and Wenzel RP.** Comparative efficacy of alternative hand-washing agents in reducing nosocomial infections in intensive care units. *N Engl J Med* 1992; 327: 88-93.
  84. **Donabedian S, Hershberger E, Thal LA, Chow JW, Clewell DB, Robinson-Dunn B, and Zervos M.** PCR fragment length polymorphism analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2885-8.
  85. **Dougherty SH.** Role of *Enterococcus* in intraabdominal sepsis. *Am J Surg* 1984; 148: 308-12.
  86. **Duckro AN, Blom DW, Weinstein RA, and Hayden MK.** Transfer of vancomycin-resistant enterococci via health care worker hands. *Arch Intern Med* 2005; 14; 165(3): 302-7.
  87. **Dunny GM.** Genetic functions and cell-cell interactions in the pheromone-inducible plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*. *Plasmid* 1990; 4: 689-96.
  88. **Dutka-Malen S, Blaimont B, Wauters G, and Courvalin P.** Emergence of high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and

- Enterococcus casseliflavus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994; 38: 1675-1677.
89. **Dutka-Malen S, Evers S, and Courvalin P.** Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 24-7.
  90. **Edmont MB, Ober JF, Dawson JD, Weinbaum DL, and Wenzel RP.** Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: natural history and attributable mortality. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 1234-9.
  91. **Edmont MB, Ober JF, Weinbaum JL, Pfaller MA, Hwang T, Sanford MD, and Wenzel RP.** Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: risk factors for infection. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1126-33.
  92. **Endtz HP, Van den Braak N, Van Belkum A, Goessens WH, Kreft D, Stroebel AB, and Verbrugh HA.** Comparison of eight methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 592-4.
  93. **Eliopoulos GM, and Eliopoulos CT.** Therapy of enterococcal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 91: 18-26.
  94. **Eliopoulos GM.** Increasing problems in the therapy of enterococcal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12: 409-12.
  95. **Eliopoulos GM.** Vancomycin-resistant enterococci: mechanism and clinical relevance. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11: 851-65.
  96. **Eliopoulos GM, Wennersten C, Moellering RC.** Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Streptococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22: 295-301.
  97. **Eliopoulos GM, Willey G, Murray BE, and Moellering RC.** Ciprofloxacin in experimental endocarditis due to a beta-lactamase producing highly gentamicin-resistant strain of *E. faecalis*. *Rev Infect Dis* 1989; 11(Suppl. 5): 1210-1.
  98. **El-Mady A, and Mortensen JE.** The bactericidal activity of ampicillin, daptomycin, and vancomycin against ampicillin-resistant *Enterococcus faecium*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1991; 14: 141-5.
  99. **Ember JA, and Hugli TE.** Characterization of the human neutrophil response to sex pheromones from *Streptococcus faecalis*. *Am J Pathol* 1989; 134: 797-805.
  100. **Emori TG, and Gaynes RB.** An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 428-42.
  101. **Endtz HP, Van den Braak N, Van Belkum A, Goessens WH, Kreft D, Stroebel AB, and Verbrugh HA.** Comparison of eight methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 592-4.
  102. **Endtz HP, Van den Braak N, Van Belkum A, Kluytmans JA, Koeleman JG, Spanjaard L, Voss A, Weersink AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Buiting AG, Van Duin A, and Verbrugh HA.** Fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients and those living in the community in The Netherlands. *J Clin Microbiol* 1997; 35:3026-31.
  103. **Evans PA, Norden CW, Rhoads S, Deobaldia J, and Silber J.** In vitro susceptibilities of clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1406.

104. **Evers S, and Courvalin P.** Regulation of VanB type vancomycin resistance gene expression by the VanS<sub>B</sub>-VanR<sub>B</sub> two-component regulatory system in *enterococcus faecalis* V583. *J Bacteriol* 1996; 178: 1302-9.
105. **Evers S, Sahm DF, and Courvalin P.** The *vanB* gene of *Enterococcus faecalis* V583 is structurally related to genes encoding D-Ala, D-Ala ligases and glycopeptide-resistance proteins VanA and VanC. *Gene* 1993; 124: 143-4.
106. **Facklam RR, and Collins MD.** Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by conventional test scheme. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 731-4.
107. **Facklam RR, Hollis D, and Collins MD.** Identification of gram-positive coccid and coccobacillary vancomycin-resistant bacteria. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 724-30.
108. **Favero MS, and Bond WW.** Sterilization, disinfection, and antisepsis in the hospital, p. 183-200. In Balows A, Hausler WJ Jr, Herman KL, Isenberg HD, and Shadomy HJ (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 5<sup>th</sup> ed., 1991. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
109. **Fekety R.** Vancomycin and teicoplanin, p. 346-54. In Mandell GL, Bennett JE, and Dolin R (ed), *Principles and practice of infectious diseases*, 4<sup>th</sup> ed., 1995. Churchill Livingstone, Inc., New York, N. Y.
110. **Ferretti JJ, Gilmore KS, and Courvalin P.** Nucleotide sequence analysis of the gene specifying the bifunctional 6'-aminoglycoside acetyltransferase 2''-aminoglycoside phosphotransferase enzyme in *Streptococcus faecalis* and identification and cloning of gene regions specifying the two activities. *J Bacteriol* 1986; 167: 631-8.
111. **Fernandez-Guerrero ML, Rouse SM, Henry NK, Geraci JE, and Wilson WR.** In vitro and in vivo activity of ciprofloxacin against enterococci isolated from patients with infective endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 430-3.
112. **Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahm DF, and Courvalin P.** VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2161-4.
113. **Foglia G, Del Grosso M, Vignaroli C, Bagnarelli P, Varaldo PE, Pantosti A, and Biavasco F.** Molecular analysis of Tn1546-like elements mediating high-level vancomycin resistance in *Enterococcus gallinarum*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 772-5.
114. **Fontana R, Amalfitano G, Rossi L and Satta G.** Mechanism of resistance to growth inhibition and killing by *beta*-lactam antibiotics in enterococci. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 486-9.
115. **Fontana R, Aldergheri M, Ligozzi M, Lopez H, Sucari A, and Satta G.** Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1980-3.
116. **Fontana R, Bertolini G, Amalfitano G, and Canepari P.** Characterization of penicillin-resistant *Streptococcus faecium* mutants. *FEMS Microbiol Lett* 1984; 25: 21-5.
117. **Fontana R, Cerini R, Longoni P, and Canerapi P.** Identification of a streptococcal penicillin-binding protein that react very slowly with penicillin. *J. Bacteriol* 1983; 155: 1343-50.

118. **Fraimow HS, and Venuti E.** Inconsistent bactericidal activity of triple-combination therapy with vancomycin, ampicillin, and gentamicin against vancomycin-resistant, highly ampicillin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1563-6.
119. **Fridkin SK, Edwards JR, Courval JM, Hill H, Tenover FC, Lawton R, Gaynes RP, and McGowan JE.** The effect of vancomycin and third-generation cephalosporins on prevalence of vancomycin-resistant enterococci in 126 U.S. adult intensive care units. *Ann Intern Med* 2001; 135: 175-83.
120. **Fridkin SK, Lawton R, Edwards JR, Tenover FC, McGowan JE, Gaynes RP, ICARE, and NNIS.** Monitoring antimicrobial use and resistance: comparison with a national benchmark on reducing vancomycin use and vancomycin-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 702-7.
121. **Fridkin SK, Yokoe DS, Whitney CG, Onderdonk A, and Hooper DC.** Epidemiology of a dominant clonal strain of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* at separate hospitals in Boston, Massachusetts. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 965-70.
122. **Frieden TR, Munsiff SS, Low DE, Willey BM, Williams G, Faur Y, Eisner W, Warren S, and Kreiswirth B.** Emergence of vancomycin-resistant enterococci in New York City. *Lancet* 1993; 342:76-79.
123. **Gambarotto K, Ploy MC, Turlure P, Grelaud C, Martin C, Bordessoule D, and Denis F.** Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and nonhospitalized controls in a cattle-rearing area of France. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 620-624.
124. **Garbutt JM, Ventrapragada M, Littenberg B, and Mundy LM.** Association between resistance to vancomycin and death in cases of *Enterococcus faecium* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 466-72.
125. **Garner JS, and Simmons BP.** CDC guidelines for isolation precautions in hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1983; 4: 245-325.
126. **Garrison MW, Rotschafer JC, and Crossley KB.** Suboptimal effects of daptomycin in the treatment of bacteremias. *South Med J* 1989; 82: 1414-5.
127. **Gonzales RD, Schreckenberger PC, Graham MB, Kelkar W, DenBesten K, and Quinn JP.** Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet* 2001; 357: 1179.
128. **Goosens H.** Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* derived from animals colonizing the human gut: the missing evidence? *Clin Microbiol Infect* 1999; 5: 64-6.
129. **Goosens H, Jabes D, Rossi R, Lammens C, Privitera G, and Courvalin P.** European survey of vancomycin-resistant enterococci in at-risk hospital wards and *in vitro* susceptibility testing of ramoplanin against these isolates. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51 Suppl S3: 5-12.
130. **Gordillo ME, Singh KV, and Murray BE.** Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1570-4.
131. **Gordon S, Swenson JM, Hill BC, Piggot NE, Facklam RR, Cooksey RC, Thornsberry C, Jarvis WR, and Tenover FC.** Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2373-8.

132. **Gordts B, Van Landuyt H, Ieven M, Vandamme P, and Goossens H.** Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2842–6.
133. **Gould FK, and Freeman R.** Nosocomial infection with microsphere beds. *Lancet* 1993; 342: 241-2.
134. **Grayson ML, Eliopoulos GM, Wennester CB, Ruoff KL, De Girolami PC, Ferraro MJ, and Moellering RC, Jr.** Increasing resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics among clinical isolates of *enterococcus faecium*: a 22-year review in one institution. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 2180-4.
135. **Green M, Barbadora K, and Michael M.** Recovery of vancomycin-resistant gram-positive cocci from pediatric liver transplant recipients. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2503-6.
136. **Green M, Shlaes JH, Barbadola K, and Shlaes DM.** Bacteremia due to vancomycin-dependent *Enterococcus faecium*. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 712-4.
137. **Greenwood D.** Antibiotic resistance in enterococci. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24: 631-5.
138. **Gullberg RM, Homann SR, and Phair JP.** Enterococcal bacteremia: analysis of 75 episodes. *Rev Infect Dis* 1989; 11: 74-85.
139. **Hammerum AM, Fussing V, Aarestrup FM, and Wegener HC.** Characterization of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* isolates from humans, chickens and pigs by ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 677-80.
140. **Handwerger S, and Kolokathis A.** Induction of vancomycin resistant in *Enterococcus faecium* by inhibition of transglycosylation. *FEMS Microbiol Lett* 1990; 58: 167-70.
141. **Handwerger S, Perlman DC, Altarac D, and McAuliffe V.** Concomitant high-level vancomycin and penicillin resistance in clinical isolates of enterococci. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 655-61.
142. **Handwerger S, Pucci MJ, and Kolokathis A.** Vancomycin resistance is encoded on a pheromone response plasmid in *Enterococcus faecium* 228. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:358-60.
143. **Handwerger S, Raucher B, Altarac D, Manka J, Machione S, Sing KV, Murray BE, Wolff J, and Walters B.** Nosocomial outbreak due to *Enterococcus faecium* highly resistant to vancomycin, penicillin, and gentamicin. *Clin Infect Dis* 1993; 16: 750-5.
144. **Handwerger S, Skoble J, Discotto LF, and Pucci MJ.** Heterogeneity of the *vanA* gene in clinical isolates of enterococci from the Northeastern United States. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 362–8.
145. **Handwerger S, and Skoble J.** Identification of chromosomal mobile element conferring high-level vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2446-53.
146. **Hanrahan J, Hoyen C, and Rice LB.** Geographic distribution of a large mobile element that transfers ampicillin and vancomycin resistance between *Enterococcus faecium* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1349-51.
147. **Hayden MK.** Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant enterococci. *J Infect Dis* 2000; 31(4): 1058-65.



148. **Hayden MK, Koenig GI, and Trenholme GM.** Bactericidal activities of antibiotics against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* blood isolates and synergistic activities of combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1225-9.
149. **Hayden MK, Trenholme GM, Schultz JE, and Sahn DF.** In vivo development of teicoplanin resistance in VanB *Enterococcus faecium* isolate. *J Infect Dis* 1993; 167: 1224-7.
150. **Herman DJ, and Gerding DN.** Screening and treatment of infections caused by resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 215-9.
151. **Horan TC, and Emori TG.** Definitions of key terms used in the NNIS system. *Am J Infect Control* 1997; 25: 112-6.
152. **Horodniceanu T, Bougueleret L, El-Solh N, Bieth G, and Delbos F.** High-level, plasmid-borne resistance to gentamicin in *Streptococcus faecalis* subsp. *Zymogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; 16: 686-9.
153. **Hospital Infection Control Practices Advisory Committee.** Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16: 105-13.
154. **Hsueh PR, Teng LJ, Pan HJ, Chen YC, Wang LH, Chang SC, Ho SW, and Luh KT.** Emergence of vancomycin-resistant enterococci at a university hospital in Taiwan: persistence of multiple species and multiple clones. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; 20: 828-33.
155. **Huycke MM, Joyce WA, and Gilmore MS.** *Enterococcus faecalis* cytolysin without effect on intestinal growth of susceptible enterococci in mice. *J Infect Dis* 1995; 172: 273-6.
156. **Huycke MM, Sahn DF, and Gilmore MS.** Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg. Infect. Dis.* 1998; 4: 239-249.
157. **Ieven M, Vercauteren E, Descheemaeker P, Van Laer F, and Goossens H.** Comparison of direct plating and broth enrichment culture for the detection of intestinal colonization by glycopeptide-resistant enterococci among hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 1999; 37(5): 1436-40.
158. **Ispahani P, Pearson NJ, and Greenwood D.** An analysis of community and hospital-acquired bacteraemia in a large teaching hospital in the United Kingdom. *Quarterly Journal of Medicine* 1987; 63: 427-40.
159. **Jett BD, Huycke MM, and Gilmore MS.** Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 462-78.
160. **Johnson AP, Uttley AH, Woodford N and George RC.** Resistance to vancomycin and teicoplanin: an emerging clinical problem. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3: 280-91.
161. **Jones MV, Rowe GB, Jackson B, and Pritchard NJ.** The use of alcohol paper wipes for routine hand cleansing: results of trial in two hospitals. *J Hosp Infect* 1986; 8: 268-74.
162. **Jones RN, Erwin ME, and Anderson SC.** Emerging multiply resistant enterococci among clinical isolates: validation of E test to recognize glycopeptide-resistant strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995; 21: 95-100.
163. **Jordens JZ, Bates J, and Griffiths DT.** 1994. Faecal carriage and nosocomial spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chemother.* 34:515-528.

164. **Kalocheretis P, Baimakou E, Zerbala S, Papaparaskevas J, Makriniotou I, Tassios PT, Iatrou C, Kouskouni E, and Zerva L.** Dissemination of vancomycin-resistant enterococci among haemodialysis patients in Athens, Greece. *J Antimicrob Chemoth* 2004;
165. **Karanfil LV, Murphy M, Josephson A, Gaynes R, Mandel L, Hill BC, and Swenson JM.** A cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in an intensive care unit. *Control Hosp Epidemiol* 1992; 13: 195-200.
166. **Kariyama R, Mitsuata R, Chow JW, Clewell DB, and Kumon H.** Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 2000; 38(8): 3092-5.
167. **Karlowitsky JA, Zhanel GG, Canadian VRE Surveillance group, and Hoban DJ.** Vancomycin-resistant enterococci (VRE) colonization of high-risk patients in tertiary care Canadian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 35: 1-7.
168. **Kawalec M, Gniadkowski M, and Hryniewicz W.** Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a hospital in Gdansk, Poland, due to horizontal transfer of different Tn1546-Like transposon variants and clonal spread of several strains. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3317-22.
169. **Kawalec M, Gniadkowski M, Zaleska M, Ozorowski T, Konopka L, and Hryniewicz W.** Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the phenotype VanB in a hospital in Warsaw, Poland: probable transmission of the resistance determinants into an endemic vancomycin-susceptible strain. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1781-7.
170. **Kim WJ, Weinstein RA, and Hayden MK.** The changing molecular epidemiology and establishment of endemicity of vancomycin resistance in enterococci at one hospital over a 7-year period. *J Infect Dis* 1999; 179:163-71.
171. **Klare I, Heier H, Claus H, Bohme G, Marin S, Setmann G, Hakenbeck R, Santanassova V, and Wite W.** *Enterococcus faecium* strains with *vanA*-mediated high-level glycopeptide resistance isolated from food-stuffs and fecal samples of humans in community. *Microbiol Drug Resist* 1995; 1: 265-72.
172. **Klare I, Heier H, Claus H, Reissbrodt R, and Wite W.** *vanA*-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 125: 165-72.
173. **Korniewicz DM, Kirwin M, Cresci K, Markut C, and Larson E.** In-use comparison of latex gloves in two high-risk units: surgical intensive care and acquired immunodeficiency syndrome. *Heart Lung* 1992; 21: 81-4.
174. **Korniewicz DM, Laughon BE, Cyr WH, Lytle CD, and Larson E.** Leakage of virus through used of vinyl and latex examination gloves. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 787-8.
175. **Kreft B, Marre R, Schramm U, and Wirth R.** Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect Immun* 1992; 60: 25-30.
176. **Krieger JN, Kaiser DL, and Wenzel RP.** Urinary tract etiology of bloodstream infections in hospitalized patients. *J Infect Dis* 1983; 148: 57-62.
177. **Kuhn I, Burman LG, Haeggman S, Tullus K, and Murray BE.** Biochemical fingerprinting compared with ribotyping and pulsed-field gel

- electrophoresis of DNA for epidemiological typing of enterococci. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2812-7.
178. **Lam S, Singer C, Tucci V, Morthland VH, Pfaller MA, and Isenberg HD.** The challenge of vancomycin-resistant enterococci: a clinical and epidemiologic study. *Am J Infect Control* 1995; 23: 170-80.
  179. **Lamp KC, Rybak MJ, Bailey EM, and Kaatz GW.** In vitro pharmacodynamic effects of concentration, pH, and growth phase on serum bactericidal activities of daptomycin and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 2709-14.
  180. **Lai KK.** Treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infections. *Arch. Intern. Med.* 1996; 156: 2579-2584.
  181. **Lancefield RC.** Serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci. *J Exp Med* 1933; 57: 571-95.
  182. **Landman D, Quale JM, Oydna E, Willex BM, Ditore V, Zaman M, Patel K, Saurina G, and Huang W.** Comparison of five selective media for identifying fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 751-2.
  183. **Landman D, Volkert F, Manikal V, Saurina G, Ruan Y, Oydna E, Parola C, and Quale JM.** Vancomycin-resistant enterococci in Brooklyn, New York: a moment in time. *Clin Infect Dis* 1999; 29;
  184. **Lautenbach E, Bilker W, and Brennan PJ.** Enterococcal bacteremia: risk factors for vancomycin resistance and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; 20: 318-23.
  185. **Leclercq R.** *Enterococci* acquire new kinds of resistance. *Clin Infect Dis* 1997; 24(suppl 1): S80-4.
  186. **Leclercq R, and Courvalin P.** Resistance to glycopeptides in enterococci. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 545-56.
  187. **Leclercq R, Derlot E, Duval J, and Courvalin P.** Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin of *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med* 1988; 319: 157-61.
  188. **Leclercq R, Derlot E, Weber M, Duval J, and Courvalin P.** Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 10-15.
  189. **Leclercq R, Dutka-Malen S, Brisson-Noel A, Molinas C, Derlot E, Arthur M, Duval J, and Courvalin P.** Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 495-501.
  190. **Leclercq R, Dutka-Malen S, Duval J, and Courvalin P.** Vancomycin resistance gene *vanC* is specific to *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 2005-8.
  191. **Lewis CM, and Zervos MJ.** Clinical manifestations of enterococcal infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9: 111-7.
  192. **Liassine N, Frei R, Jan I, and Auckenthaler R.** Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from a Swiss hospital. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1853-8.
  193. **Ligossi M, Pittaluga F, and Fontana R.** Identification of a genetic element (*psr*) which negatively controls expression of *Enterococcus hirae* expression. *J Bacteriol* 1993; 175: 2046-51.
  194. **Linden PK, Pasculle AW, Maneaz R, Kramer DJ, Fung JJ, Pinna AD, and Kusne S.** Differences in outcomes for patients with bacteremia due to

- vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* or vancomycin-susceptible *E. faecium*. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 663-70.
195. **Linden PK, Pasculle AW, McDewitt D, and Kramer DJ.** Effect of quinopristin/dalfopristin on the outcome of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: comparison with a control cohort. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39 (Suppl. A): 145-51.
  196. **Livornese LL, Dias S, Samel C, Romanowski B, Taylor S, May P, Pitsakis P, Woods G, Kaye D, and Levison ME.** Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. *Ann Intern Med* 1992; 117: 112-6.
  197. **Lu J, Wu C, Chiueh TS, Perng CL, Chi WM and Lee WH.** Characterization of a highly glycopeptide-resistant *Enterococcus gallinarum* isolate. *J. Formos. Med. Assoc.* 2000; 4: 305-310.
  198. **Luber AD, Jacobs RA, Jordan M, and Guglielmo BJ.** Relative importance of oral versus intravenous vancomycin exposure in the development of vancomycin-resistant enterococci. *J Infect Dis* 1996; 173: 1292-3.
  199. **MacIntyre CR, Empson M, Boardman C, Sindhusake D, Lokan J, and Brown GV.** Risk factors for colonization with vancomycin-resistant enterococci in a Melbourne hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; 22: 624-9.
  200. **Maki DG, and Agger WA.** Enterococcal bacteremia: clinical features, the risk of endocarditis, and management. *Medicine* 1988; 67: 248-69.
  201. **Makinen P, Clewell DB, An F, and Makinen KK.** Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gellanase") from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10). *J Biol Chem* 1989; 264: 3325-34.
  202. **Maniatis AN, Pournaras S, Kanellopoulou M, Kontos F, Dimitroulia E, Papafrangas E, and Tsakris A.** Dissemination of clonally unrelated erythromycin and glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolates in a tertiary Greek hospital. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 4571-4574.
  203. **Maslow JN, Slutsky AM, and Arbeit RD.** Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology, p. 563-72. In Persing DH, Smith TF, Tenover FC, and White TJ (ed), *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. 1993. American Society for Microbiology, Washington, DC.
  204. **Mato R, deLancestre H, Carraher M, Roberts RB, and Tomasz A.** Multiplicity of genetic backgrounds among vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates recovered from an outbreak in a New York City Hospital. *Microb Drug Resist* 1996; 2: 309-17.
  205. **McCarthy AE, Victor G, Ramotar K, and Tuye B.** Risk factors for acquiring ampicillin-resistant enterococci and clinical outcomes at a Canadian tertiary-care hospital. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2671-6.
  206. **McEvoy SP, Plant AJ, Pearman JW, and Christiansen KJ.** Risk factors for the acquisition of vancomycin-resistant enterococci during a single-strain outbreak at a major Australian teaching hospital *Hosp Infect Society* 2005; 256-8.
  207. **McGowan JE.** Septicaemia: changing pattern of causative organisms and underlying conditions. In *Septicaemia and Endocarditis. Clinical and*

- microbiological Aspects* (Shanson DC, Ed), pp. 5-48. Oxford University Press, Oxford.
208. **Megran DW.** Enterococcal endocarditis. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 63-71.
  209. **Miller MB, Allen SL, Mangum ME, Doutova A, and Gilligan PH.** Prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus* in prenatal screening cultures. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 855-7.
  210. **Miranta AG, Singh KV, and Murray BE.** DNA fingerprinting of *Enterococcus faecium* by pulsed field gel electrophoresis may be a useful epidemiologic tool. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2752-7.
  211. **Miyazaki S, Ishii Y, Ohno A, Furuya N, Matsumoto T, Tateda K, and Yamaguchi K.** In-vitro activities of 11 antibiotics against vancomycin-resistant enterococci isolated in Japan. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 415-6.
  212. **Mobarakai N, Quale JM, and Landman.** Bactericidal activities of peptide antibiotics against multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob agents Chemother* 1994; 38: 385-387.
  213. **Moellering RC Jr.** Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin. Infect. Dis* 1992; 14: 1173-8.
  214. **Moellering RC Jr, Korzeniowski OM, Sande MA, and Wennersten CB.** Species-specific resistance to antimicrobial synergism in *Streptococcus faecium* and *Streptococcus faecalis*. *J Infect Dis* 1979; 140: 203-8.
  215. **Moellering RC Jr, Weinberg AN.** Studies on antibiotic synergism against enterococci. II. Effect of various antibiotics on the uptake of <sup>14</sup>C-labeled streptomycin by enterococci. *J Clin Invest* 1971; 50: 2580-4.
  216. **Moellering RC Jr, and Wennersten CB.** Therapeutic potential of rifampicin in enterococcal infections. *Rev Infect Dis* 1983; 5(Suppl. 3): 528-32.
  217. **Montecalvo MA, deLancestre H, Carraher M, Gedris C, Chung M, Van Horn K, and Wormser GP.** Natural history of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 1995; 16: 680-685.
  218. **Montecalvo MA, Horowitz H, Gedris C, Cardonaro C, Tenover FC, and Issah A.** Outbreak of vancomycin-, ampicillin-, and aminoglycoside-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia in an adult oncology unit. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1363-7.
  219. **Montecalvo MA, Seiter K, and Carbonaro CA.** Effect of novobiocin-containing antimicrobial regimens on infection and colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob agents Chemother* 1995; 39: 794.
  220. **Montecalvo MA, Shay DK, Patel P, Tacsá L, Maloney SA, and Jarvis WR.** Blood stream infections with vancomycin-resistant enterococci. *Arch Intern Med* 1996; 156: 1458-62.
  221. **Montecalvo MA, Jarvis WR, Uman J, Shay DK, Petrullo C, Rodney K, Gedris C, Horowitz HW, and Wormser GP.** Infection-control measures reduce transmission of vancomycin-resistant enterococci in an endemic setting. *Ann Intern Med* 1999; 131: 269-72.
  222. **Moreno F, Grota P, Crisp C, Magnon K, Melcher GP, Jorgenson JH, and Patterson JE.** Clinical and molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* during its emergence in a city in Southern Texas. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 1234-7.

223. **Moretti ML, Bratfich OJ, Stucchi RB, Levi C, Levin AS, Dubos GM, Vormittag E, and Blum-Menezes D.** Clonal dissemination of VanA-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecalis* between hospitals of two cities located 100km apart. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37(9): 1339-43.
224. **Morris JG, Shay DK, Hebden JN, McCarter RJ, Jr, Perdue BE, Jarwis W, Johnson TA, Dowling TC, Polish LB, and Schwalbe RS.** Enterococci resistant to multiple antimicrobial agents, including vancomycin. Establishment of endemicity in a university medical center. *Ann Intern Med* 1995; 123: 250-9.
225. **Morrison AJ, and Wenzel RP.** Nosocomial urinary tract infections due to *Enterococcus*; ten years' experience at a university hospital. *Arch Intern Med* 1986; 146: 1549-51.
226. **Morrison D, Woodford N, Barrett SP, Sisson P, and Cookson BD.** DNA banding pattern polymorphism in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and criteria for defining strains. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1084-91.
227. **Muller-Serieys C, Drugeon HB, Etienne J, Lascols C, Leclercq R, Nguyen J, and Soussy CJ.** Activity of linezolid against gram-positive cocci isolated in French hospitals as determined by three in-vitro susceptibility testing methods. *Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 10: 242-6.
228. **Murray BE.**  $\beta$ -Lactamase-producing enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 2355-9.
229. **Murray BE.** Antibiotic resistance among enterococci: current problems and management strategies, p. 94-117. In JS Remington and MN Swartz (ed), *Current clinical topics in infectious diseases*. Blackwell Scientific Publications, Boston, Mass, 1989.
230. **Murray BE.** The life and times of the enterococcus. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3: 45-65.
231. **Murray BE.** Vancomycin-resistant enterococci. *Am J Med* 1997; 101: 284-93.
232. **Murray BE.** Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis* 2001; 4:
233. **Murray BE, and Mederski-Samoraj B.** Transferable beta-lactamase. A new mechanism for *in vivo* penicillin resistance in *Streptococcus faecalis*. *J Clin Invest* 1983; 72: 1168-71.
234. **Murray BE, Singh KV, Heath JD, Sharma BR, and Weinstock GM.** Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2059-63.
235. **Mutnick AH, Biedenbach DJ, and Jones RN.** Geographic variations and trends in antimicrobial resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 46: 63-8.
236. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4*. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa: NCCLS, 1997.
237. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** *Performance standards for antimicrobial susceptibility tests. Approved standard M2-A6*.

- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa: NCCLS, 1997.
238. **Navarro F, and Courvalin P.** Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1788-93.
  239. **Nelson RRS, McGregor KF, Brown AR, Amyes SGB, and Young HK.** Isolation and characterization of glycopeptide-resistant enterococci from hospitalized patients over a 30-month period. *J Clin Microb* 2000; 38(6): 2112-6.
  240. **Nicas TI, Wy Cy Hobbs JN JR, Preston DA, and Allen NE.** Characterization of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1121-4.
  241. **Nichols RL, and Muzik AC.** Enterococcal infections in surgical patients: the mystery continues. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 72-6.
  242. **Nicoletti G, Boghossian V, and Borland R.** Hygienic hand disinfection: a comparative study with chlorhexidine detergents and soap. *J Hosp Infect* 1990; 15: 323-337.
  243. **NNIS.** Nosocomial enterococci resistant to vancomycin-United States, 1989-1993. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1993; 42: 597-9.
  244. **Noble WC, Virani Z, and Cree RGA.** Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 93: 195-8.
  245. **Norris AH, Reilly JP, Edenstein PH, Brennon PJ, and Schuster MG.** Chloramphenicol for the treatment of vancomycin-resistant enterococcal infections. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1137-44.
  246. **Noskin GA, Stosor V, Cooper I, and Peterson LR.** Recovery of vancomycin-resistant enterococci on fingertips and environmental surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16: 577-81.
  247. **Novais C, Vital C, Ribeiro G, Coque TM, and Peixe LV.** First characterization of vancomycin-resistant enterococci from a Portuguese hospital. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 215-17.
  248. **O'Donovan CA, Fan-Havard P, Tecson-Tumang FT, Smith SM, and Eng RH.** Enteric eradication of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with oral bacitracin. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994; 18: 105-9.
  249. **Ostrowsky BE, Venkataraman L, D'Agata EM, Gold HS, DeGirolami PC, and Samore MH.** Vancomycin-resistant enterococci in intensive care units: high frequency of stool carriage during a non-outbreak period. *Arch. Intern. Med.* 1999; 159:1467-1472.
  250. **Ostrowsky BE, Clark NC, Thuvn-Eliopoulos C, Venkataraman L, Samore MH, Tenover FC, Eliopoulos GM, Moellering RC, Jr, and Gold HS.** A cluster of VanD vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: molecular characterization and clinical epidemiology. *J Infect Dis* 1999; 180: 1177-85.
  251. **Padiglione AA, Wolfe R, Grabsch EA, Olden D, Pearson S, Franklin C, Spelman D, Mayall B, Johnson PDR, and Grayson ML.** Risk factors for new detection of vancomycin-resistant enterococci in acute-care hospital that employ strict infection control procedures. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2492-8.
  252. **Palmer SM, and Rybac MJ.** Vancomycin-resistant enterococci. *Pharmacotherapy* 1996; 16: 819-29.

253. **Papanikolaou GA, Meyers BR, Meyers J, Mendelson MH, Lou S, Emre S, and Miller C.** Nosocomial infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in liver transplant recipients: risk factors for acquisition and mortality. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 760-6.
254. **Patel R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Steckelberg JM, Kline B, and Cockerill III FR.** DNA sequence variation within *vanA*, *vanB*, *vanC-1* and *van-2/3* genes of clinical *Enterococcus* isolates. *Antimicrob Agents Chemotherapy* 1998; 42: 202-5.
255. **Paulssen J, Eidem T, and Kristiansen R.** Perforation in surgeons' gloves. *J Hosp Infect* 1988; 11: 82-5.
256. **Perichon B, Reynolds P, and Courvalin P.** VanD type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2016-8.
257. **Perlada DE, Smulian AG, and Cushion MT.** Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of enterococci in Cincinnati, Ohio: prospective citywide survey. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2342-7.
258. **Piddock LJV.** New quinolones and gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 163-9.
259. **Platsouka ED, Dimopoulou H, Miriagou V, and Paniara O.** The first clinical isolates of *Enterococcus faecium* with the VanA phenotype in a tertiary Greek hospital. *J Antimicrob. Chemother.* 2000; 46:1039-1040.
260. **Pournaras S, Malamou-Lada H, Maniati M, Mylona-Petropoulou D, Vagiakou-Voudris H, Tsakris A, and Maniatis AN.** Persistence of a clone of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecalis* among patients in an intensive care unit of a Greek hospital. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 109-12.
261. **Poyart C, Pierre C, Quesne G, Pron B, Berche B, and Trieu-Cuot.** Emergence of vancomycin resistance in the genus *Streptococcus*: characterization of a *vanB* transferable determinant in *Streptococcus bovis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 24-9.
262. **Poyart C, Quesne G, and Trieu-Cuot.** Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 415-8.
263. **Quale J, Landman D, Atwood E, Kreiswirth B, Willey BM, Ditore V, Zaman M, Patel K, Saurina G, Huang W, Oydna E, and Burney S.** Experience with a hospital-wide outbreak of vancomycin-resistant enterococci. *Am. J. Infect. Control* 1996; 24:372-379.
264. **Quintiliani R, Jr, and Courvalin P.** Conjugal transfer of the vancomycin resistance determinant *vanB* between enterococci involves the movement of large genetic elements from chromosome to chromosome. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 119: 359-64.
265. **Reed C, Efstratiou A, Morrison D, and Woodford N.** Glycopeptide-resistant *Gemella haemolysans* from blood. *Lancet* 1993; 342: 927-8.
266. **Reid KC, Cockerill III FR, and Patel R.** Clinical and epidemiological features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* bacteremia: a report of 20 cases. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1542-6.
267. **Reynolds PE, Departdieu F, Dutka-Malen S, Arthur M, and Courvalin P.** Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon Tn1546 requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. *Mol Microbiol* 1994; 13: 1065-70.



268. **Reynolds PE, Snaith HE, Maguire AJ, Dutka-Malen S, and Courvalin P.** Analysis of peptidoglycan precursors in vancomycin-resistant *E. gallinarum* BM4174. *Biochem J* 1994; 301: 5-8.
269. **Rice LB, and Marshall SH.** Evidence of incorporation of the chromosomal-lactamase gene of *Enterococcus faecalis* CH19 into a transposon derived from staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1843-6.
270. **Roger M, Faucher MC, Forest P, St-Antoine P, and Coutlee F.** Evaluation of a *vanA*-specific PCR assay for detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* during a hospital outbreak. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3348-9.
271. **Rosan B, and Williams NB.** Hyaluronidase production by oral enterococci. *Arch Oral Biol* 1964; 9: 291-8.
272. **Rosato A, Pierre J, Billot-Klein D, Buu-Hoi, and Gutmann L.** Inducible and constitutive expression of resistance to glycopeptides and vancomycin dependence in glycopeptide-resistant *Enterococcus avium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 830-3.
273. **Ruoff KL, de la Maza L, Murtagh MJ, Spargo JD, and Ferraro MJ.** Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 434-7.
274. **Rybak MJ, Bailey EM, Lamp KC, and Kaatz GW.** Pharmacokinetics and bactericidal rates of daptomycin and vancomycin in intravenous drug abusers being treated for gram-positive endocarditis and bacteremia. *Antimicrob Agents and Chemother* 1992; 36: 1109-14.
275. **Rybkin T, Mainardi J-L, Sougakoff W, Collatz E, and Gutmann L.** Penicillin-binding protein 5 sequence alteration in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of  $\beta$ -lactam resistance. *J Infect Dis* 1998; 178: 159-63.
276. **Sader HS, Pfaller MA, Tenover FC, Hollis RJ, and Jones RN.** Evaluation and characterization of multiresistant *Enterococcus faecium* from 12 U. S. medical centers. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2840-2.
277. **Saeedi B, Hallgren A, Jonasson J, Nilsson LE, Hanberger H, and Isaksson B.** Modified pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of enterococci. *APMIS* 2002; 110:869-874.
278. **Sahm DF, Boonlayangoor S, and Schulz JE.** Detection of high-level aminoglycosides resistance in enterococci other than *Enterococcus faecalis*. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2595-8.
279. **Sahm DF, Free L, and Handwerker S.** Inducible and constitutive expression of *vanC-I*-encoded resistance to vancomycin in *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1480-4.
280. **Sahm DF, Free L, Smith C, Eveland M, and Mungy LM.** Rapid characterization schemes for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2026-30.
281. **Sahm DF, and Koburow GT.** In vitro activities of quinolones against enterococci resistant to penicillin-aminoglycoside synergy. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 71-7.
282. **Sahm DF, and Olsen L.** In vitro detection of enterococcal vancomycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1846-8.
283. **Salgado CD, and Farr BM.** Outcomes associated with vancomycin-resistant enterococci: a meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24: 690-8.

284. **Satake S, Clark N, Rimland D, Nolte FS, and Tenover FC.** Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2325-30.
285. **Schaberg DR, Culver DH, and Gaynes RP.** Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med* 1991; 91(Suppl.3B): 72-5S.
286. **Schleifer KH, and Kilpper-Balz R.** Transfer of *Streptococcus faecalis* and *streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. Rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1984; 34: 31-4.
287. **Schleifer KH, and Kilpper-Balz R.** Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci, and lactococci: a review. *Syst Appl Microbiol* 1987; 10: 1-9.
288. **Schooneveldt JM, Marriott RK, and Nimmo GR.** Detection of a *vanB* determinant in *Enterococcus gallinarum* in Australia. *J Clin Microbio* 2000; 38: 3902.
289. **Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF, and Voss A.** Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2000; 19: 816-822.
290. **Schouten MA, Willems RJJ, Kraak WAG, Top J, Hoogkamp-Korstanje JA, and Voss A.** Molecular analysis of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant enterococci isolated from patients in Europe shows geographic transposon type clustering. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 986-9.
291. **Shay DK, Maloney SA, Montecalvo M, Banerjee S, Wormser GP, Arduino MJ, Bland LA, and Jarvis WR.** Epidemiology and mortality risk of vancomycin-resistant enterococcal bloodstream infections. *J. Infect. Dis.* 1995; 172: 993-1000.
292. **Sherman JM.** The streptococci. *Bacteriol Rev* 1937; 1: 3097.
293. **Shulz JE, and Sahn DE.** Reliability of the E test for detection of ampicillin, vancomycin, and high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus* spp. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 3336-9.
294. **Slaughter S, Hayden MK, Nathan C, Hu TC, Rice T, Van Voorhis J, Matushek M, Franklin C, and Weinstein RA.** A comparison of the effect of universal use of gloves and gowns with that of gloves use alone on acquisition of vancomycin-resistant enterococci in a medical intensive care unit. *Ann Intern Med* 1996; 125: 448-56.
295. **Sofianou D, Pournaras S, Giosi M, Polyzou A, Maniatis AN, and Tsakris A.** Substantially increased faecal carriage of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary Greek hospital after a 4 year time interval. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 251-4.
296. **Stampone L, Del Grosso M, Boccia D, and Pantosti A.** Clonal spread of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain among bloodstream-infecting isolates in Italy. *J Clin Microbiol* 2005; 43(4): 1575-80.
297. **Stevenson KB, Murray EW, and Sarubbi FA.** Enterococcal meningitis: report of four cases and review. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 233-9.
298. **Stull TL, Lipuma JJ, and Edlind TD.** A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. *J Infect Dis* 1988; 157: 280-6.
299. **Suntharam N, Lankford MG, Trick WE, Peterson LR, and Noskin GA.** Risk factors for acquisition of vancomycin-resistant enterococci among hematology-oncology patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 43: 183-8.

300. **Swenson JM, Clarek NC, Ferraro MJ, Sahm DF, Doern G, Pfaller MA, Teller LB, Weinstein MP, Zabransky RJ, and Tenover FC.** Development of a standardized screening method for detection of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1700-4.
301. **Swenson JM, Ferraro MJ, Sahm DF, Charache P and Tenover FC.** New vancomycin disk diffusion breakpoints for enterococci. The National Committee for Clinical Laboratory Standards Working Group on Enterococci. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2525-8.
302. **Swenson JM, Hill BC, and Thornsberry C.** Problems with the disk diffusion test for detection of vancomycin resistance in enterococci. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2140-2.
303. **Tenover FC.** Plasmid fingerprinting. A tool for bacterial strain identification and surveillance of nosocomial and community-acquired infections. *Clin Lab Med* 1985; 5: 413-36.
304. **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, and Swaminathan B.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:2233-2239.
305. **Tenover FC, Tokar FC, Swenson J, Paul S, Spitalny, and Jarvis W.** Ability of clinical laboratories to detect antimicrobial resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1695-9.
306. **Toledano H, Schlesinger Y, Raveh D, Rudensky B, Attias D, Eidelman AI, and Yinnon AM.** Prospective surveillance of vancomycin-resistant enterococci in a neonatal intensive care unit. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2000; 19:282-287.
307. **Tornieporth NG, Roberts RB, John J, Hafner A, and Riley LW.** Risk factors associated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection or colonization in 145 matched case patients and control patients. *Clin. Infect. Dis.* 1996; 23:767-772.
308. **Toye B, Shymananski J, Bobrowska M, Woods W, and Ramotar K.** Clinical and epidemiologic significance of enterococci intrinsically resistant to vancomycin (possessing the *vanC* genotype). *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3166-70.
309. **Tremlett CH, Brown DF, and Woodford N.** Variation in structure and location of VanA glycopeptide resistance elements among enterococci from a single patient. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 818-20.
310. **Turabelidze D, Kotetishvili M, Kreger A, Morris JG Jr, and Sulakvelidze A.** Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol.* 2000; 38:4242-4245.
311. **Uttley AHE, Collins CH, Naidoo J, and George RC.** Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1988; I: 57-8.
312. **Van Belkum A.** DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 174-84.
313. **Van der Auwera P, Pensart N, Korten V, Murray BE, and Leclercq R.** Influence of oral glycopeptides on the fecal flora of human volunteers: selection of highly glycopeptide-resistant enterococci. *J Infect Dis* 1996; 173: 1129-36.

314. **Vandamme P, Vercauteren E, Lammens C, Pensart N, Ieven M, Pot B, Leclercq R, and Goossens H.** Survey of enterococcal susceptibility patterns in Belgium. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2572-6.
315. **Van Goethem GF, Louwagie BM, Simoens MJ, Vandeven JM, Verhaegen JL, and Boogaerts MA.** *Enterococcus casseliflavus* septicaemia in a patient with acute myeloid leukemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 519-20.
316. **Vankerckhoven V, van Outgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, Jabes D, and Goossens H.** Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2004; 42(10): 4473-9.
317. **Vincent S, Knight RG, Green M, Sahm DF, and Shlaes DM.** Vancomycin susceptibility and identification of motile enterococci. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2335-7.
318. **Von Gottberg A, van Nierop W, Duse A, Kassel M, McCarthy K, Brink A, Meyers M, Smego R, and H Koornhof.** Epidemiology of glycopeptide-resistant Enterococci colonizing high-risk patients in hospitals in Johannesburg, Republic of South Africa. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 905-9.
319. **Wade JJ, Desai N, and Casewell M.** Hygienic hand disinfection for the removal of epidemic vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and gentamicin-resistant *Enterobacter cloacae*. *J Hosp Infect* 1991; 18: 211-8.
320. **Wade JJ.** The emergence of *Enterococcus faecium* resistant to glycopeptides and other standard agents-a preliminary report. *J Hosp Infect* 1995; 30(Suppl.): 483-93.
321. **Wegener HC, Aarestrup FM, Jensen LB, Hammerum AM, and Bager F.** Use of antimicrobial growth promoters in food animals and Enterococcus faecium resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 1999; 5:329-335.
322. **Weinstein JW, Tallapragada S, Farrel P, and Dembry LM.** Comparison of rectal and perirectal swabs for detection of colonization with vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 210-2.
323. **Wells CL, Juni BA, Cameron SB, Mason KR, Dunn DL, Ferrieri P, and Rhame FS.** Stool carriage, clinical isolation, and mortality during an outbreak of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized medical and/or surgical patients. *Clin. Infect. Dis.* 1995; 21:45-50.
324. **Westenfelder GO, Paterson PY, Reisberg BE, and Carlson GM.** Vancomycin-streptomycin synergism in enterococcal endocarditis. *JAMA* 1973; 223: 37-40.
325. **Whitman MS, Pitsakis PG, Zausner A, Livornese L, Osborne AJ, Johnson CC, and Levison ME.** Antibiotic treatment of experimental endocarditis due to vancomycin- and ampicillin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2069-73.
326. **Wicken AJ, Elliot SD, and Baddiley J.** The identity of streptococcal group D antigen with teichoic acid. *J Gen Microbiol* 1963; 31: 231-9.
327. **Wilcox MH.** Update on linezolid: the first oxazolidinone antibiotic. *Expert Opin Pharmacother* 2004; 6(13): 2315-26.

328. **Williams AM, Rodrigues UM, and Collins MD.** Intragenetic relationship of enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing of small subunit rRNA. *Res Microbiol* 1990; 142: 67-74.
329. **Williamson R, Le Bouguenec C, Gutmann L, and Horaud T.** One or two low-affinity penicillin-binding proteins may be responsible for the range of susceptibility of *Enterococcus faecium* to benzylpenicillin. *J Gen Microbiol* 1985; 131: 1933-40.
330. **Willems RJL, Top J, van der Braak N, van Belkum A, Endtz H, Mevius D, Stobberingh E, van der Bogaard A, and van Embden JDA.** Host specificity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Infect Dis* 2000; 182: 816-23.
331. **Willems RJL, Top J, van Santen M, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, Grundmann H, and Bonten MJM.** Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct Nosocomial genetic complex. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 821-8.
332. **Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, and Edmond MB.** Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; 39(3): 309-17.
333. **Witte W, and Klare I.** Glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* outside the hospitals: a commentary. *Microb Drug Resist* 1995; 1: 259-63.
334. **Woodford N, Adebiyi AMA, Palepou MFI, and Cookson BD.** Diversity of VanA glycopeptide resistance elements in enterococci from human and nonhuman sources. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 502-8.
335. **Woodford N, Chadwick PR, Morrison D, and Cookson BD.** Strains of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* can alter their *van* genotypes during an outbreak. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2966-8.
336. **Woodford N, Johnson AP, and Morrison D.** Current perspectives on glycopeptide resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 585-615.
337. **Woodford N, Morrison D, Johnson AP, Briant V, George RC, and Cookson B.** Application of DNA probes for rRNA and *vanA* genes to investigation of a Nosocomial cluster of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 653-8.
338. **Wu Z, Wright GD, and Walsh CT.** Overexpression, purification, and characterization of VanX, a D-,D-dipeptidase which is essential for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147. *Biochemistry* 1995; 34: 2455-63.
339. **Yamagushi E, Valena F, Smith SM, Simons MA, and Eng RHK.** Colonization pattern of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Am J Infect Control* 1994; 22: 202-6.
340. **Yamane N, and Jones RN.** In vitro activity of 43 antimicrobial agents tested against ampicillin-resistant enterococci and gram-positive species resistant to vancomycin. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994; 14: 337-45.
341. **Yoshikazu I, Ohno A, Kashitani S, Iwata M, and Yamaguchi K.** Identification of vanB-type vancomycin resistance in *Enterococcus gallinarum* from Japan. *J Infect Chemother* 1996; 2: 102-5.
342. **You MS, and Facklam RR.** New test system for identification of *Aerococcus*, *Enterococcus*, and *Streptococcus*. *J Clin Microbiol* 1986; 24:607-11.
343. **Zaas AK, Song X, Tucker P, and Perl TM.** Risk factors for development of vancomycin-resistant enterococcal bloodstream infection in patients who are

- colonized with vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis* 200; 35: 1139-46.
344. **Zaman MM, Landman D, Burney S, and Quale JM.** Treatment of experimental endocarditis due to multi-drug resistant *Enterococcus faecium* with clinafloxacin and penicillin. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37: 127-32.
345. **Zhanel GG, Laing NM, Nichol KA, Palatnick LP, Norredin A, Hisanaga T, Johnson JL, the NAVRESS group, and Hoban DJ.** Antibiotic activity against urinary tract infection (UTI) isolates of vancomycin-resistant enterococci (VRE): results from the 2002 North America vancomycin resistant enterococci susceptibility study (NAVRESS). *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 382-8.
346. **Zscheck KK, and Murray BE.** Nucleotide sequence of the  $\beta$ -lactamase gene from *Enterococcus faecalis* HH22 and its similarity to staphylococcal  $\beta$ -lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1736-40.

## Emergence of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital in Crete, Greece: a cluster of cases and prevalence study on intestinal colonisation

A. Christidou, A. Gikas, E. Scoulica, J. Pediaditis, M. Roumbelaki, A. Georgiladakis and Y. Tselentis

Department of Clinical Bacteriology, Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece

### ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the clinical and epidemiological characteristics of five consecutive cases of infection with vancomycin-resistant enterococci (VRE) and the prevalence of faecal carriage of VRE among patients admitted to a 700-bed university hospital where no VRE had been isolated previously. In a 2-month period, five consecutive patients infected with VRE were detected. Three VanB<sup>+</sup> *Enterococcus faecium* isolates were obtained from three patients, while two VanA<sup>+</sup> *E. faecium* isolates, one VanA<sup>+</sup> *Enterococcus faecalis* isolate and one VanC1<sup>+</sup> *Enterococcus gallinarum* isolate were obtained from the other two patients. Of 218 faecal specimens from all hospital wards, 41 (18.8%) were found to contain VRE. Forty-two isolates of VRE were obtained, comprising one (2%) *E. faecalis*, 11 (27%) *E. faecium*, 24 (57%) *E. gallinarum* and six (14%) *Enterococcus casseliflavus/flavescens*. Four isolates carried the *vanA* gene, eight carried *vanB*, 24 carried *vanC1*, and six carried *vanC2/C3*. Use of glycopeptides, the presence of central venous catheters and renal dialysis all correlated with VRE colonisation. The prevalence rates were among the highest reported in the literature.

**Keywords** Colonisation, enterococci, resistance, vancomycin, *van* genes, VRE

**Original Submission:** 5 February 2003; **Revised Submission:** 2 June 2003; **Accepted:** 24 June 2003

*Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 999–1005

### INTRODUCTION

Enterococci are normal inhabitants of the human and animal bowel that have attracted much interest during recent years as a leading cause of nosocomial infections [1,2] and because of their increasing resistance to a variety of antimicrobial agents, including glycopeptides [3,4]. Vancomycin-resistant enterococci (VRE), first reported in the UK in 1988 [5,6], are now distributed worldwide [7–11]. Although nosocomial transmission of VRE from patient to patient has been emphasised in the USA [12], a growing number of reports from Europe suggest that VRE colonisation occurs frequently in the community [13,14]. In the USA, nosocomial spread of VRE is

associated primarily with the increasing use of vancomycin, while community-acquired colonisation with VRE in Europe may be related to the use of glycopeptides, particularly avoparcin, for growth promotion in livestock [11,15,16].

Vancomycin resistance in enterococci is variable on many levels, because multiple resistance genes are involved. Five different well-described types of vancomycin resistance are known, each associated with a different ligase gene (*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3*, *vanD* and *vanE*). VanC-type resistance (low-level resistance to vancomycin, but susceptibility to teicoplanin) is an inherent, non-transferable property of *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus/flavescens* that is related to the presence of the species-specific genes *vanC1* and *vanC2/C3*, respectively [17,18], while all other types (VanA, VanB, VanD and VanE) are acquired, transferable and inducible properties that are encoded by gene clusters [19,20]. VanA-type strains are typically highly

Corresponding author and reprint requests: A. Gikas, University Hospital of Heraklion, 1352/71110, Heraklion, Crete, Greece  
E-mail: gikas@med.uoc.gr

resistant to vancomycin and teicoplanin, while VanB types, and the newly described VanD and VanE types, are associated with moderate-to-high levels of vancomycin resistance, but are susceptible to teicoplanin [21,22]. The VanA and VanB types are the most common [20], accounting for c. 60% and 40%, respectively, of isolates of VRE in the USA [23]. Inducible genes, encoding these phenotypes, alter cell wall synthesis and render strains resistant to glycopeptides [20].

Although vancomycin-resistant clinical isolates of *Enterococcus faecium* with the VanA or VanB phenotype have been reported previously in Greek tertiary hospitals [24,25], no infections with VRE had been reported in our hospital and nothing was known of the epidemiology of VRE inside or outside of the hospital's wards. In a 2-month period (December 2000 to January 2001), five infections with VRE were detected. The preventive measures recommended by the Centers for Disease Control [26,27] were immediately applied to avoid intra-hospital dissemination. In addition, a point-prevalence survey was performed to investigate the prevalence of faecal carriage of VRE among patients admitted to the hospital.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

The clinical and epidemiological features of the five patients infected with VRE were recorded. The prevalence study on intestinal colonisation with VRE among patients in the entire hospital was performed on 1 February 2001. All patients in high-risk departments (defined as areas where critically ill patients were treated and invasive procedures were performed) were sampled, including four patients in the general intensive care unit (ICU), seven in the cardiology ICU, 72 in the renal unit, and 15 in the neonatal unit. In addition, through a systematic random sampling process, 120 (25.8%) of the 465 patients treated in other wards of the hospital (non-high-risk departments) were also tested. Every case of faecal carriage was discussed with the patient's physician, in order to exclude true enterococcal infection.

### Culture

One faecal sample or rectal swab was obtained from every patient participating in the study. The samples were inoculated into Enterococci broth (Chromocult; Merck, Darmstadt, Germany) supplemented with vancomycin (Lilly, Indianapolis, IN, USA) 6 mg/L. After incubation at 37°C for 24 h, all broth cultures were subcultured onto bile-esculin azide agar plates (Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, France) supplemented with vancomycin 6 mg/L, and were incubated at 37°C for 24–72 h [14,28,29].

### Identification and antimicrobial susceptibility tests

Colonies growing on agar with a dark brown halo and resembling enterococci morphologically were identified initially by Gram's stain, catalase activity and the presence of the Lancefield group D antigen. Resistance to vancomycin and teicoplanin was tested by disk diffusion and Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) [30,31]. Identification to the species level was done with the API 20 STREP system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), motility tests and pigment production tests [32], and was confirmed by multiplex PCR. Susceptibility to ampicillin, penicillin, streptomycin (high-level resistance), gentamicin (high-level resistance), tetracycline, rifampicin, chloramphenicol, erythromycin, norfloxacin and imipenem was tested by disk diffusion, with MICs determined by Etest and/or agar dilution [30,33], with *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *E. faecium* BM4147 (VanA<sup>+</sup>) as reference strains.

### Multiplex PCR and sequencing

Molecular characterisation was done with the multiplex PCR assay described by Kariyama *et al.* [34], with the following modifications. Total DNA from each isolate was extracted by proteinase K and phenol–chloroform treatment. PCR primers for *vanC1*, *vanC2/C3*, *ddl* and *rrs* were as described previously. *VanA* amplification was done with primers *vanA* (5'-AAAG-GAGACAGGAGCATG) and *vanArev* (5'-TTACATACGTCGG GTTCC) to yield a 1727-bp fragment, while *vanB* was amplified with primers *vanB* (5'-ATGAATAGAATAAAAGT CGC) and *vanBrev* (5'-TTATCACCTCTTTAACGCC) to yield a 1032-bp fragment. Primers were used at the following concentrations: *vanC1* 0.15 µM; *vanC2/C3* 0.15 µM; *ddl*<sub>*E. faecalis*</sub>, 0.1 µM; *ddl*<sub>*E. faecium*</sub>, 0.025 µM; *rrs*, 0.025 µM; *vanA*, 0.2 µM; and *vanB*, 0.15 µM; . The PCR annealing temperature was 54°C, and the extension time was 180 s. PCR product identity was confirmed by automated sequencing with a Thermo Sequenase Kit (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA) and alignment of the deduced sequences with the use of BLAST software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### Epidemiological investigation

Risk factors predisposing to faecal colonisation with VRE were investigated with the Epi-Info 6.0b database program (Centers for Disease Control, Atlanta, GA, USA), in order to analyse demographic characteristics and clinical data for all patients participating in the study. These data included sex, age, days of hospitalisation, surgical interventions, antibiotic treatment and invasive procedures (central venous catheterisation, intubation, urine catheterisation, renal dialysis, gastroscopy or colonoscopy). Data on vancomycin consumption were obtained from the pharmacy department.

## RESULTS

### Patients

Table 1 lists data for the five patients infected with VRE, including demographic characteristics, the site of infection, the outcome, the type and distribution of vancomycin resistance phenotypes,



**Table 1.** Clinical and bacteriological characteristics of five patients infected with vancomycin-resistant enterococci

Patient	Sex	Age (years)	Unit	Date of isolation (day/month/year)	Site of isolation	Species	VRE type	STR	GM	Outcome
1	F	78	Nephrology	18/12/2000	Pleural fluid	<i>E. faecium</i>	VanB	HLR	HLR	Died
2	M	36	Orthopaedic	02/01/2001	Soft tissue	<i>E. faecium</i>	VanB	HLR	LLR	Discharged
3	F	70	ICU	05/01/2001	Peritoneal fluid	<i>E. faecium</i>	VanA	HLR	HLR	Died
4	M	52	Internal medicine	08/01/2001	Soft tissue	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	VanA VanA	HLR HLR	LLR HLR	Discharged
5	M	70	ICU	19/01/2001	Peritoneal fluid	<i>E. faecium</i>	VanB	LLR	LLR	Died

M, male; F, female; ICU, intensive care unit; STR, streptomycin; GM, gentamicin; HLR, high-level resistance; LLR, low-level resistance.

and resistance to aminoglycosides. Three VanB<sup>+</sup> *E. faecium* isolates were obtained from three different patients infected with VRE, with each isolate having a different antibiotic susceptibility profile. Two VanA<sup>+</sup> *E. faecium* isolates with different antibiotic susceptibility profiles were obtained from the remaining two patients, together with a VanC1<sup>+</sup> *E. gallinarum* isolate from one patient, and a VanA<sup>+</sup> *E. faecalis* isolate from the other. Three patients died following infection with VRE, while the other two were eventually discharged from the hospital. No other case of infection with VRE was detected in the hospital during the year 2001.

### Prevalence of colonisation with VRE

In total, 218 samples were tested, yielding 42 isolates of VRE from 41 (18.8%) patients (one patient yielded two different isolates). VRE were isolated from 16 (13.3%) of 120 patients in non-high-risk departments, and from 25 (25.5%) of 98 patients in high-risk departments, with the highest prevalence (50%) being in the ICU. A high prevalence (29.2%) was also found in the renal unit. There were no significant differences in the prevalence rates of VRE between medical, surgical and paediatric wards. The species isolated were one (2%) *E. faecalis*, 11 (27%) *E. faecium*, 24 (57%) *E. gallinarum*, and six (14%) *E. casseliflavus/flavescens*.

Isolates with the VanA resistance type were detected only in the high-risk ICU and renal unit (four of 98 specimens). Three VanB-type isolates were obtained from the 98 patients in high-risk departments, and four from 120 patients tested in the other wards of the hospital. One patient in the cardiology ICU carried two strains (*E. faecium* and *E. faecalis*) with the VanB type of resistance. A second carrier of a VanB<sup>+</sup> *E. faecium* isolate

was identified in the adult ICU, and a third in the renal unit. The remaining four VanB<sup>+</sup> *E. faecium* isolates were identified in the haematology (one isolate), cardiology (two isolates) and orthopaedic (one isolate) wards. Strains with intrinsic vancomycin resistance (*E. gallinarum* and *E. casseliflavus/flavescens*) were found in all the wards of the hospital, with VanC-type isolates being obtained from 18 (18.3%) of 98 specimens in the high-risk departments, and from 12 (10%) of 120 specimens in the other wards of the hospital.

### Identification of isolates and antibiotic susceptibilities

All isolates (seven from the infected patients and 42 from the faecal carriers) were identified to the genus level by conventional methods. Based on motility, pigment production and the API 20 Strep system, all but two isolates were successfully identified to the species level. The remaining two strains were non-motile and non-pigmented, but phenotypically resembled *E. gallinarum*. Their identification as *E. gallinarum* was confirmed, as was that of the other isolates, by the multiplex PCR method. MICs for the *E. faecium* and *E. faecalis* isolates are presented in Table 2. All *E. gallinarum* and *E. casseliflavus/flavescens* isolates were susceptible to ampicillin, penicillin and imipenem, and had low-level resistance to gentamicin and (all except one) streptomycin.

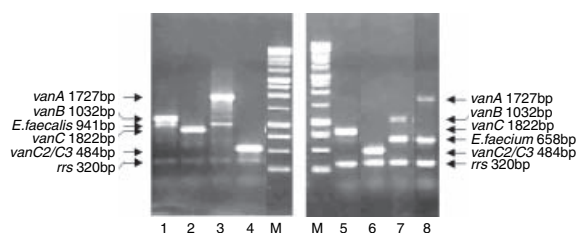
### Multiplex PCR analysis

PCR products of the expected sizes of 320, 484, 658, 822, 941, 1032 and 1727 bp (corresponding to *rrs*, *vanC2/C3*, *ddl<sub>E. faecium</sub>*, *vanC1*, *ddl<sub>E. faecalis</sub>*, *vanB*, and *vanA*, respectively) were obtained, as shown in Fig. 1. Sequencing of the PCR products

**Table 2.** Antibiotic susceptibilities of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates from patients and faecal carriers

Strain	Ward	Site of isolation	Species	MIC (mg/L)												Van genotype
				AMP	PEN	STR	GM	TE	RA	C	E	NOR	IMP	VA	TEC	
28223	Nephrology	Pleural fluid	<i>E. faecium</i>	128	512	> 4096	1024	0.5	> 128	2	> 2048	> 256	512	128	0.125	<i>vanB</i>
93	Orthopaedic	Soft tissue	<i>E. faecium</i>	128	512	2048	16	0.25	> 128	2	2	> 256	256	256	0.125	<i>vanB</i>
438	ICU	Peritoneal fluid	<i>E. faecium</i>	128	512	2048	1024	< 0.125	16	8	> 2048	> 256	512	512	128	<i>vanA</i>
610	Internal medicine	Soft tissue	<i>E. faecium</i>	128	512	> 4096	16	0.25	0.016	2	> 512	128	512	512	128	<i>vanA</i>
1909	Internal medicine	Soft tissue	<i>E. faecalis</i>	1	8	> 4096	> 2048	64	1	8	> 2048	128	16	512	128	<i>vanA</i>
1646	ICU	Peritoneal fluid	<i>E. faecium</i>	64	128	32	4	16	8	32	> 2048	64	256	64	0.25	<i>vanB</i>
18	Cardiology	Faeces	<i>E. faecium</i>	64	128	32	< 4	32	8	32	> 2048	256	256	64	0.5	<i>vanB</i>
19	Cardiology	Faeces	<i>E. faecium</i>	64	64	2048	16	32	8	32	> 2048	32	256	128	0.5	<i>vanB</i>
21	ICU	Faeces	<i>E. faecium</i>	64	256	> 4096	1024	256	64	64	> 2048	2	256	512	128	<i>vanA</i>
22a	CICU	Faeces	<i>E. faecium</i>	64	128	32	4	32	8	32	> 2048	64	256	128	0.5	<i>vanB</i>
22b	CICU	Faeces	<i>E. faecalis</i>	1	8	> 4096	> 2048	32	0.5	16	> 2048	256	16	64	0.5	<i>vanB</i>
23	ICU	Faeces	<i>E. faecium</i>	64	128	32	8	32	8	32	> 2048	128	1024	128	1	<i>vanB</i>
32	Orthopaedic	Faeces	<i>E. faecium</i>	128	1024	> 4096	16	256	8	4	> 2048	8	256	256	0.5	<i>vanB</i>
34	Haematology	Faeces	<i>E. faecium</i>	128	> 1024	4096	512	0.5	1024	4	> 2048	1024	512	512	0.5	<i>vanB</i>
38	Renal	Faeces	<i>E. faecium</i>	64	512	2048	2048	0.5	1024	2	> 2048	512	1024	512	0.25	<i>vanB</i>
39	Renal	Faeces	<i>E. faecium</i>	128	512	8	64	128	0.03	8	> 2048	0.5	32	1024	128	<i>vanA</i>
42	Renal	Faeces	<i>E. faecium</i>	0.25	4	64	8	128	< 0.03	64	> 2048	2	4	1024	128	<i>vanA</i>
47	Renal	Faeces	<i>E. faecium</i>	128	> 1024	> 4096	1024	256	16	32	> 2048	1	128	512	128	<i>vanA</i>

M, male; F, female; ICU, intensive care unit; CICU, cardiology ICU; AMP, ampicillin; PEN, penicillin; STR, streptomycin; GM, gentamicin; TE, tetracycline; RA, rifampicin; C, chloramphenicol; E, erythromycin; NOR, norfloxacin; IMP, imipenem; VA, vancomycin; TEC, teicoplanin.



**Fig. 1.** Agarose gel electrophoresis of amplified *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3*, *E. faecalis*-specific, *E. faecium*-specific and *rrs* genes by the multiplex PCR assay containing seven primer sets. Lanes: 1, *E. faecalis vanB*; 2 and 5, *E. gallinarum vanC1*; 3, *E. faecalis vanA*; 4 and 6, *E. casseliflavus/flavescens*; 7, *E. faecium vanB*; 8, *E. faecium vanA*; M, 1-kb DNA ladder.

confirmed the specificity of the *vanA* and *vanB* primers in the *E. faecium* and *E. faecalis* isolates. The results of PCR analysis were in agreement with the identification and resistance phenotype for all but two isolates. For these non-motile strains, identification by conventional methods was unclear, but the PCR assay yielded products corresponding to *E. gallinarum*.

### Risk factors for colonisation with VRE

Renal dialysis and central venous catheterisation were associated with an increased risk of intestinal colonisation with VRE (p 0.004 and p 0.003, respectively). The use of antibiotic therapy in

general was not recognised as a risk factor, but glycopeptide use was associated with colonisation with VRE (Table 3) (p 0.041). Following logistic regression analysis, only previous use of vancomycin was found to be significantly and independently associated with intestinal colonisation with VRE (odds ratio 3.2; p 0.0374; 95% confidence interval 0.07–9.56). Data from the pharmacy department showed that use of vancomycin in the ICU increased from 137 defined daily doses (DDD)/1000 patient-days in 1998, to 143 DDD/1000 patient-days in 1999, to 271 DDD/1000 patient-days in 2000. Similar increases were recorded in other departments (haematology, orthopaedics, etc.).

### DISCUSSION

Vancomycin resistance does not emerge *de novo* in susceptible enterococci exposed to this agent. Therefore, the first step towards infection with VRE must be exposure to a resistant enterococcal strain. There have been several epidemiological studies on the ways in which patients come into contact with VRE. It is believed that resistant strains are spread in hospitals primarily by cross-contamination. The results of recent molecular epidemiological studies have refined our understanding of this phenomenon. If VRE are not controlled as soon as possible, sporadic cases may evolve into a monoclonal outbreak, which may

**Table 3.** Univariate risk factor analysis for intestinal colonisation with vancomycin-resistant enterococci (VRE)

Variable	No (%) of VRE carriers (n = 41)	No (%) of negative controls (n = 177)	p value
Male	20 (48.8)	104 (58.8)	0.32
Mean age (years)	57.1 ± 17.74	53.4 ± 23.64	0.34
Mean days of hospitalisation	7.6 ± 15.22	10 ± 20.07	0.46
Previous antibiotic therapy	14 (34.1)	76 (42.9)	0.393
Use of penicillins	6 (14.6)	33 (18.1)	0.767
Use of cephalosporins	8 (19.5)	43 (24.3)	0.655
Use of aminoglycosides	3 (7.3)	16 (9)	0.964
Use of quinolones	3 (7.3)	12 (6.8)	0.826
Use of anti-anaerobe antibiotics	4 (9.8)	19 (9.6)	0.79
Use of glycopeptides	6 (14.6)	9 (5.1)	0.041
Recent surgery	6 (14.6)	24 (13.6)	0.943
Central venous catheter	28 (68.3)	73 (41.2)	0.003
Tracheostomy	2 (4.9)	4 (2.3)	0.69
Intubation	4 (9.6)	9 (5.1)	0.44
Indwelling urine catheter	7 (17.1)	27 (15.3)	0.96
Renal dialysis	22 (53.7)	51 (28.8)	0.004
Gastroscopy	2 (4.9)	2 (1.1)	0.33
Colonoscopy	1 (2.4)	4 (2.3)	0.61

p values were calculated with the chi-square test with Yates' correction.

then evolve to polyclonal endemicity [35]. Thus, in hospitals where outbreaks of VRE are detected at an early stage, they have been caused by a single strain [24,36–38], whereas multiple clones are encountered when VRE have been present in a hospital for a long time [24,39].

*E. faecium* was the clinical isolate detected most frequently in our patients, with only a single vancomycin-resistant strain of *E. faecalis* being isolated. In addition, two different strains (one *E. gallinarum* and one *E. faecium*) were derived from the same patient during this period. The isolates from infected patients demonstrated variability in their vancomycin resistance phenotypes, with VanB being the predominant phenotype of the *E. faecium* clinical isolates. However, the VanA phenotype was detected in *E. faecium* and *E. faecalis*, and the VanC phenotype was detected in *E. gallinarum*, indicating wide institutional spread of vancomycin-resistant enterococci. These data suggest that the hospital had been colonised previously with undetected strains of VRE.

Specific surveillance of patients to detect gastrointestinal colonisation has often proved useful during outbreaks and should be considered an essential component of successful control programmes for VRE [15,27,36,37]. The present study detected faecal carriers in most of the wards with patients infected with VRE, but not among patients in the nephrology and internal medicine wards. However, these patients were previously cared for in departments with high prevalence rates. Faecal carriers of VanA<sup>+</sup> or VanB<sup>+</sup> strains

were also found in departments where no infection with VRE had been detected, indicating further dissemination within the hospital. In Europe, the reported prevalences of faecal colonisation with VRE among hospitalised patients are 2% in The Netherlands [40], 2.7% in the UK [41], 4.9% in the ICUs of French general hospitals [42], and 3.5% in Belgium [7]. The prevalence rate (18.8%) found in the present study was higher than those reported elsewhere in Europe, and seems closer to the levels reported from Texas (16%) and New York (28%) [37,43].

The distribution pattern of carriage of VRE observed in the USA showed a predominance of *E. faecium* isolates [44,45], but the proportions of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus* isolates were very low, ranging from 0.5% to 1% [44], while 59.5% of the isolates in the present study were *E. gallinarum* and 14.2% were *E. casseliflavus/flavescens*. The results of a few European studies have shown variable isolation rates of these species, ranging from 5.9% to 13.6% [7,40,42]. Since *E. gallinarum* and *E. casseliflavus* are recovered rarely from clinical specimens, these species are not always taken into account, because their resistance to glycopeptides is intrinsic and their pathogenicity is low.

Inter-hospital spread of clonal strains, suggesting patient-to-patient transmission, is the factor responsible for most outbreaks of VRE in the USA [39,44,45]. VRE (mainly with the *vanA* genotype) are isolated frequently from non-hospitalised patients, animals and environmental sources in Europe [7,16,46,47]. Passage of these bacteria from animals through the food chain has linked this community source of VRE to the extensive use of avoparcin, a glycopeptide used as an animal food supplement [11,16,48]. Furthermore, macrolides (e.g., tylosin), which are also used for growth promotion of animals, may lead to co-selection of enterococci resistant to macrolides and glycopeptides [49,50]. The linkage of erythromycin and vancomycin resistance genes in Greek strains of *E. faecium* has already been described by Maniatis *et al.* [25]. In the present study, all isolates were resistant to erythromycin, with the exception of one *E. faecium* isolate, but the use of macrolides in humans was not detected as a risk factor, as none of the patients infected with or carrying VRE had a history of previous exposure to macrolides.

The present study identified host risk factors for colonisation with VRE as use of glycopeptides,

presence of a central venous catheter, and renal dialysis, associated indirectly with the patient's underlying illness. It was also confirmed that use of vancomycin significantly and independently influenced ( $p$  0.041) selection for VRE in the intestinal flora, but that use of cephalosporins or any other antibiotic did not. Vancomycin use seems to play a crucial role in increased faecal carriage and, subsequently, development of infection. This may also be a possible explanation for the higher frequency and the wider distribution of the VanB resistance type. High-level vigilance with continuous surveillance and laboratory-oriented infection control measures are necessary to improve the current situation.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was presented in part at the 12th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Milan, Italy, 2002. We thank S. Dimitriou for her excellent assistance with the molecular techniques.

## REFERENCES

- Emori TG, Gaynes RB. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1993; **6**: 428–442.
- Moellering RC. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin Infect Dis* 1992; **14**: 1173–1178.
- Centers for Disease Control and Prevention. Nosocomial enterococci resistant to vancomycin—United States, 1989–1993. *MMWR* 1993; **42**: 597–599.
- Leclercq R. Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin Infect Dis* 1997; **24**(suppl 1): S80–S84.
- Uttley AHE, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1988; **i**: 57–58.
- Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin of *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med* 1988; **319**: 157–161.
- Gordts B, Van Landuyt H, Ieven M, Vandamme P, Goossens H. Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 2842–2846.
- Bell JM, Paton JC, Turnidge J. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 2187–2190.
- Miyazaki S, Ishii Y, Ohno A *et al.* In-vitro activities of 11 antibiotics against vancomycin-resistant enterococci isolated in Japan. *J Antimicrob Chemother* 1999; **44**: 415–416.
- Von Gottberg A, van Nierop W, Duse A *et al.* Epidemiology of glycopeptide-resistant enterococci colonizing high-risk patients in hospitals in Johannesburg, Republic of South Africa. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 905–909.
- Shay DK, Maloney SA, Monteclavo M *et al.* Epidemiology and mortality risk of vancomycin-resistant enterococcal blood stream infections. *J Infect Dis* 1995; **172**: 993–1000.
- Edmont MD, Ober JF, Weinbaum JL *et al.* Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: risk factors for infection. *Clin Infect Dis* 1995; **20**: 1126–1133.
- Gambarotto K, Ploy MC, Turlure P *et al.* Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and nonhospitalized controls in a cattle-rearing area in France. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 620–624.
- Morris JG, Shay DK, Hebden JN *et al.* Enterococci resistant to multiple antimicrobial agents, including vancomycin. Establishment of endemicity in a university medical center. *Ann Intern Med* 1995; **123**: 250–259.
- Bates J, Jordens JZ, Griffiths DT. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. *J Antimicrob Chemother* 1994; **34**: 507–516.
- Aarestrup FM. Occurrence of glycopeptide resistance among *E. faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. *Microb Drug Resist* 1995; **1**: 255–257.
- Leclercq R, Dutka-Malen S, Duval J, Courvalin P. Vancomycin resistance gene *vanC* is specific to *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; **36**: 2005–2008.
- Navarro F, Courvalin P. Analysis of genes encoding D-alanine–D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; **38**: 1788–1793.
- Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *E. faecium*. *N Engl J Med* 1988; **319**: 157–161.
- Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**: 1563–1571.
- Perichon B, Reynolds P, Courvalin P. VanD-type glycopeptide resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**: 2016–2018.
- Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahn DF, Courvalin P. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 2161–2164.
- Clark NC, Cooksey RC, Hill BC, Swenson JM, Tenover FC. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from US hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**: 2311–2317.
- Demertzi E, Palepou MF, Kaufmann ME, Avlami A, Woodford N. Characterization of VanA and VanB elements from glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* from Greece. *J Med Microbiol* 2001; **50**: 682–687.
- Maniatis AN, Pournaras S, Kanellou M *et al.* Dissemination of clonally unrelated erythromycin- and glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolates in a tertiary Greek hospital. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 4571–4574.
- Centers for Disease Control and Prevention. Preventing the spread of vancomycin resistance—report from the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Fed Reg* 1994; **59**: 25758–25763.
- Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; **16**: 105–113.
- Landman D, Quale JM, Oydna E *et al.* Comparison of five selective media for identifying fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1996; **34**: 751–752.
- Ieven M, Vercauteren E, Descheemaeker P, Van Laer F, Goossens H. Comparison of direct plating and broth

- enrichment culture for the detection of intestinal colonization by glycopeptide-resistant enterococci among hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 1436–1440.
30. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial susceptibility tests*. Approved standard M2-A6. Wayne, PA: NCCLS, 1997.
  31. Shulz JE, Sahm DE. Reliability of the E test for detection of ampicillin, vancomycin, and high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus* spp. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 3336–3339.
  32. Facklam RR, Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by conventional test scheme. *J Clin Microbiol* 1989; **27**: 731–734.
  33. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Approved standard M7-A4. Wayne, PA: NCCLS, 1997.
  34. Kariyama R, Mitsuhata R, Chow JW, Clewell DB, Kumon H. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 3092–3095.
  35. Hayden MK. Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant enterococci. *J Infect Dis* 2000; **31**: 1058–1065.
  36. Boyce JM, Mermel LA, Zervos MJ *et al.* Controlling vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; **16**: 634–637.
  37. Boyce JM, Opal SM, Chow JW *et al.* Outbreak of multi-drug resistant *Enterococcus faecium* with transferable VanB class vancomycin resistance. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 1148–1153.
  38. Montecalvo MA, deLancestre H, Carraher M *et al.* Natural history of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; **16**: 680–685.
  39. Handwerker S, Skoble J, Discotto LF, Pucci MJ. Heterogeneity of the *vanA* gene in clinical isolates of enterococci from the Northeastern United States. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 362–368.
  40. Endtz HP, Van den Braak N, Van Belkum A *et al.* Fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients and those living in the community in The Netherlands. *J Clin Microbiol* 1997; **35**: 3026–3031.
  41. Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JAA, Meis JFG *et al.* Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; **19**: 816–822.
  42. Boisvion A, Thibault M, Leclercq R. Colonization by vancomycin-resistant enterococci of the intestinal tract of patients in intensive care units from French general hospitals. *Clin Microbiol Infect* 1997; **3**: 175–179.
  43. Perlada DE, Smulian AG, Cushion MT. Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of enterococci in Cincinnati, Ohio: prospective citywide survey. *J Clin Microbiol* 1997; **35**: 2342–2347.
  44. Wells CL, Juni BA, Cameron SB *et al.* Stool carriage, clinical isolation, and mortality during an outbreak of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized medical and/or surgical patients. *Clin Infect Dis* 1995; **21**: 45–50.
  45. Frieden TR, Munsiff SS, Low DE *et al.* Emergence of vancomycin-resistant enterococci in New York City. *Lancet* 1993; **342**: 76–79.
  46. Vandamme P, Vercauteren E, Lammens C *et al.* Survey of enterococcal susceptibility patterns in Belgium. *J Clin Microbiol* 1996; **34**: 2572–2576.
  47. Van der Auwera P, Pensart N, Korten V, Murray BE, Leclercq R. Influence of oral glycopeptides on the fecal flora of human volunteers: selection of highly glycopeptide-resistant enterococci. *J Infect Dis* 1996; **173**: 1129–1136.
  48. Klare I. *vanA*-mediated high-level glycopeptide resistance in *E. faecium* from husbandry. *FEMS Microbiol Lett* 1995; **125**: 165–172.
  49. Aarestrup FM. Characterization of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* (GRE) from broilers and pigs in Denmark: genetic evidence that persistence of GRE in pig herds is associated with coselection by resistance to macrolides. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 2774–2777.
  50. Aarestrup FM, Seyfarth AM, Emborg HD, Pedersen K, Hendriksen RS, Bager F. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 2054–2059.

## Epidemiology and Molecular Analysis of Intestinal Colonization by Vancomycin-Resistant Enterococci in Greek Hospitals

Achilleas Gikas,<sup>1\*</sup> Athanasia Christidou,<sup>1</sup> Efstathia Scoulica,<sup>1</sup> Paulos Nikolaidis,<sup>3</sup> Athanasios Skoutelis,<sup>2</sup> Stamatina Levidiotou,<sup>4</sup> Sofia Kartali,<sup>5</sup> Efstratios Maltezos,<sup>5</sup> Simeon Metalidis,<sup>3</sup> John Kioumis,<sup>6</sup> George Haliotis,<sup>7</sup> Sofia Dima,<sup>8</sup> Maria Roubelaki,<sup>1</sup> Nikoleta Papageorgiou,<sup>1</sup> Evangelos I. Kritsotakis,<sup>1</sup> and Yannis Tselentis<sup>1</sup>

Department of Clinical Bacteriology, Parasitology, Zoonosis and Geographical Medicine, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece<sup>1</sup>; Department of Infectious Diseases, University Hospital of Patras, Patras, Greece<sup>2</sup>; Department of Internal Medicine, "AHEPA" General Hospital, Thessaloniki, Greece<sup>3</sup>; Department of Microbiology-Infectious Diseases, University Hospital of Ioannina, Ioannina, Greece<sup>4</sup>; Department of Microbiology-Infectious Diseases, University Hospital of Alexandroupolis, Alexandroupolis, Greece<sup>5</sup>; Department of Intensive Care Unit, "Papanikolaou" General Hospital, Thessaloniki, Greece<sup>6</sup>; Department of Internal Medicine, General Hospital of Chalkis, Euboea, Greece<sup>7</sup>; and Patient Care Area of Internal Medicine, General Hospital of Chania, Chania, Greece<sup>8</sup>

Received 3 June 2005/Returned for modification 20 July 2005/Accepted 5 August 2005

**From 1,246 specimens collected from 13 Greek hospitals, 266 vancomycin-resistant enterococci strains were isolated from 255 patients (20.5%). The VanA phenotype was present in 82 (30.8%) strains, the VanB phenotype in 17 (6.4%) strains, the VanC1 phenotype in 152 (57.1%) strains, and the VanC2/C3 phenotypes in 15 (5.6%) strains. When only VanA and VanB phenotypes were considered, the overall prevalence was 7.5%. Eighty-six isolates exhibiting the VanA or VanB phenotype were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and 46 PFGE groups were found.**

In Greece, the first clinical isolate of *Enterococcus faecium* with the VanA phenotype was reported in 2000 (10). Introduction and dissemination of vancomycin-resistant enterococcus (VRE) strains in two tertiary hospitals were also reported in the same year (3, 9). At the end of 2000, a cluster of VRE cases was investigated at the University Hospital of Heraklion (1). New cases of VRE infection were detected during 2002 in the same hospital. In order to estimate the rates of intestinal colonization, characterize the isolates, and investigate the molecular epidemiology of VRE in Greek hospitals, a point-prevalence study was undertaken.

On 1 November 2002, 13 hospitals (5 university and 8 district general [DG]) scattered throughout the country participated in the study (Fig. 1). Through one-in-four systematic sampling, patients from every patient-care unit were randomly selected.

Patients' selection, specimen collection and culture, and identification, and determination of resistance to vancomycin were performed in every hospital by the same methodology. Isolates were sent to a reference center for further investigation with molecular methods.

Fecal samples or rectal swabs were obtained and cultured in *Enterococcus* broth and bile esculine azide agar, both supplemented with 6 mg/liter of vancomycin (1). The isolates were primarily identified as enterococci, subsequently tested for resistance to glycopeptides by the disk diffusion agar method, and further confirmed by E-test according to the manufacturer's guidelines (AB Biodisk, Solua, Sweden). Species level identification was performed by conventional methods (biochemical characteristics, motility, and pigment production).

Species identification and resistance phenotypes were confirmed by a multiplex PCR assay as described elsewhere (1, 8).

Clonal distribution of strains harboring either the *vanA* or the *vanB* locus was examined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of SmaI chromosomal macrorestriction digest (11, 15).

A total of 1,246 specimens were tested and 266 VRE strains were isolated from 255 (20.5%) patients. Species distribution was as follows: *E. faecium*, 79 strains (29.7%); *Enterococcus*



FIG. 1. Distribution of participating hospitals in the Greek territory.

\* Corresponding author. Mailing address: University Hospital of Heraklion-1352/71110, Crete, Greece. Phone: 00.30.2810.375050. Fax: 00.30.2810.392847. E-mail: gikas@med.uoc.gr.

TABLE 1. VRE prevalence by hospital and ward type

Participating hospital	Hospital type <sup>a</sup>	No. of beds	VRE proportion (%) in:				
			Renal unit	Adult ICU	Medical wards	Surgical wards	All wards
THES-1	UN	700		10/32 (31.3)	15/58 (25.9)	14/37 (37.8)	39/128 (30.5)
HER-1	UN	700	22/61 (36.1)	4/22 (18.2)	20/67 (29.9)	15/38 (39.5)	61/204 (29.9)
PT-1	UN	600	2/27 (7.4)	1/9 (11.1)	21/53 (39.6)	10/22 (45.5)	34/126 (27.0)
AL-1	UN	450	1/33 (3.0)	1/6 (16.7)	3/37 (8.1)	1/16 (6.3)	6/100 (6.0)
IO-1	UN	650		1/12 (8.3)	2/89 (2.2)	0/4 (0.0)	3/119 (2.5)
HER-2	DG	450	49/74 (66.2)	1/3 (33.3)	21/40 (52.5)	6/19 (31.6)	77/149 (51.7)
CH-1	DG	250	4/13 (30.8)		6/10 (60.0)	2/6 (33.3)	12/29 (41.4)
CH-2	DG	200		0/2 (0.0)	3/30 (10.0)	4/22 (18.2)	7/54 (13.0)
AL-2	DG	200		0/2 (0.0)	1/10 (10.0)	0/7 (0.0)	1/19 (5.3)
AL-3	DG	250	0/39 (0.0)		0/5 (0.0)	5/24 (20.8)	5/68 (7.4)
AL-4	DG	200	0/2 (0.0)	0/2 (0.0)	2/26 (7.7)	0/13 (0.0)	2/45 (4.4)
THES-2	DG	700	2/28 (7.1)	2/43 (4.7)	1/64 (1.6)	3/51 (5.9)	8/186 (4.3)
AL-5	DG	100		0/1 (0.0)	0/11 (0.0)	0/7 (0.0)	0/19 (0.0)
UN hospitals			25/121 (20.7)	17/81 (21.0)	61/304 (20.1)	40/117 (34.2)	143/677 (21.1)
DG hospitals			55/156 (35.3)	3/53 (5.7)	34/196 (17.3)	20/149 (13.4)	112/569 (19.7)
All hospitals			80/277 (28.9)	20/134 (14.9)	95/500 (19.0)	60/266 (22.6)	255/1,246 (20.5)

<sup>a</sup> UN, university-affiliated hospital.

*faecalis*, 12 (4.5%); *Enterococcus gallinarum*, 153 (57.5%); *Enterococcus casseliflavus/flavescens*, 16 (6.0%); *Enterococcus avium*, 4 (1.5%); and *Enterococcus hirae*, 2 (0.8%). The highest prevalence was detected in renal dialysis units (28.9%) followed by surgical and medical wards (22.6% and 19.0%, respectively). Adult intensive care units (ICUs) had the lowest prevalence (14.9%). No VRE was obtained from neonatal ICUs (Table 1).

No significant difference of overall VRE frequencies was observed between university and DG hospitals ( $\chi^2$  test,  $P = 0.531$ ). However, stratification by patient-care area showed that university hospitals had higher rates for ICUs and surgical wards ( $\chi^2$  test,  $P = 0.015$  and  $P < 0.001$ , respectively). DG hospitals had higher rates in renal dialysis units ( $\chi^2$  test,  $P = 0.008$ ).

Analysis of VRE phenotypes showed significantly different frequencies between the university and DG hospitals ( $\chi^2$  test,  $P = 0.001$ ). VanA and VanB rates were higher in the university hospitals than in DG hospitals (39.6% and 8.1% versus 19.7% and 4.3%, respectively), whereas rates of isolates with VanC1

and VanC2/C3 phenotypes were higher in DG hospitals than in university hospitals (68.4% and 7.7% versus 48.3% and 4%, respectively).

When the isolates with the VanA and VanB phenotypes were considered as a group separately from the isolates with the VanC phenotypes, different results were obtained. Ninety-nine such strains were isolated from 93/1,246 patients, giving a prevalence of VRE with the VanA/B phenotypes of 7.5% (Table 2).

The highest prevalence of VRE with the VanA/B phenotypes was detected in medical wards (9.4%), followed by surgical wards (8.6%), adult ICUs (6.0%), and renal dialysis units (5.4%).

At the ward level, university hospitals had higher frequencies regarding VanA and VanB phenotypes for renal dialysis units and surgical wards than DG hospitals ( $\chi^2$  test,  $P = 0.002$  and  $P = 0.017$ , respectively), whereas for ICUs and medical wards, no difference was observed ( $\chi^2$  test,  $P = 0.903$  and  $P = 0.165$ , respectively).

PCR results were in agreement with the identification and

TABLE 2. VRE prevalence (isolates with VanA/VanB phenotypes) by hospital and ward type

Participating hospital	Hospital type <sup>a</sup>	No. of beds	Proportion of VRE with VanA/B phenotypes (%) in:				
			Renal unit	Adult ICU	Medical wards	Surgical wards	All wards
THES-1	UN	700		1/32 (3.1)	1/58 (1.7)	1/37 (2.7)	3/128 (2.3)
HER-1	UN	700	0/61 (16.4)	2/22 (9.1)	11/67 (16.4)	8/38 (21.1)	31/204 (15.2)
PT-1	UN	600	1/27 (3.7)	1/9 (11.1)	20/53 (37.7)	7/22 (31.8)	29/126 (23.0)
AL-1	UN	450	0/33 (0.0)	0/6 (0.0)	0/37 (0.0)	1/16 (6.3)	1/100 (1.0)
IO-1	UN	650		1/12 (8.3)	1/89 (1.1)	0/4 (0.0)	2/119 (1.7)
HER-2	DG	450	4/74 (5.4)	1/3 (33.3)	10/40 (25.0)	1/19 (5.3)	16/149 (10.7)
CH-1	DG	250	0/13 (0.0)		0/10 (0.0)	0/6 (0.0)	0/29 (0.0)
CH-2	DG	200		0/2 (0.0)	0/30 (0.0)	0/22 (0.0)	0/54 (0.0)
AL-2	DG	200		0/2 (0.0)	1/10 (10.0)	0/7 (0.0)	1/19 (5.3)
AL-3	DG	250	0/39 (0.0)		0/5 (0.0)	2/24 (8.3)	2/68 (2.9)
AL-4	DG	200	0/2 (0.0)	0/2 (0.0)	2/26 (7.7)	0/13 (0.0)	2/45 (4.4)
THES-2	DG	700	0/28 (0.0)	2/43 (4.7)	1/64 (1.6)	3/51 (5.9)	6/186 (3.2)
AL-5	DG	100		0/1 (0.0)	0/11 (0.0)	0/7 (0.0)	0/19 (0.0)
UN hospitals			11/121 (9.1)	5/81 (6.2)	33/304 (10.9)	17/117 (14.5)	66/677 (9.7)
DG hospitals			4/156 (2.6)	3/53 (5.7)	14/196 (7.1)	6/149 (4.0)	27/569 (4.7)
All hospitals			15/277 (5.4)	8/134 (6.0)	47/500 (9.4)	23/266 (8.6)	93/1,246 (7.5)

<sup>a</sup> UN, university-affiliated hospital.

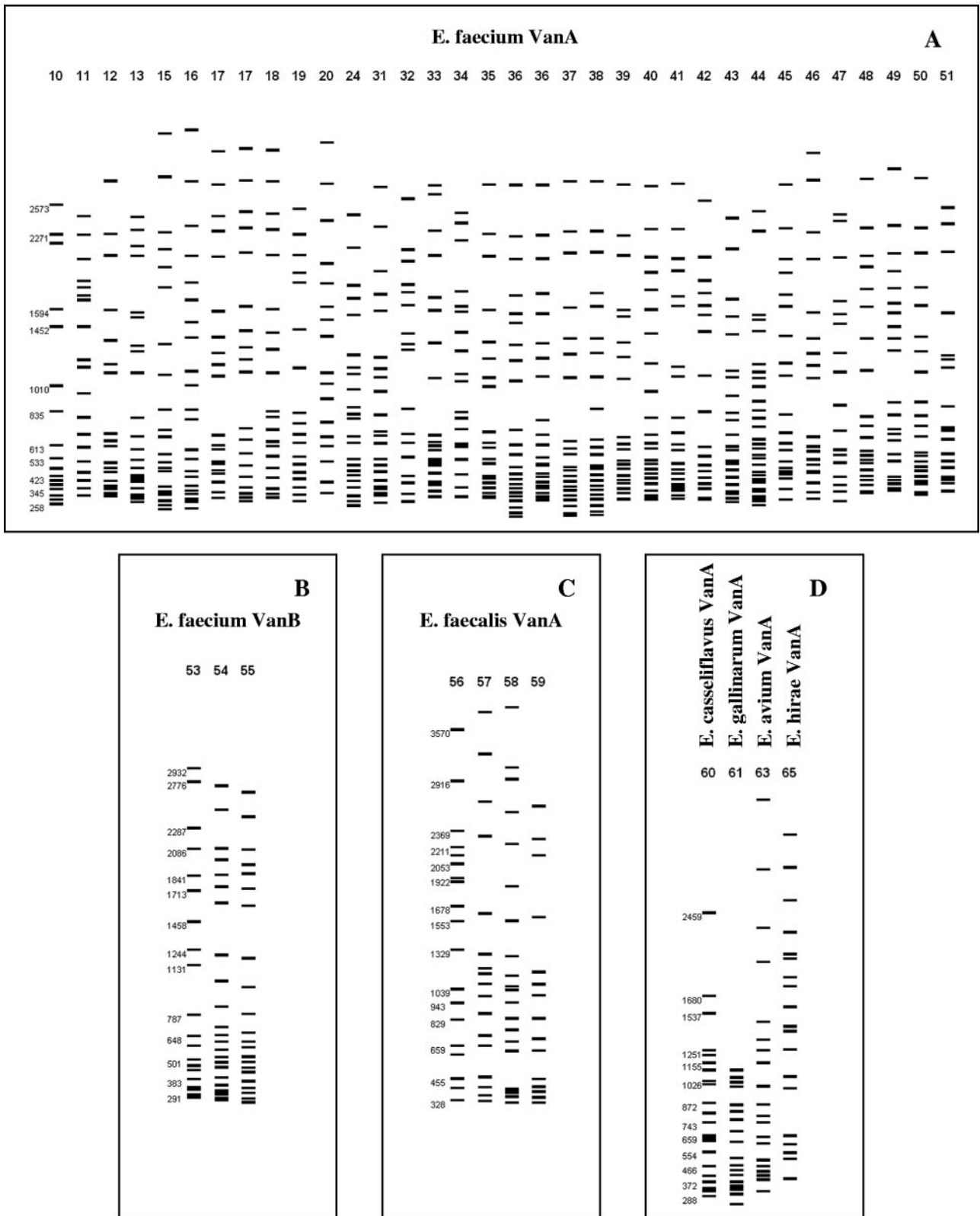


FIG. 2. The distinct PFGE patterns of *E. faecium* with the VanA phenotype (panel A), *E. faecium* with the VanB phenotype (panel B), and *E. faecalis* with the VanA phenotype (panel C). All the other VanA-resistant enterococci are shown in panel D.



resistance phenotypes of all isolates. For the four *E. avium* and two *E. hirae* isolates, PCR amplification yielded only the *vanA* resistance element. One *E. gallinarum* isolate and one *E. casseliflavus* isolate generated products corresponding to the presence of *vanA* gene along with the *vanC1* and *vanC2/C3* genes, respectively.

Eighty-six isolates exhibiting the VanA or VanB phenotype were analyzed by PFGE, and 46 distinct patterns are depicted (Fig. 2) (13). The 65 *E. faecium* isolates with the VanA phenotype formed 32 patterns, whereas the 4 *E. faecalis* isolates with the VanA phenotype formed 4 patterns. Ten *E. faecium* isolates with the VanB phenotype formed four patterns, and four *E. avium* isolates with the VanA phenotype formed three patterns. Three different VanA phenotype patterns were formed from *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, and *E. hirae* isolates, respectively.

The patterns of the isolates collected, in all except two hospitals, were clearly unrelated. In hospital HER-1, 17 different patterns were found; in PT-1, 19; in HER-2, 5; in THES-1, 2; in THES-2, 3; and in IO-1, 2.

In hospital HER-2, 10 strains with the VanA phenotype out of 15 (66.7%) exhibited a distinct PFGE pattern. This pattern was also found in three isolates in the neighboring hospital (HER-1). In HER-1, three groups of seven, three, and six strains with identical PFGE patterns together accounted for 51.6% (16/31) of the tested strains. These three clusters showed two different phenotypic profiles for *E. faecium* with the VanA phenotype and one phenotypic profile for *E. faecium* with the VanB phenotype.

Our study provides the first estimation of the intestinal colonization with VRE in Greek hospitals. These rates are among the highest reported in Europe (6, 12).

In this study, no VRE colonization was found in the neonatal units, which is consistent with the literature (14).

When the isolates with the VanC phenotypes, having a low clinical impact, were excluded and rates of isolates with the VanA/B phenotypes were considered separately, the overall rate was much lower (7.5%) and a different distribution by ward and hospital type was revealed. Thus, the inclusion of the isolates with VanC phenotypes may lead to an overestimation of the clinical problem and to the detection of completely different areas of concern for epidemiological intervention or prevention actions.

One *E. gallinarum* *vanA*-harboring strain and one *E. casseliflavus* *vanA*-harboring strain were isolated in the present study. This type of resistance was first described by Dutka-Malen et al. in 1994 (5). *E. gallinarum* and *E. casseliflavus* *vanA*-harboring strains (0.7% of *vanA* isolates each) were detected in renal dialysis units in Belgium (4). Recently, a dissemination of *E. gallinarum* with the VanA phenotype within an ICU was reported in Argentina (2).

It has been suggested that if VRE are not controlled soon after introduction into a hospital, clonal outbreaks may evolve, subsequently leading to polyclonal endemicity (7). Accordingly, strains coming from hospital HER-1 may have been recently introduced in the neighboring hospital, HER-2, since 10 out of 15 strains exhibited the same PFGE profile of *E. faecium* with the VanA phenotype. Moreover, our findings

indicate an endemic situation already installed within HER-1 and PT-1 hospitals. In the remaining hospitals, the numbers of isolates are too small to draw conclusions on the PFGE patterns. However, one could suggest that the introduction of VRE is recent, as such isolates had not been previously detected.

Surveillance for VRE is not routinely performed in Greece, and isolation procedures are sporadically employed. Thus, prompt attention for the detection of new cases of VRE colonization and disease and employment of infection control policies are mandatory, so as to control this pathogen and prevent emergence on a wide scale. The use of molecular methods is especially important in identifying breakdown in infection control measures.

We thank Peggy Kanellos for her assistance in editing and literature research concerning this study.

#### REFERENCES

- Christidou, A., A. Gikas, E. Scoulica, J. Padiaditis, M. Roubelaki, A. Georgiadakis, and Y. Tselentis. 2004. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital in Crete, Greece: a cluster of cases and prevalence study on intestinal colonisation. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**:999-1005.
- Corso, A., D. Faccione, P. Galletti, A. Togneri, H. Lopardo, R. Melano, V. Rodriguez, M. Rodriguez, and M. Galas. 2005. First report of VanA *Enterococcus gallinarum* dissemination within an intensive care unit in Argentina. *Int. J. Antimicrob. Agents* **25**:51-56.
- Demertzi, E., M. F. Palepou, M. E. Kaufmann, A. Avlami, and N. Woodford. 2001. Characterisation of VanA and VanB elements from glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* from Greece. *J. Med. Microbiol.* **50**:682-687.
- Descheemaeker, P., M. Leven, S. Chapelle, C. Lammens, M. Hauchecorne, M. Wijdooghe, P. Vandamme, and H. Goossens. 2000. Prevalence and molecular epidemiology of glycopeptide-resistant enterococci in Belgian renal dialysis units. *J. Infect. Dis.* **181**:235-241.
- Dutka-Malen, S., B. Blaimont, G. Wauters, and P. Courvalin. 1994. Emergence of high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:1675-1677.
- Goossens, H., D. Jabes, R. Rossi, C. Lammens, G. Privitera, and P. Courvalin. 2003. European survey of vancomycin-resistant enterococci in at-risk hospital wards and in vitro susceptibility testing of ramoplanin against these isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**(Suppl. 3):iii5-iii12.
- Hayden, M. K. 2000. Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Infect. Dis.* **31**:1058-1065.
- Kariyama, R., R. Mitsuhashi, J. W. Chow, D. B. Clewell, and H. Kumon. 2000. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3092-3095.
- Maniatis, A. N., S. Pournaras, M. Kanellopoulou, F. Kontos, E. Dimitroulia, E. Papafrangas, and A. A. Tsakris. 2001. Dissemination of clonally unrelated erythromycin and glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolates in a tertiary Greek hospital. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4571-4574.
- Platsouka, E. D., H. Dimopoulou, V. Miriagou, and O. Paniara. 2000. The first clinical isolates of *Enterococcus faecium* with the VanA phenotype in a tertiary Greek hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:1039-1040.
- Saeedi, B., A. Hallgren, J. Jonasson, L. E. Nilsson, H. Hanberger, and B. Isaksson. 2002. Modified pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of enterococci. *APMIS* **110**:869-874.
- Schouten, M. A., J. A. Hoogkamp-Korstanje, J. F. Meis, and A. Voss. 2000. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**:816-822.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2233-2239.
- Toledano, H., Y. Schlesinger, D. Raveh, B. Rudensky, D. Attias, A. I. Eidelman, and A. M. Yinnon. 2000. Prospective surveillance of vancomycin-resistant enterococci in a neonatal intensive care unit. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**:282-287.
- Turabelidze, D., M. Kotetishvili, A. Kreger, J. G. Morris, Jr., and A. Sulakvelidze. 2000. Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol.* **38**:4242-4245.