



Πανεπιστήμιο Κρήτης
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Ιατρικής

The State University of New York at Buffalo
Roswell Park Cancer Institute
Department of Medicine
Division of Infectious Diseases

**ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟ ΑΣΘΕΝΩΝ
ΑΠΟ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟ ΣΤΗ ΒΑΝΚΟΜΥΚΙΝΗ ΣΕ ΕΝΑ
ΤΡΙΤΟΒΑΘΜΙΟ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ**

Διδακτορική Διατριβή

Νικόλαος Γ. Αλμυρούδης
Ιατρός

Ηράκλειο Κρήτης
Μάιος 2013

*Αφιερώνεται στους γονείς μου,
Γεώργιο και Ξενία Αλμυρούδη*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδες
Όρκος του Ιπποκράτη	8
Χαρακτηριστικά της διδακτορικής διατριβής	9
Ευχαριστίες	10
Ελληνική περίληψη	11
Αγγλική περίληψη (Summary in English)	14
Πρόλογος	17

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή	19
2. Ιστορικά ορόσημα	19
3. Ταξινόμηση και ιδιαίτερα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά	21
4. Επιδημιολογία	23
4.1. Επιδημιολογία του ανθεκτικού στη βανκομυκίνη <i>Enterococcus faecium</i>	23
4.2. Μοριακή επιδημιολογία του ανθεκτικού στη βανκομυκίνη <i>Enterococcus faecium</i>	24
5. Παθογένεση	25
5.1. Μετάδοση και αποικισμός από στελέχη Εντερόκοκκου ανθεκτικού στη βανκομυκίνη	25
5.2. Ο ρόλος των αντιβιοτικών στην εξάπλωση και κυριαρχία στην εντερική χλωρίδα	27
5.3. Ο ρόλος της φυσικής ανοσίας στην εξάπλωση και κυριαρχία στην εντερική χλωρίδα	29
5.4. Κυριαρχία στην εντερική χλωρίδα και νόσος	30
6. Παράγοντες παθογονικότητας	31
7. Κλινικές Εκδηλώσεις	33
8. Διάγνωση και κλινική μικροβιολογία	34
8.1. Καλλιέργεια και ταυτοποίηση Εντεροκοκκικών ειδών	34
8.2. Προσδιορισμός ευαισθησίας στα αντιβιοτικά	36
8.2.1. Αντοχή στην πενικιλίνη και αμπικιλίνη	36
8.2.2. Αντοχή στις αμινογλυκοσίδες και προσδιορισμός συνέργειας	37
8.3. Έγκαιρη αναγνώριση Εντερόκοκκου ανθεκτικού στη βανκομυκίνη	37
9. Γενετική και μηχανισμοί αντοχής	38
9.1. Αντοχή στην αμπικιλίνη και τα β-λακταμικά αντιβιοτικά	38
9.2. Αντοχή στις αμινογλυκοσίδες	38
9.3. Αντοχή στη βανκομυκίνη	39
10. Θεραπεία	42

10.1. Αντιβιοτικά πρώτης επιλογής και εναλλακτικές θεραπείες	42
10.2. Συνέργεια αντιβιοτικών και ενδείξεις	43
10.3. Θεραπεία ανθεκτικών στελεχών	45
10.3.1. Θεραπεία λοιμώξεων από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στην πενικιλίνη και αμπικιλλίνη	45
10.3.2. Θεραπεία λοιμώξεων από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη	46
11. Πρόγνωση	47

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Α΄: Μοριακή επιδημιολογία αποικισμού και βακτηριαμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες

1. Εισαγωγή	49
2. Περιγραφή μεθόδου ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο	50
2.1. Περιοριστικές ενδονουκλεάσες	50
2.2. Ηλεκτροφόρηση σε Παλλόμενο Ηλεκτρικό πεδίο	53
2.3. Στάδια της μεθόδου	55
2.4. Μεταβλητές	56
2.5. Σύγκριση ηλεκτροφορητικών προτύπων και ερμηνεία των αποτελεσμάτων	56
3. Ασθενείς και μέθοδοι	59
3.1. Κανονισμός πρόληψης λοιμώξεων	59
3.2. Μέθοδοι καλλιέργειας για απομόνωση Εντερόκοκκου ανθεκτικού στη βανκομυκίνη	59
3.3. Ορισμοί	60
3.4. Μοριακή τυποποίηση	60
3.5. Πρωτόκολλο Ηλεκτροφόρησης σε Παλλόμενο Ηλεκτρικό Πεδίο	60
3.5.1. Προετοιμασία δειγμάτων	60
3.5.2. Προετοιμασία δίσκων αгарόζης και βακτηριδιακού DNA	60
3.5.3. Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση και ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο	61
3.5.4. Ανάλυση και ερμηνεία ηλεκτροφορητικών προτύπων	61
4. Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης	63
4.1. Σύγκριση στελεχών περιοριστικών καλλιιεργειών	64
4.2. Σύγκριση στελεχών που απομονώθηκαν από καλλιέργειες αίματος	65
4.3. Ζεύγη στελεχών αίματος και περιοριστικών καλλιιεργειών προερχόμενα από τον ίδιο ασθενή	67
4.4. Σύγκριση στελεχών από υποτροπιάζοντα επεισόδια βακτηριαμίας	68
4.5. Σύγκριση στελεχών καλλιιεργειών αίματος που απομονώθηκαν από το ίδιο επεισόδιο βακτηριαμίας	69
5. Συζήτηση	71

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Β΄: Παράγοντες κινδύνου για αποικισμό από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες

1. Εισαγωγή	76
2. Ασθενείς και Μέθοδοι	76
2.1. Κανονισμός πρόληψης λοιμώξεων	77
2.2. Εμπειρική αγωγή ουδετεροπενικού πυρετού	77
2.3. Μέθοδοι καλλιέργειας για απομόνωση Εντερόκοκκου ανθεκτικού στη βανκομυκίνη	77
2.4. Σχεδιασμός μελέτης «ασθενών-μαρτύρων»	78
2.5. Ανεξάρτητες μεταβλητές και ορισμοί	78
2.6. Στατιστική ανάλυση	79
3. Αποτελέσματα	81
4. Συζήτηση	84

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Γ΄: Η επίδραση της υποκατάστασης της κεφαζιδίμης από την πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη στην επίπτωση αποικισμού και βακτηριαμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες

1. Εισαγωγή	89
2. Ασθενείς και Μέθοδοι	90
2.1. Κανονισμός πρόληψης λοιμώξεων	90
2.2. Θεραπευτική παρέμβαση και χρονικοί περίοδοι της μελέτης	90
2.3. Ορισμοί	91
2.4. Επίπτωση αποικισμού και βακτηριαμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη και χρήσης αντιβιοτικών	91
2.5. Βακτηριαμία από <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Escherichia coli</i> και είδη <i>Streptococcus viridans</i>	92
2.6. Στατιστική ανάλυση	92
3. Αποτελέσματα	93
4. Συζήτηση	98
Σύνοψη συμπερασμάτων διδακτορικής διατριβής	102
Βιβλιογραφικές αναφορές	104
Ευρετήριο	117
Βιογραφικό σημείωμα	122
Βιβλιογραφική αναφορά που προέκυψε κατά τη διενέργεια της διδακτορικής διατριβής:	134
Almyroudis NG, Lesse AJ, Hahn T, Samonis G, Hazamy PA, Wongkittiroch K, Wang ES, McCarthy PL Jr, Wetzler M, Segal BH. Molecular epidemiology and risk factors for colonization by vancomycin-resistant Enterococcus in patients with hematologic malignancies. Infect Control Hosp Epidemiol. 2011 May;32(5):490-6.	

ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ι Π Π ◊ Κ Ρ Α Τ ◊ Υ Ξ ◊ Ρ Κ ◊ Ξ

◊ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΜΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΞΚΛΗΠΙ-
 ΟΝ, ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΜΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ
 ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕ-
 ΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΜ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ
 ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑ-
 ΦΗΝ ΤΗΝΔΕ, ΗΓΗΣΑΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΑ-
 ΜΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΕΙΝ
 ΕΜΟΙΣΙΝ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ
 ΧΡΗΣΙΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, ΚΑΙ
 ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΣ' ΕΝΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ
 ΕΠΙΚΡΙΝΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΧΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕ-
 ΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΣΙΖΕΙ ΜΑΜΘΑΝΕΙΝ,
 ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕ-
 ΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΝΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ
 ΑΠΑΞΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑ-
 ΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙΝ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ
 ΔΙΔΑΣΧΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜ-
 ΜΕΝΟΙΣ ΤΕ ΚΑΙ ΝΗΚΙΣΜΕΝΟΥΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙ-
 ΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΜΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΞΙ ΤΕ ΧΡΗ-
 ΖΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥ-
 ΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ. ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ
 ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΣΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑ-
 ΚΟΝ ΟΥΔΕΜΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΞΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ
 ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ. ΟΜΟΙ-
 ΝΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΞΕΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩ-
 ΞΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΞΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙ-
 ΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ
 ΤΕΜΕΝΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΦΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗ-
 ΞΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΞΙΜ ΑΜΑΡΑΣΙ ΠΡΗΣΙΟΣ ΤΗΣΔΕ.
 ΕΙΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΞΣΩ, ΞΞΕΛΕΥ-
 ΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ
 ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΞΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ
 ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΞΙΩΝ ΕΡΓΩΝ, ΕΠΙ
 ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΞΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΜΑΡΩΝΩΝ
 ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ
 ΘΕΡΑΠΕΙΗ, Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΞΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ
 ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΜΦΩΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ
 ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΚΑΛΕΞΕΘΑΙ ΞΣΩ, ΞΙΓΗΣΟΜΑΙ,
 ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ.
 ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ
 ΠΟΙΚΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΣΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑ-
 ΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΣΑΖΟΜΕΝΩ,
 ΠΑΡΑ ΠΑΣΙ ΑΜΦΩΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΞΙ ΧΡΟ-
 ΝΟΝ, ΠΑΡΑΒΑΙΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ
 ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**Του ιατρού Νικολάου Γ. Αλμυρούδη**

ΤΙΤΛΟΣ: Επιδημιολογία και παράγοντες κινδύνου για αποικισμό ασθενών από *Εντερόκοκκο* ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε ένα τριτοβάθμιο αντικαρκινικό κέντρο.

Παρέχεται από το τμήμα Λοιμωξιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Επιβλέπων:

Καθηγητής Κος Γεώργιος Σαμώνης

Τριμελής Επιτροπή:

Καθηγητής Κος Γ. Σαμώνης

Καθηγητής Κος Β. Γεωργούλιας

Καθηγητής Κος Α. Γκίκας

Μέλη Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Καθηγητής Κος Γ. Σαμώνης

Καθηγητής Κος Β. Γεωργούλιας

Καθηγητής Κος Α. Γκίκας

Καθηγητής Κος Δ. Μαυρουδής

Καθηγήτρια Κα Ε. Παπαδάκη

Αναπληρωτής Καθηγητής Κος Ε. Γανωτάκης

Επίκουρος Καθηγητής Κος Δ. Κοφτερίδης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ευκαιρία της ολοκλήρωσης της διδακτορικής μου διατριβής θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες και την εκτίμηση μου στον Καθηγητή Παθολογίας – Λοιμωξιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Γεώργιο Σαμώνη ο οποίος με καθοδήγησε σε όλα τα στάδια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής και συνέβαλε αποφασιστικά στην ολοκλήρωσή της. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής για τη συμβολή τους.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συνεργάτες μου στο Roswell Park Cancer Institute και ιδιαίτερα τον καθηγητή Dr. Brahm Segal, για την κριτική συμβολή του και επιστημονική συνεισφορά του. Ιδιαίτερα θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στο Dr. Alan Lesse, λοιμωξιολόγο και καθηγητή Παθολογίας στο Πολιτειακό Πανεπιστήμιο της Νέας Υόρκης στο Buffalo, στο εργαστήριο του οποίου ολοκλήρωσα τη γονοτυπική ανάλυση των στελεχών Εντερόκοκκων με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Dr. Theresa Hahn, για την πολύτιμη βοήθεια της στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη στους γονείς μου οι οποίοι με καθοδήγησαν και με στήριξαν σε όλα τα στάδια της εκπαίδευσής μου και επιστημονικής μου πορείας.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή και σκοπός της μελέτης: Ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες αντιπροσωπεύουν ομάδα υψηλού κινδύνου για αποικισμό και λοίμωξη από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη. Το πρώτο μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής περιλαμβάνει τη μελέτη της μοριακής επιδημιολογίας του αποικισμού και της βακτηριαιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες. Σκοπός της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της κλωνικότητας ή του σποραδικού χαρακτήρα της επιδημίας, στα πλαίσια μίας επιδημιολογικής διερεύνησης με στόχο την πρόληψη του αποικισμού και των λοιμώξεων από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη.

Το δεύτερο μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής περιλαμβάνει τη μελέτη προσδιορισμού παραγόντων κινδύνου για αποικισμό από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη, άλλων από την έκθεση στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Σκοπός της μελέτης ήταν η αναγνώριση δυνητικά τροποποιήσιμων παραγόντων κινδύνου για αποικισμό που θα μπορούσαν να μεταβληθούν προκειμένου να περιοριστεί η επιδημία.

Βάσει των αποτελεσμάτων της μελέτης ασθενών-μαρτύρων, η οποία κατέδειξε συσχέτιση μεταξύ της χορήγησης κεφαζιδίμης και του αποικισμού από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη πραγματοποιήθηκε μία μεταβολή στη στρατηγική της θεραπευτικής αντιμετώπισης του ουδετεροπενικού πυρετού με σκοπό τη μείωση της έκθεσης των ασθενών στην κεφαζιδίμη. Η θεραπευτική αυτή παρέμβαση συνίστατο στην υποκατάσταση της κεφαζιδίμης από την πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη ως αντιβιοτικό πρώτης επιλογής για τη θεραπεία του ουδετεροπενικού πυρετού. Σκοπός της παρέμβασης ήταν η μείωση της επίπτωσης του αποικισμού και της βακτηριαιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη.

Ασθενείς και μέθοδοι: Η γονοτυπική ανάλυση συμπεριέλαβε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες και λήπτες μεταμόσχευσης αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων που εισήχθησαν στη μονάδα αιματολογίας του Roswell Park Cancer Institute. Σύμφωνα με τον κανονισμό πρόληψης λοιμώξεων οι ασθενείς υποβάλλονταν σε εβδομαδιαία περιοριστική καλλιέργεια επιδημιολογικής επιτήρησης (surveillance) και αν ήταν αποικισμένοι, τοποθετούνταν σε απομόνωση επαφής. Μελετήθηκε η μοριακή επιδημιολογία σε δείγματα περιοριστικών καλλιιεργειών και αίματος που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια ενός έτους με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Για την πέψη του βακτηριακού χρωμοσώματος χρησιμοποιήθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση *SmaI*.

Για την αναγνώριση παραγόντων κινδύνου για αποικισμό πραγματοποιήθηκε μία αναδρομική μελέτη «ασθενών-μαρτύρων». Η μελέτη συμπεριέλαβε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες και λήπτες μεταμόσχευσης αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων που εισήχθησαν στο νοσοκομείο κατά τη διάρκεια μίας περιόδου τριών ετών. Αποικισμένοι ασθενείς ετίθεντο σε αυστηρή απομόνωση επαφής. Ως «ασθενείς» ορίστηκαν οι ασθενείς εκείνοι που αποικίσθηκαν από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους, ενώ «μάρτυρες» εκείνοι που παρέμειναν αρνητικοί για αποικισμό βάσει των περιοριστικών καλλιιεργειών. «Ασθενείς» και «μάρτυρες» εξομοιώθηκαν ατομικά με σταθερό ηλικιακό 1:2, με βάση την ηλικία, το φύλο, και τη μονάδα εισαγωγής. Όλες οι μεταβλητές μελετήθηκαν μέχρι το χρόνο αποικισμού για τους «ασθενείς» και για ίσο χρονικό διάστημα για τους «μάρτυρες».

Η μελέτη της επίδρασης της υποκατάστασης της κεφαζιδίμης από πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη στην επίπτωση του αποικισμού και της βακτηριαιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη, περιέλαβε όλους τους ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες και τους λήπτες μεταμόσχευσης αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων που εισήχθησαν στο νοσοκομείο για οποιοδήποτε λόγο. Όπως και στις δύο προηγούμενες μελέτες, οι ασθενείς υποβάλλονταν εβδομαδιαία σε καλλιέργεια επιτήρησης με επιχρίσματα ορθού και οι αποικισμένοι ασθενείς ετίθεντο σε αυστηρή απομόνωση επαφής. Στοιχεία στην επίπτωση αποικισμού και βακτηριαιμίας συλλέχθηκαν προοπτικά, ενώ στοιχεία σχετικά με τη χρήση αντιβιοτικών συλλέχθηκαν αναδρομικά. Η επίπτωση του αποικισμού και βακτηριαιμίας υπολογίστηκε ως αριθμός συμβάντων ανά 1.000 ημέρες νοσηλείας ασθενών κατά τη διάρκεια δύο χρονικών περιόδων, τριετούς διάρκειας η κάθε μία. Οι περίοδοι αυτές αντιστοιχούσαν στα χρονικά διαστήματα κατά τα οποία η κεφαζιδίμη και η πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη αποτελούσαν το αντιβιοτικό πρώτης επιλογής για τη θεραπεία ουδετεροπενικού πυρετού. Η χρήση αντιβιοτικών υπολογίστηκε συνολικά για ολόκληρο τον πληθυσμό, ως ημέρες υπό αντιβίωση ανά 1.000 ημέρες νοσηλείας ασθενών. Ο βαθμός συσχέτισης της επίπτωσης του αποικισμού και της βακτηριαιμίας με τη χρήση αντιβιοτικών, υπολογίστηκε με τον παραμετρικό συντελεστή συσχέτισης Pearson.

Αποτελέσματα: Από τη μοριακή επιδημιολογική μελέτη προέκυψε ότι τα στελέχη Εντερόκοκκων ανθεκτικών στη βανκομυκίνη που απομονώθηκαν από αποικισμένους ή βακτηριαιμικούς ασθενείς ήταν στην πλειονότητα τους γενετικά ανομοιογενή, με εξαίρεση μικρών κλώνων, εύρημα που αποδεικνύει τον πρωτίστως σποραδικό χαρακτήρα της επιδημίας.

Από τη μελέτη αναγνώρισης παραγόντων κινδύνου προέκυψε ότι ο αποικισμός επήλθε σε μία διάμεση τιμή 14 ημερών και οι αποικισμένοι ασθενείς χαρακτηρίζονταν από μεγαλύτερη

διάρκεια παραμονής στο νοσοκομείο. Προηγηθείσα έκθεση στην κεφταζιδίμη αναγνωρίστηκε ως παράγοντας κινδύνου για αποικισμό (p : <0.001). Χορήγηση βανκομυκίνης ενδοφλεβίως και αντιβιοτικών με αναερόβια δράση δεν αποτελούσαν παράγοντες κινδύνου. Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση με την παρουσία ουδετεροπενίας ή βλεννογονίτιδας, και η βαρύτητα της νόσου ήταν όμοια και στις δύο ομάδες.

Στην περίοδο κατά την οποία η πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη ήταν το αντιβιοτικό πρώτης επιλογής για τη θεραπεία του ουδετεροπενικού πυρετού, η επίπτωση αποικισμού από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη μειώθηκε από 6.04 σε 5.52 ανά 1.000 ημέρες νοσηλείας ασθενών αλλά όχι σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο (p : 0.65). Κατά την ίδια περίοδο, η επίπτωση βακτηριαιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη μειώθηκε από 3.97 σε 2.62 ανά 1.000 ημέρες νοσηλείας ασθενών (p : 0.004). Ο συντελεστής συσχέτισης Pearson κατέδειξε αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στη βακτηριαιμία από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη και τη χρήση πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης (p : 0.005), ενώ τάση προς θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε ανάμεσα στην επίπτωση βακτηριαιμίας και στη χρήση κεφταζιδίμης (p : 0.05). Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση ανάμεσα στην επίπτωση βακτηριαιμίας και τη συνολική χρήση αντιβιοτικών.

Συμπεράσματα: Με την εξαίρεση μικρών κλώνων, η επιδημία ήταν πρωτίστως σποραδική. Δεν αναγνωρίστηκε κοινή πηγή περιβαλλοντικής προέλευσης ή συγκεκριμένο πρότυπο μετάδοσης. Τον κίνδυνο για αποικισμό από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη προλέγει η έκθεση σε αντιβιοτικά και συγκεκριμένα η χορήγηση κεφταζιδίμης, και όχι χαρακτηριστικά του ξενιστή ή παραβιάσεις του κανονισμού πρόληψης και ελέγχου λοιμώξεων. Η θεραπευτική στρατηγική που περιλαμβάνει τη χρήση πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης ως αντιβιοτικό πρώτης επιλογής στη θεραπεία του ουδετεροπενικού πυρετού, μπορεί να μειώσει την επίπτωση της βακτηριαιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες.

ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ - SUMMARY IN ENGLISH

OBJECTIVE: Patients with hematologic malignancies are at high risk for colonization and infection by vancomycin resistant *Enterococcus* (VRE). We studied the molecular epidemiology of colonization and bacteremia by VRE in patients with hematologic malignancies. The purpose of the study was to determine the clonal or sporadic nature of the outbreak, as part of an investigation that aimed to define interventions to prevent colonization and infection by VRE.

In the second part of the thesis we performed a case-control study to identify risk factors for colonization by VRE, other than exposure to the hospital environment. The purpose of the study was to identify potentially modifiable risk factors for colonization that could be altered in order to contain the outbreak.

Based on the results of the case-control study that demonstrated an association between exposure to ceftazidime and colonization by VRE, the treatment strategy of neutropenic fever was modified to reduce patients' exposure to ceftazidime. The ceftazidime was substituted by piperacillin-tazobactam as the antibiotic of choice for the treatment of neutropenic fever. We studied the impact of this strategy on the incidence of colonization and bacteremia by VRE in patients with hematologic malignancies.

PATIENTS AND METHODS: The genotypic analysis included patients with hematologic malignancies and recipients of hematopoietic stem cell transplantation admitted at the hematology units at Roswell Park Cancer Institute. According to the infection prevention policies all patients with hematologic malignancies underwent weekly surveillance with perianal swabs for VRE and if colonized were placed in contact isolation. The molecular epidemiology was studied with pulsed field gel electrophoresis on samples from perirectal swabs and blood cultures collected over a period of one year. Digestion of the bacterial chromosome was performed with *Sma*I restriction enzyme.

Risk factors for colonization by VRE were identified through a retrospective "case-control" study. The study included patients with hematologic malignancies and recipients of hematopoietic stem cell transplantation admitted to the hospital during a period of three years. Colonized patients were placed in strict contact isolation. Cases included patients colonized by VRE and controls patients negative for VRE colonization. Cases and controls were matched individually by age, gender and admitting service in a 1:2 allocation. All variables were recorded from admission to the time of colonization for the cases and an equal time for controls.

The study on the impact of substitution of ceftazidime by piperacillin-tazobactam on the incidence of colonization and bacteremia by VRE included all patients with hematologic malignancies and recipients of hematopoietic stem cells transplantation admitted at the hospital for any reason. During the study periods, all inpatients were undergoing weekly surveillance cultures on rectal swabs and if positive they were placed in contact isolation. Data on the incidence of colonization and bacteremia were recorded prospectively while data on antibiotic utilization were collected retrospectively. The impact of colonization and bacteremia was calculated in number of events per 1,000 patient days of care during two periods, of three years duration each. These periods corresponded to the time when either ceftazidime or piperacillin-tazobactam was the antibiotic of choice for the treatment of neutropenic fever. The total antibiotic use was calculated for the entire population, as days on antibiotics per 1,000 patient days of care. Pearson correlation coefficient was used to correlate the incidence of colonization and bacteremia with the antibiotic use.

RESULTS: Molecular genotyping showed that with the exception of small clones the isolates of VRE from colonized or bacteremic patients were primarily genetically distinct. This finding demonstrates the principally sporadic nature of the outbreak.

The case-control study on risk factors for colonization showed that colonization occurred at a median of 14 days and was associated with longer hospital stay. Previous use of ceftazidime was associated with colonization ($p: <0.001$), while intravenous vancomycin and antibiotics with anaerobic activity did not emerge as risk factors. There was no association with neutropenia or presence of colonic mucosal disruption, and severity of illness was similar in both groups.

During the time period when piperacillin-tazobactam was used as initial therapy for the management of febrile neutropenia, the incidence of colonization by VRE decreased from 6.04 to 5.52 per 1,000 patient days of care but not at a statistically significant level ($p: 0.65$). During the same time period, the incidence of bacteremia due to VRE decreased from 3.97 to 2.62 episodes per 1,000 patient days of care ($p: 0.004$). The Pearson correlation coefficient demonstrated a negative association between bacteremia and piperacillin-tazobactam use ($p: 0.005$), and a trend towards a positive correlation between the incidence of bacteremia and ceftazidime use ($p: 0.05$). No correlation between the incidence of bacteremia and the overall use of antibiotics was identified.

CONCLUSION: Molecular studies showed that in the majority of colonized or bacteremic patients the strains were unique, arguing that VRE acquisition was sporadic rather than resulting from a common source of transmission. Exposure to antibiotics, namely ceftazidime,

predicts the risk for colonization by VRE and not host factors or breaches in the infection prevention practices. A therapeutic strategy that involves the use of piperacillin-tazobactam as initial therapy for the management of neutropenic fever may reduce the incidence of bacteremia due to VRE in patients with hematologic malignancies.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο Εντερόκοκκος είναι ένα σημαντικό νοσοκομειακό παθογόνο και η επίπτωσή του συνεχίζει να παρουσιάζει αυξητική τάση [1-3]. Η έλλειψη βακτηριοκτόνων αντιβιοτικών και η εγγενής αντοχή των Εντερόκοκκων σε μία ποικιλία αντιβιοτικών πρώτης επιλογής περιορίζει σημαντικά τις θεραπευτικές επιλογές [1]. Η ιδιαίτερη ικανότητα των Εντερόκοκκων να αναπτύσσουν αντοχή στα ενδεικνυόμενα αντιβιοτικά συνιστούν ένα ιδιαίτερο θεραπευτικό πρόβλημα. Λοιμώξεις από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη χαρακτηρίζονται από σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα [4-8]. Ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες αντιπροσωπεύουν ομάδες υψηλού κινδύνου για αποικισμό και λοίμωξη από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη [9].

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Roswell Park Cancer Institute, ένα εξειδικευμένο αντικαρκινικό νοσηλευτικό ίδρυμα τριτογενούς περίθαλψης στο Buffalo της πολιτείας της Νέας Υόρκης σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες. Στο συγκεκριμένο νοσοκομείο, αποικισμός και λοίμωξη από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη αποτελούσε ένα ιδιαίτερο πρόβλημα μεταξύ ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες. Ωστόσο, η επίπτωση αυτή ήταν αντίστοιχη με αυτήν που αναφέρεται στη βιβλιογραφία αλλά και σε άλλα εξειδικευμένα αντικαρκινικά κέντρα των ΗΠΑ [9].

Σε μία προσπάθεια να περιοριστεί η επιδημία, η επιτροπή πρόληψης λοιμώξεων έλαβε μία σειρά από μέτρα. Όλοι οι ασθενείς που εισάγονταν στα αιματολογικά τμήματα υποβάλλονταν σε εβδομαδιαία καλλιέργεια επιχρισμάτων ορθού για την έγκαιρη αναγνώριση αποικισμένων ασθενών, οι οποίοι και ετίθεντο σε απομόνωση επαφής. Η πρακτική αυτή είναι σύμφωνη με τις οδηγίες της Εταιρείας Νοσοκομειακής Επιδημιολογίας της Αμερικής (Society of Hospital Epidemiology of America, SHEA) [10]. Άλλες παρεμβάσεις στην ίδια κατεύθυνση περιελάμβαναν την τοποθέτηση διανομένων απολυμαντικού χεριών στους θαλάμους ασθενών, καθώς και πρόγραμμα επιτήρησης ορθολογικής χρήσης αντιβιοτικών (antibiotic stewardship) και ιδιαίτερα της χρήσης βανκομυκίνης. Τα μέτρα αυτά ήταν αναποτελεσματικά και απέτυχαν να περιορίσουν την εξάπλωση ανθεκτικών στελεχών.

Ακολούθησε μελέτη της μοριακής επιδημιολογίας με σκοπό τον προσδιορισμό της κλωνικότητας ή της σποραδικής φύσης της επιδημίας, την πιθανή αναγνώριση μίας κοινής πηγής προέλευσης ανθεκτικών στελεχών, είτε μοντέλων μετάδοσης. Η γονοτυπική ανάλυση των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη Εντεροκοκκικών στελεχών πραγματοποιήθηκε στο ερευνητικό

εργαστήριο του Veterans Affairs Medical Center του Buffalo. Η μελέτη αυτή παρατίθεται στο πρώτο μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι *Εντερόκοκκοι* είναι μέλη της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας του γαστρεντερικού σωλήνα του ανθρώπου και αποτελούν συχνά αίτια ουρολοιμώξεων, βακτηριαιμίας και ενδοκαρδίτιδας [1]. Λιγότερο συχνά απομονώνονται σε πολυμικροβιακές λοιμώξεις ενδοκοιλιακών και ενδοπυελικών οργάνων, σε λοιμώξεις των χοληφόρων και χειρουργικών τραυμάτων ενώ σπάνια προκαλούν λοιμώξεις όπως οστεομυελίτιδα, αρθρίτιδα ή μηνιγγίτιδα.

Ως μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου αποτελούν αίτια λοιμώξεων κοινότητας. Ωστόσο, λόγω των ιδιαίτερων παθογονικών και επιδημιολογικών τους χαρακτηριστικών προσβάλλουν συχνότερα ασθενείς που έχουν εισαχθεί στο νοσοκομείο όπου και συνιστούν ένα ιδιαίτερα σημαντικό πρόβλημα. Στις ΗΠΑ αντιπροσωπεύουν το τρίτο συχνότερο αίτιο βακτηριαιμίας που οφείλεται σε λοίμωξη κεντρικών φλεβικών καθετήρων, το δεύτερο σε συχνότητα αιτιολογικό παράγοντα ουρολοιμώξεων, και το τρίτο πιο συχνό αίτιο νοσοκομειακών λοιμώξεων συνολικά [3].

Αν και οι *Εντερόκοκκοι* χαρακτηρίζονται από μέτρια παθογονικότητα, οι *Εντεροκοκκικές* λοιμώξεις χαρακτηρίζονται από σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα [4, 5, 7, 8, 11]. Η επιλογή αποτελεσματικής αντιβιοτικής θεραπείας περιορίζεται σημαντικά από την ενδογενή τους αντοχή σε ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών όπως τις κεφαλοσπορίνες, τις σουλφοναμίδες, την κλινδαμυκίνη, και σε χαμηλές συγκεντρώσεις αμινογλυκοσιδών [1], αλλά και την εξαιρετική τους ικανότητα να αναπτύσσουν επίκτητη αντοχή στα αντιβιοτικά πρώτης γραμμής. Τέλος ιδιαίτερα ανησυχητική είναι η απομόνωση χρυσίζοντα *Σταφυλόκοκκου* ανθεκτικού στη βανκομυκίνη (*Vancomycin resistant Staphylococcus aureus*, VRSA) προϊόν μεταβίβασης γενετικών χαρακτηριστικών που προσδίδουν αντοχή στη βανκομυκίνη από *Εντεροκοκκικά* στελέχη [12-14]. Όλα τα παραπάνω καθιστούν επιτακτική την ανάγκη ελέγχου της εξάπλωσης του ανθεκτικού στη βανκομυκίνη *Εντερόκοκκου*.

2. ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΟΡΟΣΗΜΑ

Ο όρος *entérocoque* αναφέρεται για πρώτη φορά στη Γαλλική βιβλιογραφία το έτος 1899 όπου περιγράφεται ένα βακτηρίδιο με τη μορφή «διπλοκόκκου» το οποίο απομονώθηκε από το γαστρεντερικό σωλήνα [15]. Το όνομα προτάθηκε για να τονιστεί η εντερική προέλευση του

Εντερόκοκκου. Το ίδιο έτος δημοσιεύεται το πρώτο κλινικό περιστατικό ενδοκαρδίτιδας από Εντερόκοκκο όπου «Gram θετικοί κόκκοι σε ζεύγη και βραχείες αλυσίδες» απομονώθηκαν κατά τη νεκροψία ασθενή σε καλλιέργειες αίματος και άλλους ιστούς [16]. Στη συνέχεια το 1906 σε μία μελέτη της παθογονικότητας των Στρεπτόκοκκων, χρησιμοποιείται για πρώτη φορά ο όρος «*Streptococcus faecalis*» (Στρεπτόκοκκος των κοπράνων) για να περιγράψει τα είδη εκείνα που απαρτίζουν τη φυσιολογική χλωρίδα του εντέρου [17], ενώ το 1919 περιγράφονται τα είδη *Streptococcus faecium* και *Streptococcus glycerinaceus* [18]. Ωστόσο, για μία μεγάλη χρονική περίοδο ο όρος *Streptococcus faecalis* κυριαρχεί στη βιβλιογραφία και χρησιμοποιείται αδιάκριτα για να περιγράψει όλα τα είδη Εντερόκοκκων. Το 1937, ο James Sherman, βάσει των ιδιαίτερων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των Εντερόκοκκων και συγκεκριμένα της ιδιότητάς τους να αναπτύσσονται σε περιβάλλον 6.5% NaCl και pH 9.6, πρότεινε το διαχωρισμό των Εντερόκοκκων από τους λοιπούς Στρεπτόκοκκους [19]. Παρά το γεγονός αυτό οι Εντερόκοκκοι συνεχίζουν να κατατάσσονται ταξινομικά υπό το γένος *Streptococcus*. Το 1970 προτάθηκε επίσημα τα Εντεροκοκκικά είδη να διαχωριστούν από τους λοιπούς Στρεπτόκοκκους και να αποτελέσουν ξεχωριστό γένος [20]. Το 1984 με τη μέθοδο του DNA-DNA και DNA-rDNA υβριδισμού, τεκμηριώθηκαν τα ιδιαίτερα γενετικά χαρακτηριστικά των Εντερόκοκκων και τα είδη *Streptococcus faecalis* και *Streptococcus faecium* διαχωρίστηκαν από τους λοιπούς Στρεπτόκοκκους και ταξινομήθηκαν πλέον υπό το γένος *Enterococcus* [21].

Υψηλού βαθμού αντοχή στη γενταμικίνη περιγράφηκε αρχικά το 1983 [22]. Η πρώτη αναφορά σε κλινικά περιστατικά από *Εντερόκοκκο* ανθεκτικό στα γλυκοπεπτιδία (βανκομικίνη και τεϊκοπλανίνη) δημοσιεύθηκε το 1988 από τους Uttley et al. οι οποίοι περιγράψανε μία επιδημία από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομικίνη σε μία νεφρολογική μονάδα [23]. Περίπου την ίδια χρονική περίοδο, οι Leclercq et al. περιέγραψαν ανθεκτικά στελέχη Εντερόκοκκου που απομονώθηκαν σε κόπρανα ασθενών με λευχαιμία [24]. Και οι δύο δημοσιεύσεις αναφέρονταν σε στελέχη που απομονώθηκαν το 1986 και προέρχονταν από νοσοκομεία της Βρετανίας και Γαλλίας αντίστοιχα. Σύντομα, αντοχή στη βανκομικίνη περιγράφηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (ΗΠΑ) σε στελέχη *E. faecalis* [25].

Έκτοτε, η χρήση βανκομικίνης και τεϊκοπλανίνης αυξήθηκε κατακόρυφα [26] εν μέρει λόγω της ευρείας χρήσης κεντρικών φλεβικών καθετήρων σε συνδυασμό με την αυξανόμενη επίπτωση *Σταφυλόκοκκου* ανθεκτικού στη μεθικιλίνη. Επιπρόσθετα, η από του στόματος χορήγηση βανκομικίνης για τη θεραπεία κολίτιδας από *Clostridium difficile*, μία ευρύτατα διαδεδομένη πρακτική, συνέβαλε σημαντικά στην εξάπλωση ανθεκτικών στελεχών [27, 28]. Τέλος, η χορήγηση γλυκοπεπτιδίων όπως η avoparcin στη βιομηχανία τροφίμων σε ζώα

προοριζόμενα για διατροφή (food animals), μία διαδεδομένη πρακτική στην Ευρώπη, συνέβαλε στη διάδοση του ανθεκτικού στη βανκομυκίνη Εντερόκοκκου μέσω της τροφικής αλυσίδας στον ευρύτερο Ευρωπαϊκό πληθυσμό [29]. Η επίπτωση των λοιμώξεων από *Εντερόκοκκο* ανθεκτικό στη βανκομυκίνη συνεχίζει να παρουσιάζει αυξητική τάση.

3. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΙΔΙΑΙΤΕΡΑ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Βασικά ταξινομικά χαρακτηριστικά του γένους *Enterococcus* είναι η θετική αντίδραση εσουλίνης παρουσία χολής, η αντίδραση με αντιορό ομάδας D, και η ικανότητα τους να αναπτύσσονται παρουσία 6,5% χλωριούχου νατρίου. Το γένος *Enterococcus* περιλαμβάνει τουλάχιστον 18 είδη (Πίνακας 1), ενώ διαρκώς αναγνωρίζονται νέα. Ο *Enterococcus faecalis* είναι το πιο συχνό αίτιο λοίμωξης από είδη Εντερόκοκκων. Τα είδη *Enterococcus faecium* προκαλούν ένα σημαντικό ποσοστό λοιμώξεων, ιδιαίτερα σε ασθενείς νοσηλευόμενους στο νοσοκομείο.

Πίνακας 1. Είδη Εντεροκόκκων.

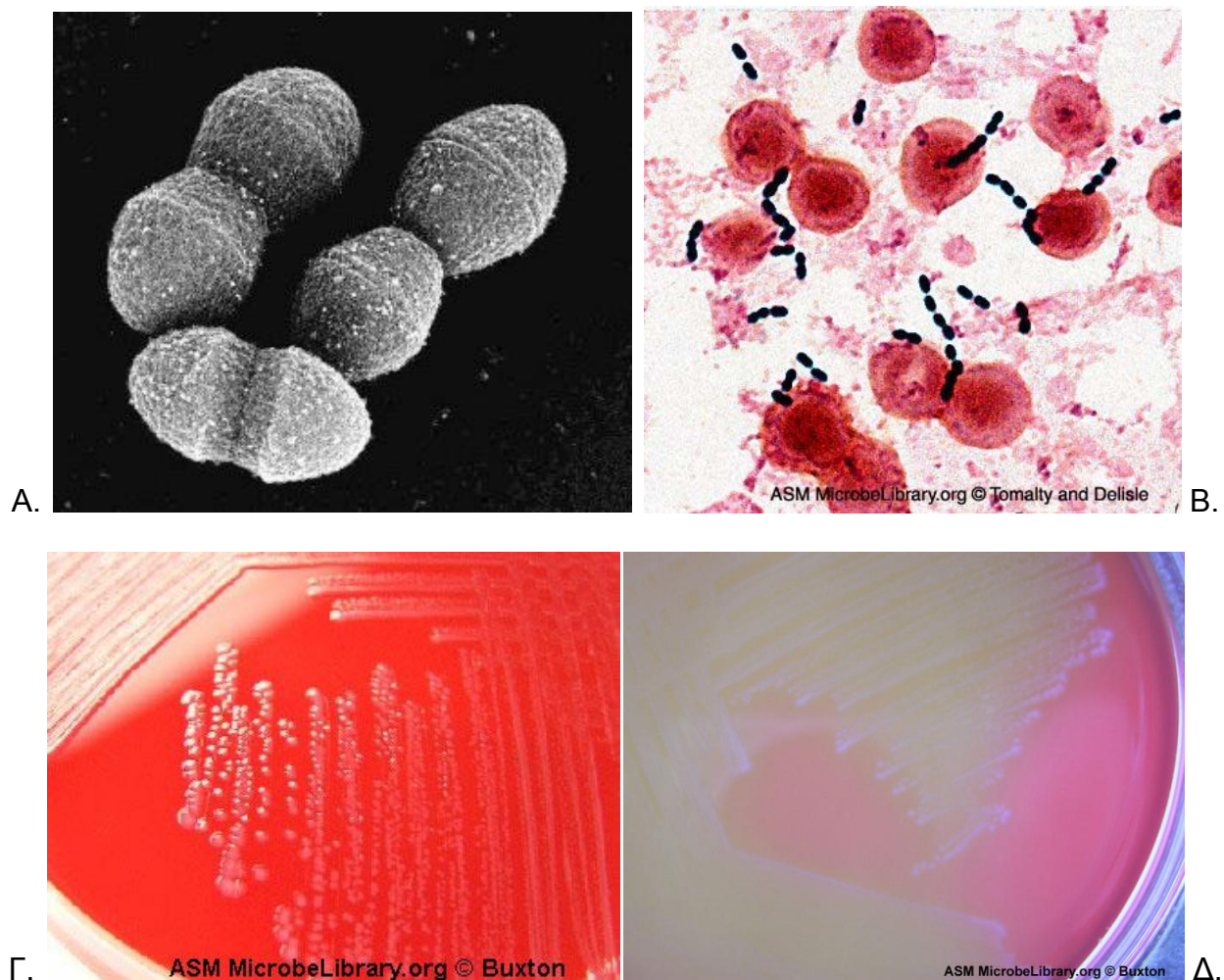
Είδη Εντεροκόκκων	
<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus/flavescens</i>
<i>E. durans</i>	<i>E. avium</i>
<i>E. mundtii</i>	<i>E. raffinosus</i>
<i>E. malodoratus</i>	<i>E. pseudoavium</i>
<i>E. hirae</i>	<i>E. pallens</i>
<i>E. cecorum</i>	<i>E. gilvus</i>
<i>E. sanguinicola</i>	<i>E. italicus</i>
<i>E. bovis</i>	<i>E. dispar</i>

Οι Εντερόκοκκοι είναι βακτηρίδια σφαιρικού-ωοειδούς σχήματος (κόκκοι), θετικοί κατά Gram, μονήρεις ή κατά ζεύγη, είτε σχηματίζουν χαρακτηριστική διάταξη υπό μορφή αλυσίδας (Εικόνα 1) [1]. Οι Εντερόκοκκοι είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί και μπορούν να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν σε σχετικά ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Τυπικά αναπτύσσονται παρουσία 6,5% NaCl σε pH 9.6 και σε θερμοκρασία που κυμαίνεται μεταξύ 10°C και 45°C, ενώ πολλά στελέχη επιβιώνουν σε 60°C για 30' λεπτά [19]. Επίσης αναπτύσσονται παρουσία 40% χολικών αλάτων και παράγουν λευκίνη αμινοπεπτιδάση.

Υδρολύουν την εσκουλίνη παρουσία χολής, ενώ δίνουν θετική τη δοκιμή L-πυρρολιδονυλ-β-παρθηθιλαμίδης (PYR, παραγωγή πυρρολινοδάσης), ιδιότητα που τους διαφοροποιεί από τους Στρεπτόκοκκους.

Σε αιματούχο άγαρ (5% sheep blood agar) ή trypticase soy άγαρ, τα στελέχη *Enterococcus faecalis* δεν προκαλούν αιμόλυση (γ-αιμόλυση), ενώ τα στελέχη *Enterococcus faecium* διαθέτουν αιμολυσίνες και προκαλούν ατελή αιμόλυση (α-αιμόλυση) (Εικόνα 1). Με βάση την κατά Lancefield ταξινόμηση οι Εντερόκοκκοι κατατάσσονται στην ομάδα D, ενώ κάποια είδη αντιδρούν με αντιγόνο ομάδας Q.

Εικόνα 1. Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά Εντεροκόκκων.



Εικόνα 1. Α. Ηλεκτρονική μικροφωτογραφία Εντεροκόκκων (www.usf.edu). Β. Gram χρώση *Enterococcus faecalis*. Γ. Αποικίες *Enterococcus faecalis* μετά από 24 ώρες επώασης. Δ. Πρόκληση α-αιμόλυσης από είδη *Enterococcus faecalis* μετά από 48 ώρες επώασης.

4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο γαστρεντερικός σωλήνας και συγκεκριμένα το κόλον αποτελεί την κύρια δεξαμενή (reservoir) αποικισμού του Εντερόκοκκου σε ανθρώπους και ζώα. Λιγότερο συχνά Εντερόκοκκοι απομονώνονται από την κολπική [30] ή στοματική κοιλότητα [31] του ανθρώπου. Είδη *Εντερόκοκκου faecalis* απαρτίζουν την πλειοψηφία των Εντεροκοκκικών στελεχών στα κόπρανα [32, 33] υγιών ατόμων και υπερτερούν σημαντικά έναντι του είδους *faecium*.

Είδη Εντερόκοκκων αποτελούν το τρίτο συχνότερο αίτιο βακτηριαμίας στις ΗΠΑ με συχνότητα 11% μετά τους αρνητικούς κατά κουαγκουλάση Σταφυλόκοκκους (συχνότητα 31%) και το χρυσίζοντα Σταφυλόκοκκο (συχνότητα 20%) [34, 35]. Σύμφωνα με τα δεδομένα του Εθνικού Δικτύου Ασφάλειας της Υγείας των ΗΠΑ (National Healthcare Safety Network, NHSN) [3] μεταξύ νοσοκομειακών λοιμώξεων, είδη Εντερόκοκκων αντιπροσωπεύουν το τρίτο πιο συχνό αιτιολογικό παράγοντα βακτηριαμίας οφειλόμενο σε λοίμωξη κεντρικών φλεβικών καθετήρων, το δεύτερο πιο συχνό αιτιολογικό παράγοντα ουρολοιμώξεων, το τρίτο πιο συχνό αίτιο χειρουργικών λοιμώξεων και το τρίτο πιο συχνό αίτιο νοσοκομειακών λοιμώξεων συνολικά.

4.1. Επιδημιολογία του ανθεκτικού στη βανκομυκίνη *Enterococcus faecium*

Αντίστοιχα με τα ευαίσθητα στην αμπικιλίνη ή βανκομυκίνη στελέχη, η κύρια δεξαμενή αποικισμού (reservoir) για τα ανθεκτικά στελέχη είναι ο γαστρεντερικός σωλήνας. Αντοχή στη βανκομυκίνη είναι σημαντικά πιο συχνή σε στελέχη *E. faecium* [36-39]. Σε μια πολυκεντρική μελέτη στις ΗΠΑ (SCOPE project) και σε μια περίοδο 7 ετών (1995-2002), αντοχή στη βανκομυκίνη καταγράφηκε σε 60% των *E. faecium* έναντι 2% των *E. faecalis* στελεχών που απομονώθηκαν από καλλιέργειες αίματος [35]. Ενώ τα είδη *E. faecalis* ιστορικά αποτελούσαν το πιο συχνό αίτιο νόσου, η αύξηση των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη στελεχών συνοδεύτηκε από αύξηση της συχνότητας των ειδών *faecium* έναντι των ειδών *faecalis* [39].

Σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία του Εθνικού Δικτύου Ασφάλειας της Υγείας των ΗΠΑ (National Healthcare Safety Network, NHSN) μεταξύ νοσοκομειακών λοιμώξεων, 80% στελεχών *E. faecium* ήταν ανθεκτικά στη βανκομυκίνη και 90,4% στην αμπικιλίνη, ενώ τα ποσοστά αντοχής για είδη *E. faecalis* ήταν 6,9% και 3,8% αντίστοιχα [3]. Στην ίδια μελέτη, μεταξύ στελεχών *E. faecium* που απομονώθηκαν σε περιστατικά βακτηριαμίας 78,9% ήταν ανθεκτικά στη βανκομυκίνη και 90,5% στην αμπικιλίνη, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για είδη *E. faecalis* ήταν 7,5% και 4,2%. Τέλος, η συχνότητα απομόνωσης ανθεκτικών εντεροκοκκικών στελεχών

[40] καθώς και η συχνότητα εισαγωγών στο νοσοκομείο με λοιμώξεις από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη [41] στις ΗΠΑ παρουσιάζουν αυξητική τάση.

Στην Ευρώπη σύμφωνα με την αναφορά του προγράμματος Επιτήρησης Αντιμικροβιακής Αντοχής για το 2009 (Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009 - ECDC) [42] αντοχή μεταξύ στελεχών *E. faecium* και *E. faecalis* σε υψηλή συγκέντρωση αμινογλυκοσιδών και βανκομυκίνη αντίστοιχα ποίκιλλαν ευρύτατα από χώρα σε χώρα. Συγκεκριμένα, η συχνότητα *E. faecalis* ανθεκτικού σε υψηλές συγκεντρώσεις αμινογλυκοσιδών ανερχόταν σε 35.7%, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά στην Ελλάδα, Κύπρο και Ουγγαρία ήταν πάνω από 50%. Συχνότητα αντοχής στη βανκομυκίνη μεταξύ στελεχών *E. faecium* ανερχόταν σε 9.1%, ενώ στην Ελλάδα, στο Λουξεμβούργο και στην Ιρλανδία τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν πάνω από 25% [42].

Ομάδες ασθενών υψηλού κινδύνου για αποικισμό και λοίμωξη από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη αντιπροσωπεύουν ασθενείς νοσηλεύομενους σε εντατικές μονάδες [40, 43], ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και ασθενείς σε αιμοδιάλυση [43, 44], ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες, λήπτες μεταμόσχευσης αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων [45], και λήπτες μεταμόσχευσης συμπαγών οργάνων [40], κυρίως ήπατος [46] και νεφρών [47].

4.2. Μοριακή επιδημιολογία του ανθεκτικού στη βανκομυκίνη *Enterococcus faecium*

Πριν την ταχεία εξάπλωση του ανθεκτικού στη βανκομυκίνη Εντερόκοκκου στις Ηνωμένες Πολιτείες προηγήθηκε η διάδοση ειδών *E. faecium* ανθεκτικών στην αμπικιλίνη. Μία πρόσφατη μοριακή επιδημιολογική μελέτη κατέδειξε ότι η εξάπλωση ανθεκτικών στελεχών οφείλεται στην επικράτηση του υποπληθυσμού CC17 [48]. Η μελέτη περιελάμβανε 411 στελέχη Εντερόκοκκων προερχόμενα από όλη την υφήλιο τα οποία μελετήθηκαν με τη μέθοδο της αλληλουχίας πολυγενετικού τύπου (Multilocus Sequence Typing, MLST) [49]. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρύτατα στη μελέτη του *E. faecium* και βασίζεται στην ανάλυση της αλληλουχίας του DNA 7 διαχειριστικών γονιδίων (housekeeping genes) [49]. Η μελέτη απέδειξε ότι τα στελέχη του υποπληθυσμού CC17 προέρχονται από το προγονικό στέλεχος *E. faecium* ST17 (sequence type 17) το οποίο προσαρμόστηκε σταδιακά στο νοσοκομειακό περιβάλλον μέσω μίας αθροιστικής εξελικτικής διαδικασίας που περιλαμβάνει την απόκτηση γονιδίων αντοχής στα αντιβιοτικά και γονιδίων προσαρμογής στο περιβάλλον. Συγκεκριμένα πρώτα εφοδιάστηκε με γονίδια που προσδίδουν φαινότυπο αντοχής στην αμπικιλίνη και ακολούθως με γονίδια παθογονικότητας, όπως τη φερόμενη ως νησίδα παθογονικότητας που περιλαμβάνει το γονίδιο *esp* [50], καθώς και τον υποψήφιο παράγοντα παθογονικότητας *hyl_{Efm}*. Ακολούθησε η απόκτηση συμπλέγματος γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στη βανκομυκίνη (VanA).

5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ

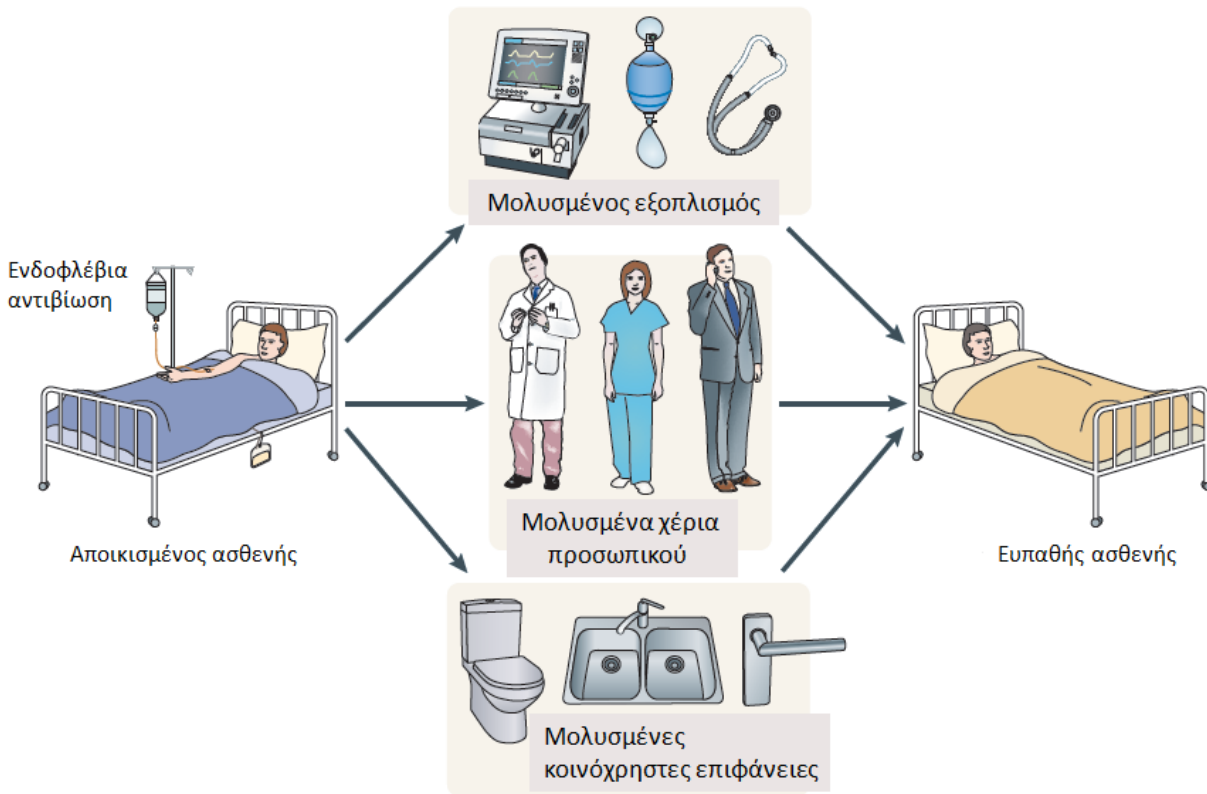
Οι Εντερόκοκκοι είναι μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου και κατά συνέπεια εκτός από νοσοκομειακές λοιμώξεις προκαλούν και λοιμώξεις κοινότητας. Ωστόσο, στην πράξη η πλειοψηφία των Εντεροκοκκικών λοιμώξεων είναι νοσοκομειακής προέλευσης. Είδη *E. faecium* και *E. faecalis* είναι τα πιο παθογονικά και προκαλούν την πλειοψηφία των λοιμώξεων [35]. Πολύ σπανιότερα, λοιμώξεις προκαλούνται από είδη *E. gallinarum* [51].

5.1. Μετάδοση και αποικισμός από στελέχη Εντερόκοκκου ανθεκτικού στη βανκομυκίνη

Αποικισμός ενός οργανισμού από ένα νέο μικροβιακό στέλεχος περιλαμβάνει έκθεση στο περιβάλλον όπου το μικρόβιο ενδημεί και μετάδοση στον οργανισμό, αριθμητική αύξηση του πληθυσμού (επέκταση) στο νέο μικροπεριβάλλον και κυριαρχία έναντι άλλων μικροβίων στην εντερική χλωρίδα.

Ανθεκτικά Εντεροκοκκικά στελέχη ενδημούν στο νοσοκομειακό περιβάλλον και σε χώρους παροχής ιατρικής περίθαλψης, οι οποίοι και αντιπροσωπεύουν την κύρια πηγή μετάδοσης σε ασθενείς (Εικόνα 2). Μία πρόσφατη προοπτική μελέτη σε ασθενείς μονάδας εντατικής θεραπείας κατέδειξε ότι προηγούμενη περιβαλλοντική μόλυνση των θαλάμων σχετίζεται με αποικισμό των ασθενών που εισάγονται στο θάλαμο αυτό τις επόμενες δύο εβδομάδες [52]. Εξάπλωση εντεροκοκκικών στελεχών από ασθενή σε ασθενή [53] αλλά και μεταξύ νοσοκομείων [54, 55] είναι καλά τεκμηριωμένη. Είδη Εντεροκόκκων *faecalis* και *faecium* μπορούν να επιβιώσουν σε επιφάνειες για 5 και 7 ημέρες αντίστοιχα, σε κρεβάτια ασθενών για 24 ώρες καθώς και για 30 λεπτά στην επιφάνεια στηθοσκοπίων [56]. Πολλά στελέχη είναι ανθεκτικά στη θερμότητα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις απολυμαντικών που περιέχουν χλωρίνη ή αλκοόλη [57, 58]. Εντερόκοκκος ανθεκτικός στη βανκομυκίνη έχει επίσης απομονωθεί από τα χέρια [59], τα γάντια (Εικόνα 3) και τις ρόμπες [60] του ιατρικού και νοσηλευτικού προσωπικού που έχουν έρθει σε επαφή με ασθενείς. Μετάδοση μέσω των χεριών του ιατρικού και νοσηλευτικού προσωπικού αντιπροσωπεύει τον επικρατέστερο τρόπο μετάδοσης από ασθενή σε ασθενή (Εικόνα 2) [59]. Συχνό πλύσιμο των χεριών με σαπούνι είτε με αλκοολούχα διαλύματα μειώνει σημαντικά τη μικροβιακή φορτία [56, 61].

Εικόνα 2. Κύριες οδοί μετάδοσης ανθεκτικών Εντεροκοκκικών στελεχών μεταξύ ασθενών.



(από *Arias C.A. et al., Nat Rev Microbiol* [62])

Εικόνα 3. Καλλιέργεια αποτυπώματος γαντιού που χρησιμοποιήθηκε στην εξέταση ασθενούς αποικισμένου με Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη [63].



Εναλλακτικά, Εντερόκοκκος ανθεκτικός στη βανκομυκίνη μπορεί να μεταδοθεί στους ανθρώπους μέσω της τροφικής αλυσίδας. Αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ευρέως για τη γρήγορη πάχυνση των ζώων που προορίζονται για ανθρώπινη διατροφή προκειμένου να ελαττώσουν το μικροβιακό φορτίο της εντερικής τους χλωρίδας το οποίο καταναλώνει ένα μεγάλο μέρος των διατροφικών ουσιών που τους χορηγούνται. Στην Ευρώπη, η αβοπαρσίνη (avoparcin), ένα γλυκοπεπτιδίο δομικά ανάλογο της βανκομυκίνης, ενοχοποιήθηκε για την προαγωγή ανθεκτικών Εντεροκοκκικών στελεχών και τη συνακόλουθη μετάδοσή τους στους ανθρώπους. Η συσχέτιση αυτή τεκμηριώθηκε με μελέτες στη Νορβηγία, Ολλανδία και Δανία [64, 65], και είχε σαν αποτέλεσμα την απαγόρευση της χρήσης αβοπαρσίνης στα διατροφικά ζώα από την Ευρωπαϊκή Ένωση το 1997 [66]. Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής η αβοπαρσίνη δεν έχει χρησιμοποιηθεί σε ζώα προοριζόμενα για ανθρώπινη διατροφή, και δεν έχει τεκμηριωθεί μετάδοση ανθεκτικών στελεχών μέσω της τροφικής αλυσίδας. Αντίθετα στις ΗΠΑ χρησιμοποιείται η virginiamycin, μία στρεπτογραμίνη (streptogramin) που παρουσιάζει διασταυρούμενη αντοχή με την κινोπριστίνη-δαλφοπριστίνη (quinupristin-dalfopristin, Synercid®) [67]. Ωστόσο, η επίπτωση ανθεκτικών στην κινοπριστίνη-δαλφοπριστίνη στελεχών *E. faecium* σε ανθρώπινα κόπρανα ήταν πολύ χαμηλή (0.9%) [68].

Τη μετάδοση ακολουθεί επέκταση στην εντερική χλωρίδα όπου τα ανθεκτικά στελέχη κυριαρχούν έναντι άλλων βακτηριδίων και επιτυγχάνουν υψηλές συγκεντρώσεις. Πρακτικά, ο όρος «αποικισμός» αναφέρεται σε συγκεντρώσεις βακτηριδίων ανιχνεύσιμες από τις μεθόδους προσυμπτωματικού ελέγχου, όπως οι περιοριστικές καλλιέργειες, οι καλλιέργειες κοπράνων, είτε η ανίχνευση με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που είναι πολύ πιο ευαίσθητη μέθοδος.

5.2. Ο ρόλος των αντιβιοτικών στην εξάπλωση και κυριαρχία στην εντερική χλωρίδα

Η εντερική χλωρίδα περιλαμβάνει κατά προσέγγιση 10^{12} CFU (colony forming units) βακτηριδίων ανά γραμμάριο κοπράνων [69, 70]. Η φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα συνιστά ένα λειτουργικό φραγμό ενάντια στον αποικισμό του εντέρου από παθογόνα μικρόβια εξωγενούς ή ενδογενούς προέλευσης, είτε εμποδίζοντας την πρόσβασή τους σε θέσεις πρόσφυσης στο βλεννογόνο, είτε εξαντλώντας τις αναγκαίες θρεπτικές ουσίες, είτε με την παραγωγή ανασταλτικών ουσιών και αναερόβιων συνθηκών [71]. Τα υποχρεωτικά αναερόβια είναι αριθμητικά τα επικρατέστερα βακτηρίδια και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της οικολογικής ισορροπίας της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας [69, 72]. Τα αντιβιοτικά διαταράσσουν την ισορροπία αυτή προς όφελος των Εντερόκοκκων και άλλων μικροβίων. Η

δράση των αντιβιοτικών στη μικροβιακή χλωρίδα εξαρτάται από το ρυθμό απέκκρισής τους στο γαστρεντερικό σωλήνα και το ρυθμό αδρανοποίησής τους [71].

Αντιβιοτικά με ισχυρή αναερόβιο δράση προκαλούν σημαντική διαταραχή στην εντερική χλωρίδα. Σε πειραματικά μοντέλα ποντικών αποικισθέντων από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη η υποδόρια χορήγηση αντιβιοτικών με ισχυρή αναερόβιο δράση προάγει τον αποικισμό από ανθεκτικά στελέχη, ενώ αντιβιοτικά χωρίς αναερόβιο δράση έχουν ελάχιστη ή και καθόλου επίδραση στην πυκνότητα των ανθεκτικών στελεχών [73]. Μία κλινική μελέτη σε 51 ασθενείς αποικισθέντες με Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη έδειξε αύξηση της συγκέντρωσης ανθεκτικών στελεχών στα κόπρανα μετά από χορήγηση αντιβιοτικών με ισχυρή αναερόβιο δράση [72]. Τέλος αρκετές μελέτες συσχέτισαν αντιβιοτικά με αναερόβιο δράση ως παράγοντα κινδύνου για αποικισμό και λοίμωξη από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη [27, 74-77], όπως τη μετρονιδαζόλη. Οι μελέτες αυτές υποδεικνύουν τον κεντρικό ρόλο της αναερόβιας χλωρίδας στη διατήρηση της ισορροπίας της εντερικής χλωρίδας.

Άλλα αντιβιοτικά έχουν επίσης ενοχοποιηθεί ως παράγοντες κινδύνου για αποικισμό ή λοίμωξη από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη όπως οι κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς [75, 78, 79], αμινογλυκοσίδες [78], σιπροφλοξασίνη [74], και η από του στόματος χορήγηση βανκομυκίνης [27, 28, 78]. Μελέτες σχετικά με την ενδοφλέβια χορήγηση βανκομυκίνης δείχνουν με κάποιες μελέτες να αποδεικνύουν [74] και άλλες να απορρίπτουν συσχέτιση [28, 80] προηγηθείσας ενδοφλέβιας χορήγησης βανκομυκίνης με αποικισμό ή λοίμωξη από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη. Μία συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση (meta-analysis), η οποία συμπεριέλαβε μόνο μελέτες οι οποίες εξομοίωσαν τις μεταβλητές με τη διάρκεια παραμονής στο νοσοκομείο, απέκλεισε τη συσχέτιση μεταξύ ενδοφλέβιας χορήγησης βανκομυκίνης και του αποικισμού και λοίμωξης από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη [80].

Ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί ότι η σχετική βιβλιογραφία στο ρόλο των αντιβιοτικών ως παραγόντων κινδύνου για αποικισμό και νόσο από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη χαρακτηρίζεται από ασυμφωνία και μία ποικιλία αποτελεσμάτων που εν μέρει οφείλονται στη διαφορετική μεθοδολογία των μελετών αυτών.

5.3. Ο ρόλος της φυσικής ανοσίας στην εξάπλωση και κυριαρχία στην εντερική χλωρίδα

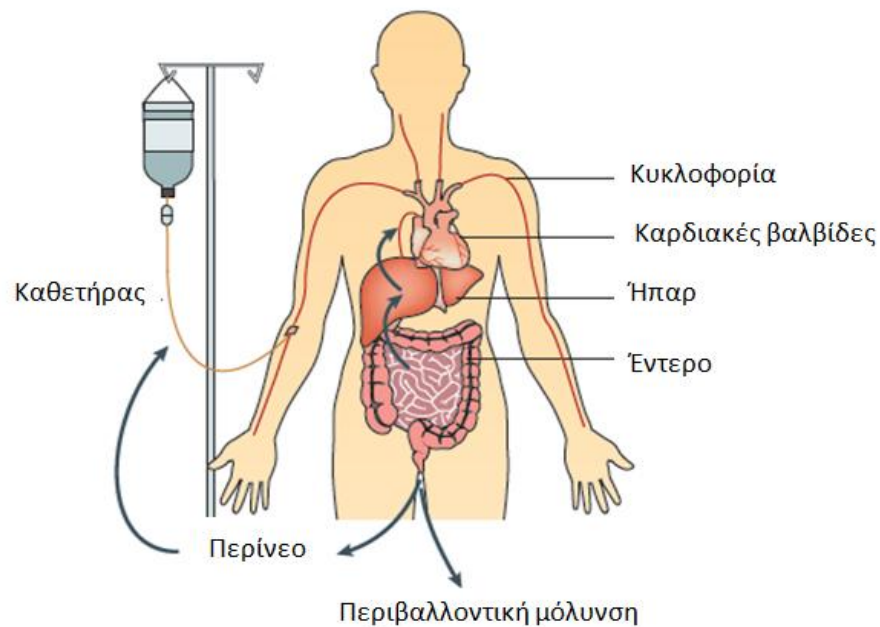
Η εντερική φυσική ανοσία παίζει ουσιαστικό ρυθμιστικό ρόλο στη διατήρηση της μικροβιακής χλωρίδας. Τα αντιβιοτικά προάγουν τον αποικισμό από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη αλληλεπιδρώντας με τον εντερικό βλεννογόνο και συγκεκριμένα με το αντιμικροβιακό πεπτιδίδιο RegIIIγ [81]. Το πεπτιδίδιο RegIIIγ είναι μια λεκτίνη (C-type lectin) που παράγεται από το εντερικό επιθήλιο και τα κύτταρα Paneth και χαρακτηρίζεται από αντιμικροβιακή δράση έναντι θετικών κατά Gram μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων των Εντερόκοκκων. Σε φυσιολογικές συνθήκες η λιποπολυσακχαριδική μεμβράνη των Gram αρνητικών προάγει την παραγωγή του RegIIIγ πεπτιδίου από τα κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου με αποτέλεσμα την αναστολή ανάπτυξης των Gram θετικών βακτηριδίων. Σε πειραματικό μοντέλο ποντικού η καταστολή της RegIIIγ λεκτίνης από πολυκλωνικό αντιορό είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του πληθυσμού του ανθεκτικού στη βανκομυκίνη Εντερόκοκκου [81]. Αντιθέτως, η από του στόματος χορήγηση λιποπολυσακχαρίδης η οποία προκαλεί τη διέγερση των εντερικών Toll-like receptor 4 (TLR-4), είχε σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της RegIIIγ λεκτίνης και τη μείωση του πληθυσμού των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη Εντερόκοκκων [81]. Αντιβιοτικά ευρέως φάσματος μειώνουν τον αριθμό των αρνητικών κατά Gram μικροοργανισμών όπως και των αναερόβιων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη διαταραχή της οικολογικής ισορροπίας υπέρ της ανάπτυξης θετικών κατά Gram βακτηριδίων και τον επακόλουθο αποικισμό από ανθεκτικό στη βανκομυκίνη Εντερόκοκκο.

Σε μία άλλη μελέτη, η χορήγηση φλατζελλίνης (flagellin), το μονομερές της πρωτεΐνης που απαρτίζει το νημάτιο του μαστιγίου των Gram αρνητικών, αποκαθιστά τη δράση της φυσικής ανοσίας και περιορίζει την επέκταση των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη Εντερόκοκκων [82]. Συγκεκριμένα η φλατζελλίνη είναι συνδέτης (ligand) των Toll-like receptors 5 (TLR-5) και προάγει την παραγωγή RegIIIγ μέσω της παραγωγής ιντερλευκίνης-22. Χορήγηση φλατζελλίνης σε ποντίκια των οποίων η εντερική χλωρίδα έχει διαταραχτεί από προηγηθείσα χορήγηση αντιβιοτικών περιορίζει σημαντικά τον αριθμό των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη Εντερόκοκκων στο γαστρεντερικό σωλήνα [82]. Τα παραπάνω καταδεικνύουν το σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο της εντερικής φυσικής ανοσίας στη διατήρηση της ισορροπίας της εντερικής χλωρίδας.

5.4. Κυριαρχία στην εντερική χλωρίδα και νόσος

Ο γαστρεντερικός σωλήνας αντιπροσωπεύει τη δεξαμενή αποικισμού (reservoir) των Εντερόκοκκων και αποτελεί πηγή βακτηριαιμίας και συστηματικής νόσου, καθώς και πηγή περιβαλλοντικής λοίμωξης (Εικόνα 4). Η αριθμητική αύξηση του πληθυσμού των Εντερόκοκκων και η κυριαρχία τους στη μικροβιακή εντερική χλωρίδα προηγείται της βακτηριαιμίας και νόσου. Αυτό ήταν το συμπέρασμα μίας πρόσφατης μελέτης σε λήπτες μεταμόσχευσης αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων όπου η προαγωγή του αποικισμού από ανθεκτικό στη βανκομυκίνη Εντερόκοκκο συσχετίστηκε με τη χορήγηση ενδοφλεβίων αντιβιοτικών [83]. Στη συνέχεια οι Εντερόκοκκοι αποκτούν πρόσβαση στα λεμφαγγεία και την κυκλοφορία του αίματος με μηχανισμούς που δεν έχουν ακόμα πλήρως αποσαφηνιστεί.

Εικόνα 4. Ο κεντρικός ρόλος του γαστρεντερικού σωλήνα στην πρόκληση Εντεροκοκκικής λοίμωξης και στην περιβαλλοντική μόλυνση.



(από *Arias C.A. et al., Nat Rev Microbiol* [62])

6. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ

Μέχρι τώρα δύο γονίδια έχουν επαληθευθεί να συμβάλλουν στην παθογονικότητα των Εντερόκοκκων σε πειραματικά μοντέλα. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν την επιφανειακή πρωτεΐνη *Esp* και τη συγκολλητίνη *Acm* [84]. Η επιφανειακή πρωτεΐνη *Esp* έχει αναγνωρισθεί στα είδη *E. faecalis* και *E. faecium* [50, 85] και εμπλέκεται στο σχηματισμό biofilms [86] και στον αποικισμό και στη λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος [87, 88]. Η συγκολλητίνη *Acm* αποτελεί συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος, αναγνωρίζει το κολλαγόνο και παίζει ρόλο στην παθογένεση της ενδοκαρδίτιδας [89, 90].

Εκτός από τους παραπάνω παράγοντες μία ποικιλία πεπτιδίων διερευνώνται ως πιθανοί παράγοντες παθογονικότητας (Πίνακες 2 & 3) [84]. Παράγοντες συνάθροισης (aggregation substances), είναι πρωτεΐνες που προάγουν τη συνάθροιση Εντερόκοκκων. Είδη *E. faecalis* διαθέτουν τους παράγοντες συνάθροισης *Asa I*, *Asp I*, *Asc 10*, οι οποίοι προάγουν τη μικροβιακή σύζευξη. Επιπλέον η πρωτεΐνη *Asa I* προάγει την προσκόλληση στο επιθήλιο του ουροποιητικού συστήματος [91] και την ενδοκυττάρια επιβίωση σε μακροφάγα ανθρώπινης προέλευσης [92], ενώ η πρωτεΐνη *Asc 10* αυξάνει την ενδοκυττάρια επιβίωση των Εντερόκοκκων στα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα [93]. Η ζελατινάση (gelatinase) είναι μία πρωτεΐνη που παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό biofilm από τον *E. faecalis* [94] σε πειραματικό μοντέλο περιτονίτιδας σε ποντίκια [95]. Το πολυσακχαριδικό αντιγόνο *Epa* συμμετέχει στο σχηματισμό biofilm [96], προσδίδει ανθεκτικότητα στη φαγοκυτταρική βακτηριοκτόνο δράση των πολυμορφοπύρρηνων [97], προσδίδει ευαισθησία στη λοίμωξη από βακτηριοφάγους [98] και συμμετέχει στην παθογένεση της περιτονίτιδας [99]. Πολυσακχαρίδες που παράγονται από ένζυμα κωδικοποιημένα από το *cps* locus προσδίδουν αντοχή στη δράση του συμπληρώματος [100]. Γλυκολιπίδια της μεμβράνης συμμετέχουν στο σχηματισμό biofilms [101], στην προσκόλληση στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου [102], καθώς και στην παθογένεση σηψαιμίας σε πειραματικό μοντέλο ποντικού [101]. Τέλος, το φερόμενο ως γονίδιο παθογονικότητας *hyl_{Em}* [103], που κωδικοποιεί την παραγωγή υαλουρονιδάσης και παρουσιάζει ομολογία με το αντίστοιχο γονίδιο του *Streptococcus pyogenes* και *Streptococcus pneumoniae* έχει αναγνωρισθεί σε παθογόνα στελέχη *E. faecium* που απομονώθηκαν από εστίες νόσου από κλινικά στελέχη υπεύθυνα για την πρόκληση νόσου.

Πίνακας 2. Παράγοντες παθογονικότητας *Enterococcus faecium*.

	Pathophysiology/Virulence	Epidemiology
<i>E. faecium</i> (Efm)		
Esp	Biofilm formation Pathogenesis of rat endocarditis Pathogenesis of mouse UTI ^a Antigenic in humans during endocarditis and bacteraemia	Specifically linked to HA ^b Efm
Acm	Binding to collagen type I, IV Pathogenesis of rat endocarditis Antigenic in humans during endocarditis	Wide spread among Efm
Pili PilA PilB	Not known	Wide spread among Efm
Scm Ecba	Binding to collagen type V Binding to collagen type V Binding to fibrinogen	Widespread among Efm Specifically linked to HA Efm

Πίνακας 3. Παράγοντες παθογονικότητας *Enterococcus faecalis*.

<i>E. faecalis</i> (Efa)		
AS	Promotes conjugation by directing bacterial aggregation Internalization into intestinal epithelial cells	Widespread among Efa
Asa I	Binding to renal tubular cells	
Asp I	Binding to and survival in macrophages Binding to ECM	
Asc 10	Pathogenesis of rabbit endocarditis Internalization into and survival in PMNs ^c Binding to ECM	
Esp	Pathogenesis of rabbit endocarditis Biofilm formation Pathogenesis of mouse UTI	Widespread among Efa
Gelatinase/FSR	Biofilm formation Pathogenesis of mouse peritonitis <i>Caenorhabditis elegans</i> infection Pathogenesis of rabbit endophthalmitis	Widespread among Efa
Pili ebp locus	Biofilm formation Pathogenesis of endocarditis Pathogenesis of UTI Antigenic in humans during endocarditis	Widespread among Efa
bee locus	Biofilm formation	Among 5% of Efa
Ace	Binding to collagen type I, IV Binding to laminin and dentin	Widespread among Efa
cps locus epa locus	Resistance to complement and PMNs-mediated killing Biofilm formation Enterocyte translocation Resistance to killing by PMNs Resistance to infection by phages Pathogenesis of mouse peritonitis Pathogenesis of mouse UTI	Efa serotype C and D strains Present in Efa cell wall
LTA	Target of opsonic antibodies	Present in enterococcal cell wall
WTA	Not known	Present in enterococcal cell wall
Glycolipids	Biofilm formation Binding to colonic epithelial cells Pathogenesis of mouse sepsis	Present in enterococcal cell membrane

(Από Sava *et al*, *J. Clin Microbiol Infect.* 2010 Jun;16(6):533-40 [84])

7. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Η βακτηριαιμία αποτελεί την πιο συχνή κλινική εκδήλωση των Εντεροκοκκικών λοιμώξεων [1, 104]. Σε λοιμώξεις κοινότητας συχνή πηγή προέλευσης είναι το ουροποιητικό σύστημα και ο γαστρεντερικός σωλήνας ενώ σε νοσοκομειακές λοιμώξεις οι ενδαγγειακοί καθετήρες, το ουροποιητικό σύστημα παρουσία ουροκαθετήρων και λιγότερο συχνά οι ενδοκοιλιακές λοιμώξεις και οι λοιμώξεις της πυέλου και των χοληφόρων [104, 105]. Οι περισσότεροι ασθενείς πάσχουν από σοβαρή υποκείμενη νόσο, ενώ είναι συνήθης η παρουσία πολλαπλών συνυπαρχόντων παθολογικών καταστάσεων [105, 106]. Σε ποσοστό 34-42% η βακτηριαιμία είναι πολυμικροβιακή, μαζί με αερόβιους Gram αρνητικούς μικροοργανισμούς [105, 106] συνήθως όταν σχετίζεται με λοιμώξεις κοιλίας, πυέλου και χοληφόρων. Αντιθέτως, η βακτηριαιμία σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς είναι κατά κανόνα μονομικροβιακή και προέρχεται από το γαστρεντερικό σωλήνα [107]. Βακτηριαιμία από Εντερόκοκκο σπάνια προκαλεί shock [105] καθώς οι Εντερόκοκκοι δεν παράγουν εξωτοξίνες ή υπεραντιγόνα (superantigens) [102]. Συχνά η Εντεροκοκκική βακτηριαιμία είναι παροδική ενώ μεταστατικές εστίες είναι σπάνιες [106, 108].

Η ενδοκαρδίτιδα είναι μία από τις πιο σοβαρές επιπλοκές της βακτηριαιμίας. Η ενδοκαρδίτιδα προσβάλλει συχνότερα τους άνδρες [109] και είναι πιο συχνή σε βακτηριαιμίες κοινότητας παρά σε βακτηριαιμίες νοσοκομειακής προέλευσης [1, 104]. Η Εντεροκοκκική ενδοκαρδίτιδα αντιπροσωπεύει το 5-20% όλων των ενδοκαρδίτιδων και προκαλείται κυρίως από τα είδη *E. faecalis* [109]. Πιο συγκεκριμένα, σε μία προοπτική μελέτη ασθενών με ενδοκαρδίτιδα, ο *E. faecalis* ήταν το δεύτερο συχνότερο παθογόνο μετά από το χρυσίζοντα Σταφυλόκοκκο [110]. Η Εντεροκοκκική ενδοκαρδίτιδα τυπικά εκδηλώνεται ως υποξεία ενδοκαρδίτιδα της αριστερής καρδιάς [1, 109, 111], ενώ λιγότερο συχνά εκδηλώνεται ως οξεία ενδοκαρδίτιδα. Προσβάλλει πιο συχνά τη μιτροειδή βαλβίδα από την αορτική [111], τυπικά σε ασθενείς με υποκείμενη καρδιακή νόσο είτε σε ασθενείς με προσθετικές βαλβίδες [104].

Το ουροποιητικό σύστημα αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή εστία Εντεροκοκκικών λοιμώξεων [3]. Η πλειοψηφία των λοιμώξεων είναι νοσοκομειακής προέλευσης και σχετίζονται με ουροκαθετήρες ή επεμβατικές διαδικασίες [1]. Εκτός από κυστίτιδα και πυελονεφρίτιδα οι Εντερόκοκκοι σπανιότερα προκαλούν προστατίτιδα και περινεφρικό απόστημα.

Ενδοκοιλιακές λοιμώξεις και λοιμώξεις των πυελικών δομών είναι κατά κανόνα πολυμικροβιακές και παρατηρούνται στα πλαίσια μετεγχειρητικών επιπλοκών κοιλιακών επεμβάσεων ή διάτρησης κοίλου σπλάχνου. Κλινικά εκδηλώνονται ως περιτονίτιδα, αποστήματα, λοιμώξεις χοληφόρων ή ηπατικό απόστημα, και συχνά επιπλέκονται από

βακτηριαμιά [1, 104, 105]. Οι λοιμώξεις αυτές είναι κατά κανόνα πολυμικροβιακές [1, 105] αν και λιγότερο συχνά οι Εντερόκοκκοι προκαλούν πρωτοπαθή περιτονίτιδα σε ασθενείς με νεφρωτικό σύνδρομο, κίρρωση του ήπατος και σε ασθενείς που υποβάλλονται σε περιτοναϊκή κάθαρση [1]. Ωστόσο, ο ρόλος των Εντερόκοκκων στις πολυμικροβιακές λοιμώξεις της κοιλίας έχει αμφισβητηθεί [112, 113].

Οι Εντερόκοκκοι σπάνια προκαλούν λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων απομονώνονται σε καλλιέργειες ιστών στα πλαίσια πολυμικροβιακών λοιμώξεων χειρουργικών τραυμάτων, λοιμώξεις διαβητικών ποδιών και ελκών κατακλίσεως μαζί με Gram αρνητικά και αναερόβια βακτηρίδια [1]. Λόγω του ότι σπάνια οι Εντερόκοκκοι είναι οι αποκλειστικοί αιτιολογικοί παράγοντες κυτταρίτιδας και εξαιτίας της περιορισμένης παθογονικότητάς τους ο ρόλος τους στην πρόκληση νόσου έχει επίσης αμφισβητηθεί.

Μηνιγγίτιδα από Εντερόκοκκο είναι σπάνια και χαρακτηρίζεται από σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα που προσεγγίζει το 21% [114]. Συχνότερα αντιπροσωπεύει μετεγχειρητική λοίμωξη (59% των περιπτώσεων σύμφωνα με μία μελέτη), ενώ λοιμώξεις κοινότητας επέρχονται σε ασθενείς με χρόνιες νόσους όπως, διαβήτη, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, χρόνια αναπνευστική πνευμονοπάθεια και καρδιαγγειακή νόσο είτε σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς όπως λήπτες μετασμόχευσης αιμοποιοητικών βλαστικών κυττάρων ή συμπαγών οργάνων και ασθενείς με το σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας [1, 114]. Τέλος, καλά τεκμηριωμένη είναι η μηνιγγίτιδα των νεογνών και η μηνιγγίτιδα σε παιδιά με ανατομικές ανωμαλίες του νωτιαίου σωλήνα [115].

8. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

8.1. Καλλιέργεια και ταυτοποίηση Εντεροκοκκικών ειδών

Οι Εντερόκοκκοι αναπτύσσονται γρήγορα στα τυποποιημένα αερόβια μέσα καλλιέργειας. Απομονώνονται σε αιματούχο άγαρ (5% sheep blood, SBA). Τυπικές εργαστηριακές συνθήκες επώασης περιλαμβάνουν brain heart infusion ή Todd-Hewitt ζωμό ή άγαρ χωρίς ή με προσθήκη αντιβιοτικών όταν ενδείκνυται, σε θερμοκρασία 35°-37°C, χωρίς την παροχή αέρα. Για το διαχωρισμό τους από άλλα Gram αρνητικά βακτηρίδια σε πολυμικροβιακά δείγματα χρησιμοποιούνται bile-esculin azide άγαρ, phenylethyl alcohol (PEA), colistin-nalidixic acid άγαρ (CNA), και άλλα μέσα καλλιέργειας που περιέχουν αζίδιο (azide).

Άλλα Gram θετικά βακτηρίδια όπως ο *Leuconostoc* και *Pediococcus* έχουν κοινά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με τους Εντερόκοκκους όπως την παρουσία αντιγόνου της ομάδας D και ανάπτυξη σε θερμοκρασία 45°C. Η κλινική σημασία της διάκρισης των γενών αυτών από τους Εντερόκοκκους έγκειται στο ότι είναι εγγενώς ανθεκτικά στη βανκομυκίνη. Πριν την εμφάνιση Εντερόκοκκων ανθεκτικών στη βανκομυκίνη, η διάκριση από τα γένη *Leuconostoc* και *Pediococcus* πραγματοποιούνταν βάσει της αντοχής των τελευταίων στη βανκομυκίνη. Μετά την εξάπλωση των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη Εντερόκοκκων η διάκριση μεταξύ των δύο πραγματοποιείται με τη δοκιμή παραγωγής πυρρολινοδάσης (PYR, L-pyrrolidonyl-β-naphthylamide) και την παραγωγή λευκίνης αμινοπεπτιδάσης (LAP) [116]. Στελέχη του γένους *Lactococcus* είναι επίσης εγγενώς ανθεκτικά στη βανκομυκίνη. Ωστόσο σε αντίθεση με τους Εντερόκοκκους τα γένη αυτά δεν αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 45° C.

Ιδιαίτερα σημαντική στην κλινική πράξη είναι η διάκριση των Εντερόκοκκων από τον *Streptococcus pneumoniae* (πνευμονιόκοκκο) και τον *Streptococcus pyogenes* καθώς τα είδη αυτά είναι επίσης θετικά κατά Gram και διατάσσονται κατά ζεύγη και βραχείες αλυσίδες. Για το σκοπό αυτό για το *Streptococcus pneumoniae* χρησιμοποιείται η αντίδραση PYR (οι πνευμονιόκοκκοι είναι PYR αρνητικοί) καθώς και η εξέταση διαλυτότητας σε χολή όπου παρατηρείται λύση των πνευμονιοκόκκων και ανθεκτικότητα των Εντερόκοκκων. Αντίθετα, ο *Streptococcus pyogenes* είναι PYR θετικό βακτηρίδιο όπως και οι Εντερόκοκκοι. Ωστόσο, τα στελέχη Εντερόκοκκου προκαλούν α- ή γ-αιμόλυση χαρακτηριστικό που προλέγει με αρκετή βεβαιότητα την απομόνωση Εντερόκοκκου.

Αν και η δοκιμή παραγωγής πυρρολινοδάσης (PYR, L-pyrrolidonyl-β-naphthylamide) στερείται ειδικότητας, χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ταχύτερη ανίχνευση του Εντερόκοκκου από πολλά κλινικά εργαστήρια.

Αναγνώριση των ειδών των Εντεροκοκκικών στελεχών στο μικροβιολογικό εργαστήριο είναι αναγκαία για τον προσδιορισμό της παθογονικότητας τους, της ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά αλλά και για νοσοκομειακή επιδημιολογική διερεύνηση. Σε αντίθεση με τον *Εντερόκοκκο faecium*, ο *Εντερόκοκκος faecalis* καλλιεργείται σε μέσα που περιέχουν 0.04% τελλουρίτη (tellurite), παράγει σκουρόχρωμες αποικίες, μεταβολίζει το πυρουβικό (pyruvate) το οποίο μπορεί να χρησιμοποιήσει για την παραγωγή ενέργειας [21].

Στη κλινική πράξη σημαντική είναι επίσης η διάκριση από μη παθογόνα εγγενώς ανθεκτικά στη βανκομυκίνη είδη όπως ο *E. gallinarum* και *E. casseliflavus* (*E. flavescens*). Τα είδη αυτά διακρίνονται από τον *E. faecium* βάσει των φαινοτυπικών τους χαρακτηριστικών

όπως η κινητικότητα (ιδιότητα των *E. gallinarum* και *E. casseliflavus* αλλά όχι του *E. faecium*) και η παραγωγή κίτρινης χρωστικής (χαρακτηριστικό αποκλειστικά του *E. casseliflavus*) [117]. Επειδή οι παραπάνω τεχνικές είναι κοπιώδεις τα περισσότερα μικροβιολογικά εργαστήρια χρησιμοποιούν αυτοματοποιημένες ταχείες μεθόδους όπως το σύστημα API 20 Strep (bioMerieux Vitek, St. Louis, MO, USA) [118], ή το MicroScan Pos Combo Type 12 (Dade Behring Inc., Sacramento, CA, USA).

Τέλος, για την ακριβέστερη εργαστηριακή διάγνωση των Εντεροκοκκικών ειδών έχει αναπτυχθεί μία ποικιλία μοριακών τεχνικών όπως ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing) του γονιδίου του 16S ανασυνδιασμένου RNA (16S recombinant RNA gene), η ενίσχυση (amplification) του *ace* γονιδίου [119], και η ενίσχυση (amplification) του *ddl* γονιδίου [120].

8.2. Προσδιορισμός ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Τα αυτόματα συστήματα καλλιέργειών (Vitek[®], Microscan[®] κλπ), προσδιορίζουν με αξιοπιστία την ευαισθησία των μικροβίων στα αντιβιοτικά (προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας, Minimum Inhibitory Concentration, MIC). Εναλλακτικά προσδιορισμός της ευαισθησίας των μικροβίων στα αντιβιοτικά μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ (Kirby Bauer) ή με τη μέθοδο του E-test.

8.2.1. Αντοχή στην πενικιλίνη και αμπικιλίνη

Υψηλού βαθμού αντοχή του Εντερόκοκκου έναντι της πενικιλίνης ή αμπικιλίνης ορίζεται ως ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα ίση ή μεγαλύτερη από 16 mcg/L (MIC \geq 16 mcg/L) [121]. Ο μηχανισμός αντοχής περιλαμβάνει κυρίως τη δομική μεταβολή της πρωτεΐνης δέσμησης της πενικιλίνης (PBP, target modification) [122, 123] που αποτελεί το στόχο των β-λακταμικών αντιβιοτικών και σπανιότερα την παραγωγή β-λακταμασών [124]. Για την ανίχνευση αντοχής λόγω παραγωγής β-λακταμασών απαιτείται υψηλό μικροβιακό ενοφθάλμισμα. Στα συνήθη μέσα καλλιέργειας χρησιμοποιούνται μικρότερα μικροβιακά ενοφθαλμίσματα και τα στελέχη αυτά αναγνωρίζονται ως ευαίσθητα. Κατά συνέπεια, όταν επιδιώκεται η χρήση β-λακταμικών αντιβιοτικών έναντι σοβαρών λοιμώξεων, όπως η ενδοκαρδίτιδα, οι ενδοαγγειακές λοιμώξεις, η μηνιγγίτιδα, κλπ, συνιστάται ο έλεγχος παραγωγής β-λακταμασών χρησιμοποιώντας δίσκους Nitrocefin (DifcoTM), η οποία είναι μία χρωμογόνο κεφαλοσπορίνη [121].

8.2.2. Αντοχή στις αμινογλυκοσίδες και προσδιορισμός συνέργειας

Οι Εντερόκοκκοι χαρακτηρίζονται από εγγενή χαμηλού έως μέτριου βαθμού αντοχή στις αμινογλυκοσίδες με ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) που κυμαίνεται μεταξύ 4 και 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [125]. Ο μηχανισμός αντοχής περιλαμβάνει τη μείωση της διαπερατότητας του κυτταρικού τοιχώματος και κατά συνέπεια την περιορισμένη ενδοκυττάρια συγκέντρωσή τους.

Αντιθέτως, η υψηλού βαθμού αντοχή στις αμινογλυκοσίδες είναι επίκτητη και σχετίζεται με την παρουσία ενζύμων που τροποποιούν τις αμινογλυκοσίδες και εξουδετερώνουν τη συνεργιστική τους δράση με την πενικιλίνη ή τη βανκομυκίνη [126]. Υψηλού βαθμού αντοχή στις αμινογλυκοσίδες *in vitro* ορίζεται ως ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση $\geq 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ για τη γενταμυκίνη και $\geq 2000 \mu\text{g}/\text{mL}$ για τη στρεπτομυκίνη. Αντοχή στη γενταμυκίνη δεν προϋποθέτει αυτόματα αντοχή στη στρεπτομυκίνη.

Για τον προσδιορισμό αντοχής στη γενταμυκίνη χρησιμοποιείται η μέθοδος διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ (Kirby-Bauer, δίσκος με 120 μg γενταμυκίνης) είτε μέθοδος αραιώσεων αντιβιοτικών σε υγρά υλικά (Brain Heart Infusion άγαρ με 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ γενταμυκίνης) [127]. Αντοχή στη γενταμυκίνη προλέγει αντοχή σε όλες τις αμινογλυκοσίδες εκτός της στρεπτομυκίνης. Για τον προσδιορισμό αντοχής στη στρεπτομυκίνη χρησιμοποιείται η μέθοδος διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ (δίσκος με 300 μg στρεπτομυκίνης) είτε η μέθοδος αραιώσεων αντιβιοτικών σε άγαρ (Brain Heart Infusion άγαρ με 1000 μg στρεπτομυκίνης).

Συμβατικές μέθοδοι προσδιορισμού αντοχής αποτυγχάνουν να ανιχνεύσουν συνέργεια πενικιλίνης-αμινογλυκοσίδης. Για τον προσδιορισμό συνέργειας συνιστάται ο προσδιορισμός υψηλού βαθμού αντοχής στις αμινογλυκοσίδες [127]. Η παρουσία ευαισθησίας σε υψηλή συγκέντρωση γενταμυκίνης (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, μετά από 24 ώρες χρόνο επώασης) και στρεπτομυκίνης (1000 ή 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, μετά από 48 ώρες χρόνο επώασης) προλέγει συνέργεια με αντιβιοτικά που δρουν στο κυτταρικό τοίχωμα. Καθώς αντοχή στη γενταμυκίνη δεν προϋποθέτει αυτόματα και αντοχή στη στρεπτομυκίνη, και οι δύο αμινογλυκοσίδες πρέπει να προσδιορίζονται όταν συνέργεια είναι απαραίτητη όπως σε λοιμώξεις απειλητικές για τη ζωή του ασθενούς.

8.3. Έγκαιρη αναγνώριση Εντερόκοκκου ανθεκτικού στη βανκομυκίνη

Ευαίσθητα στη βανκομυκίνη ορίζονται τα στελέχη τα οποία χαρακτηρίζονται από ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (MIC) 2 ή 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ενδιάμεση αντοχή ορίζεται ως ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (MIC) 8 με 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ενώ υψηλή αντοχή ως ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (MIC) ίση ή μεγαλύτερη από 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Η ταχεία αναγνώριση ανθεκτικών στη βανκομυκίνη

Εντερόκοκκων είναι σημαντική στην κλινική πράξη γιατί συμβάλλει στην έγκαιρη χορήγηση αποτελεσματικής αντιβίωσης. Επιπλέον, πολλά νοσηλευτικά ιδρύματα υποβάλλουν συστηματικά τους ασθενείς τους σε πρόγραμμα προσυμπτωματικού ελέγχου προκειμένου να αναγνωρίσουν αποικισμένους ασθενείς και να περιορίσουν την εξάπλωση ανθεκτικών στελεχών. Για την έγκαιρη αναγνώριση αντοχής στη βανκομυκίνη τα στελέχη επωάζονται σε Brain Heart Infusion (BHI) άγαρ που περιέχει βανκομυκίνη 6 µg/mL για 24 ώρες στους 35° C [127]. Με αυτή τη μέθοδο ανιχνεύονται όλα τα VanA Εντεροκοκκικά στελέχη και η πλειοψηφία των VanB στελεχών. Συνιστάται τα ευρήματα να επιβεβαιώνονται με τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας. Εναλλακτικά, τεχνικές ενίσχυσης (amplification) νουκλεϊκών οξέων μπορούν να ανιχνεύσουν τα VanA και VanB γονίδια που κωδικοποιούν την αντοχή στα αντιβιοτικά [128]. Η ευαισθησία της μεθόδου μπορεί να αυξηθεί αν το δείγμα επωαστεί για 8 - 24 ώρες σε ζυμό καλλιέργειας.

9. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ

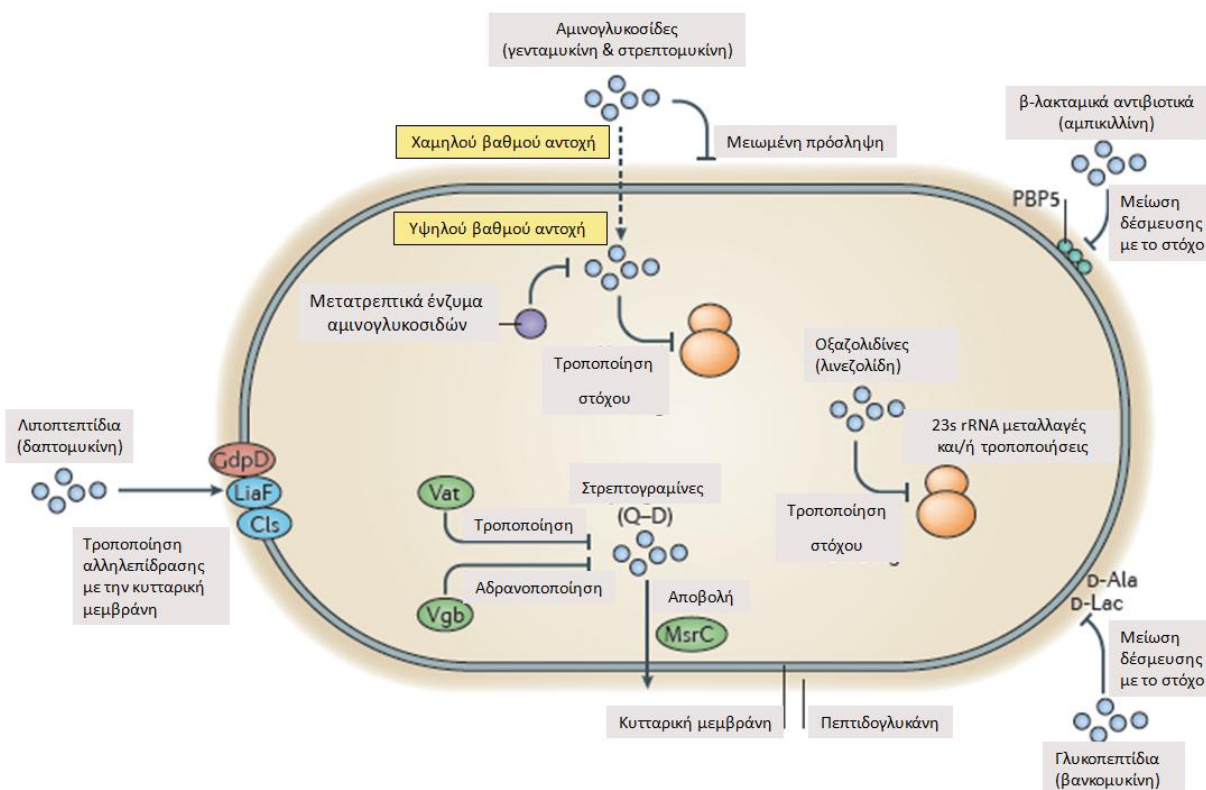
9.1. Αντοχή στην αμπικιλίνη και τα β-λακταμικά αντιβιοτικά

Αντοχή στις πενικιλίνες και καρβαπενέμες παρατηρείται κυρίως στον *E. faecium* και είναι αποτέλεσμα μετάλλαξης στο γονίδιο *rbp-5* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη δέσμευσης της πενικιλίνης (penicillin-binding protein 5, PBP-5) (Εικόνα 5). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της χημικής συγγένειας για την αμπικιλίνη [122, 123], και την υπερέκφραση (overexpression) της συγκεκριμένης πρωτεΐνης αυξάνοντας έτσι τη συγκέντρωση των φαρμακευτικών στόχων [129, 130]. Επίσης, σχεδόν αποκλειστικά σε είδη *E. faecalis* έχει περιγραφεί ενζυματική υδρόλυση των πενικιλινών από β-λακταμάσες [124]. Αυτός ο μηχανισμός αντοχής παρατηρείται πιο σπάνια και τα κρούσματα που έχουν περιγραφεί είναι σποραδικά [131].

9.2. Αντοχή στις αμινογλυκοσίδες

Τουλάχιστον 9 γονίδια που κωδικοποιούν αντοχή στις αμινογλυκοσίδες έχουν αναγνωριστεί. Το πιο σημαντικό είναι το γονίδιο *aac(6'')-Ie-aph(2'')-Ia* που κωδικοποιεί το ένζυμο *Aac(6'')-Ie-Aph(2'')-Ia* το οποίο χαρακτηρίζεται από διπλή καταλυτική δράση (Εικόνα 5) [126]. Το ένζυμο αυτό κωδικοποιεί αντοχή σε όλες τις αμινογλυκοσίδες εκτός από τη στρεπτομυκίνη. Αντοχή στη στρεπτομυκίνη είτε είναι αποτέλεσμα απόκτησης γονιδίων νουκλεοτιδολοτρανσφεράσης *ant(3'')-Ia* ή *ant(6')-Ia*, είτε προκαλείται από μετάλλαξη του ριβοσωμικού στόχου [126].

Εικόνα 5. Μηχανισμοί αντοχής των Εντερόκοκκων στα αντιβιοτικά.



(από *Arias C.A. et al., Nat Rev Microbiol* [62])

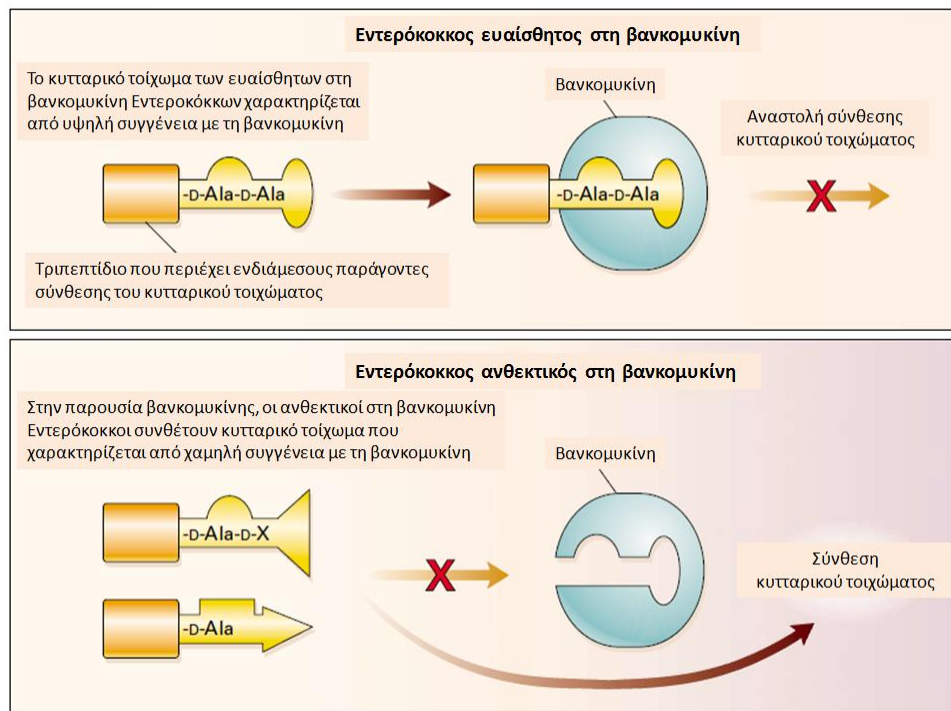
9.3. Αντοχή στη βανκομικίνη

Τα γλυκοπεπτιδία αναστέλλουν το τελευταίο βήμα σύνθεσης των πεπτιδογλυκανών του μικροβιακού κυτταρικού τοιχώματος και συγκεκριμένα την τρανσγλυκοζυλίωση των πενταπεπτιδικών μονάδων δημιουργώντας χημικό δεσμό με το D-alanyl-D-alanine, το οποίο είναι το τελικό αμινοξύ των πεπτιδογλυκανών [132]. Ο μηχανισμός αντοχής των Εντερόκοκκων στη βανκομικίνη περιλαμβάνει την παραγωγή τροποποιημένων προδρόμων των πεπτιδογλυκανών που χαρακτηρίζονται από χαμηλή χημική συγγένεια με τη βανκομικίνη [133]. Συγκεκριμένα, στα ανθεκτικά στελέχη το τελικό αμινοξύ D-alanyl-D-alanine (D-Ala-D-Ala) έχει υποκατασταθεί από D-alanyl-D-lactate (D-Ala-D-Lac) είτε από D-serine (Εικόνα 6).

Η αντοχή στη βανκομικίνη καθορίζεται από συμπλέγματα γονιδίων (gene clusters) που κωδικοποιούν ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στη σύνθεση τροποποιημένων πεπτιδογλυκανικών προδρόμων του κυτταρικού τοιχώματος. Μέχρι τώρα έχουν περιγραφεί 7 συμπλέγματα γονιδίων (VanA, B, C, D, E, G και L) που είτε κωδικοποιούν για τελικό αμινοξύ D-lactate (VanA, B, και D) είτε για D-serine (VanC, E, G και L) [2]. Το σύμπλεγμα γονιδίων VanA είναι πιο συχνό

σε κλινικά στελέχη *E. faecium*, ενώ το σύμπλεγμα γονιδίων VanB ανευρίσκεται πιο συχνά σε στελέχη *E. faecalis*. Το σύμπλεγμα γονιδίων VanA είναι επικρατέστερο στη Βόρεια Αμερική (76%) έναντι της Ευρώπης (40%) [36]. Το σπερόνιο (σύμπλεγμα γονιδίων) VanA τυπικά μεταφέρεται με το τρανσποζόνιο Tn1546 (transposon) το οποίο έχει εντοπιστεί σε πλασμίδια και χρωμοσομικό DNA [134]. Το τρανσποζόνιο Tn1546 κωδικοποιεί μία αφυδρογονάση (VanH) η οποία ανάγει το πυρουβικό σε D-Lac και τον VanA συνδέτη (VanA ligand) που καταλύει το σχηματισμό εστερικού δεσμού ανάμεσα στο D-Ala και D-Lac [135]. Το δεσιπεπτιδίο που προκύπτει είναι το D-Ala-D-Lac και υποκαθιστά το διπεπτιδίο D-Ala-D-Ala στη σύνθεση πεπτιδογλυκάνης. Η υποκατάσταση αυτή μειώνει τη χημική συγγένεια με τα γλυκοπεπτιδία (βανκομυκίνη) [136]. Ωστόσο, η σύγχρονη παραγωγή προδρόμων που λήγουν σε D-Ala και D-Lac δεν προσδίδει αυτόματα και αντοχή στα γλυκοπεπτιδία [137]. Απαιτείται η αφαίρεση ευαίσθητων στα γλυκοπεπτιδία προδρόμων τα οποία λήγουν σε D-Ala [138]. Αυτό επιτυγχάνεται με δύο ένζυμα, την VanX D,D-dipeptidase που υδρολύει το D-Ala-D-Ala διπεπτιδίο [139] και την VanY D,D-carboxypeptidase η οποία αφαιρεί το D-Ala υπόλειμμα στο C-άκρο όταν η απομάκρυνση του D-Ala-D-Ala από την VanX D,D-dipeptidase είναι ατελής [140]. Το σπερόνιο VanB μεταφέρεται με τα τρανσποζόνια Tn1547 και Tn5382 που έχουν επίσης εντοπιστεί σε πλασμίδια και χρωμοσομικό DNA [141, 142].

Εικόνα 6. Μηχανισμός αντοχής στα γλυκοπεπτιδία (*Murray, B.E., NEJM, 2000, p 710 [143]*).



Φαινοτυπικά, Εντερόκοκκοι που φέρουν το σύμπλεγμα γονιδίων VanA χαρακτηρίζονται από αντοχή μόνο στη βανκομυκίνη (Πίνακας 4). Εντερόκοκκοι που φέρουν το σύμπλεγμα γονιδίων VanB χαρακτηρίζονται από αντοχή στη βανκομυκίνη και στην τεϊκοπλαμίνη. Ωστόσο η χρήση της τεϊκοπλαμίνης προάγει αντοχή και κατά συνέπεια δεν πρέπει να χρησιμοποιείται θεραπευτικά.

Συμπλέγματα γονιδίων VanC προκαλούν ενδιάμεσου βαθμού αντοχή στη βανκομυκίνη (MIC 8-16 µg/ml) και τυπικά ανευρίσκονται σε είδη *E. gallinarum* και *E. casseliflavus* [144, 145]. Το σύμπλεγμα γονιδίων VanC αντιπροσωπεύει εγγενή αντοχή και δεν μεταδίδεται μεταξύ στελεχών ή Εντεροκοκκικών ειδών.

Πίνακας 4. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά Εντερόκοκκων ανθεκτικών στα γλυκοπεπτιδία (βανκομυκίνη και τεϊκοπλαμίνη).

	VanA	VanB	VanC	VanD	VanE	VanG
MIC βανκομυκίνης (µg/mL)	64 - >1000	4-1024	2-32	64-256	16	4-16
MIC τεϊκοπλαμίνης (µg/mL)	16-512	≤0.5	≤0.5	4-32	0.5	0.5
Είδη που φέρουν το σύμπλεγμα	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> MRSA	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecium</i> -	<i>E. faecalis</i> -	<i>E. faecalis</i> -
Γενετικοί παράγοντες	VanA σύμπλεγμα	VanB σύμπλεγμα	VanC1 VanC2 σύμπλεγμα	VanD σύμπλεγμα	VanE σύμπλεγμα	VanG σύμπλεγμα
Προέλευση Αντοχής	Επίκτητη	Επίκτητη	Εγγενής	Επίκτητη	Επίκτητη	
Μεταδοτικότητα	Ναι	Ναι	Όχι			

MIC: ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα.

10. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Τρία προεξάρχοντα χαρακτηριστικά των Εντερόκοκκων τους διαφοροποιούν από τους λοιπούς Στρεπτόκοκκους και καθιστούν τη θεραπευτική τους αντιμετώπιση ιδιαίτερα δύσκολη. Το πρώτο είναι η εγγενής αντοχή τους σε πολλά αντιβιοτικά ευρείας χρήσης όπως την οξακιλλίνη, τις κεφαλοσπορίνες και την κλινδαμυκίνη [1]. Δεύτερον, τα υπάρχοντα αντιβιοτικά συμπεριλαμβανομένων και των αντιβιοτικών πρώτης επιλογής χαρακτηρίζονται από βακτηριοστατική δράση [146]. Τρίτον, οι Εντερόκοκκοι έχουν την ικανότητα να αναπτύσσουν επίκτητη αντοχή στα συνιστώμενα αντιβιοτικά, όπως η αμπικιλίνη, οι αμινογλυκοσίδες και η βανκομυκίνη [147]. Τα χαρακτηριστικά αυτά περιορίζουν ιδιαίτερα το φάσμα και την αποτελεσματικότητα των θεραπευτικών επιλογών. Αποθαρρυντικό είναι επίσης το γεγονός ότι, ανθεκτικά στελέχη έναντι των νεώτερων αντιβιοτικών λινεζολίδη και δαπτομυκίνη, απομονώθηκαν σύντομα μετά την εισαγωγή τους στην κλινική πράξη [148-150].

Επιπλέον, οι Εντερόκοκκοι χαρακτηρίζονται από το φαινόμενο της ανοχής (tolerance) που ορίζεται ως ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) 16 φορές υψηλότερη από την τιμή της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (MIC) [146, 147]. Λαμβάνοντας υπόψη το θεραπευτικό εύρος των αντιβιοτικών (τη διαφορά της ελάχιστης θεραπευτικής τους συγκέντρωσης με τη συγκέντρωση κατά την οποία προκαλούν τοξικότητα) η δράση των αντιβιοτικών στις ενδεικνυόμενες δόσεις είναι βακτηριοστατικές.

10.1. Αντιβιοτικά πρώτης επιλογής και εναλλακτικές θεραπείες

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά αναστέλλουν την πρωτεΐνη δέσμευσης των πενικιλινών (PBPs) διαταράσσοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Οι Εντερόκοκκοι χαρακτηρίζονται από σχετική αντοχή στις πενικιλίνες. Η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (MIC) του *E. faecalis* για την πενικιλίνη είναι 10-100 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη άλλων Στρεπτόκοκκων [1].

Ευαίσθητα στελέχη στην πενικιλίνη ή αμπικιλίνη ορίζονται αυτά τα οποία χαρακτηρίζονται από ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα μικρότερη από 16 µg/mL (διάμετρος ζώνης μεγαλύτερη από 15 mm) [121]. Βάσει της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (MIC) αντιβιοτικά επιλογής είναι οι αμινοπενικιλίνες (αμπικιλίνη), και ακολουθούν κατά σειρά μειούμενης δραστηριότητας οι ουροδεοξυπενικιλίνες (πιπερακιλλίνη), η πενικιλίνη G και η ιμιπενέμη η οποία όμως είναι δραστική μόνο έναντι ειδών *E. faecalis* [143]. Η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (MIC) για την αμπικιλίνη είναι κατά κανόνα μία βαθμίδα αραίωσης χαμηλότερη σε σχέση με την πενικιλίνη. Γενικότερα, τα είδη *E. faecium* είναι πιο ανθεκτικά στην αμπικιλίνη (MIC >16 µg/mL) από είδη *E.*

faecalis (MIC >8 µg/mL) [151]. Συμπερασματικά, η αμπικιλίνη και η πενικιλίνη αποτελούν τα αντιβιοτικά επιλογής για Εντεροκοκκικές λοιμώξεις εφόσον τα απομονωθέντα στελέχη είναι ευαίσθητα στα αντιβιοτικά αυτά. Σε ασθενείς αλλεργικούς στην πενικιλίνη και στη θεραπεία στελεχών που χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα ανοχής στην αμπικιλίνη, συνιστάται η χορήγηση βανκομυκίνης.

Μονοθεραπεία με αμινογλυκοσίδη δεν πρέπει να χρησιμοποιείται ποτέ στη θεραπεία Εντεροκοκκικών λοιμώξεων. Αμινογλυκοσίδες ενδείκνυνται μόνο σε συνδυασμό με β-λακταμικά αντιβιοτικά προκειμένου να επιτευχθεί συνέργεια.

Οι κεφαλοσπορίνες χαρακτηρίζονται από ασθενή δράση έναντι των Εντερόκοκκων. Εξαιρέσεις αποτελούν η κεφτριαξόνη και η κεφοταξίμη οι οποίες παρουσιάζουν συνέργεια με τις αμινοπενικιλίνες [152]. Οι νεότερες κεφαλοσπορίνες κεφτομπιπρόλη και κεφταρολίνη είναι δραστικές έναντι στελεχών *E. faecalis* [153, 154] αλλά όχι έναντι στελεχών *E. faecium*. Το φάσμα της κεφτομπιπρόλης περιλαμβάνει στελέχη *E. faecalis* ανθεκτικά στη βανκομυκίνη και στελέχη που παράγουν β-λακταμάσες, ενώ παρουσιάζει συνέργεια με τις αμινογλυκοσίδες [153].

10.2. Συνέργεια αντιβιοτικών και ενδείξεις

Ως συνέργεια ορίζεται η συγχορήγηση δύο αντιβιοτικών που έχει σαν αποτέλεσμα δράση μεγαλύτερη από την αθροιστική δράση των δύο αντιβιοτικών χωριστά. Πιο συγκεκριμένα στους Εντερόκοκκους, *in vitro* συνέργεια ορίζεται ως αύξηση της βακτηριοκτόνου δράσης ίση ή μεγαλύτερη από το διπλάσιο του δεκαδικού λογάριθμου ($2 \times \log_{10}$) της βακτηριοκτόνου δράσης του β-λακταμικού αντιβιοτικού ή γλυκοπεπτιδίου χωριστά στις 24 ώρες [155], η οποία και επιτυγχάνει 99.9% μείωση του αρχικού μικροβιακού ενοφθαλμίσματος. Στην πράξη η προσθήκη αμινογλυκοσίδης στην πενικιλίνη ή βανκομυκίνη προσδίδει βακτηριοκτόνο δράση στο θεραπευτικό σχήμα έναντι μικροβιοστατικής δράσης για το κάθε αντιβιοτικό όταν χορηγείται ως μονοθεραπεία.

Ο μηχανισμός δράσης της συνέργειας δεν έχει τελείως αποσαφηνιστεί. Το τοίχωμα των Εντερόκοκκων είναι σχετικά αδιαπέραστο από τις αμινογλυκοσίδες με αποτέλεσμα την ανεπαρκή ενδοκυττάρια συγκέντρωσή τους. Η ταυτόχρονη χορήγηση ενός αντιβιοτικού που δρα στο μικροβιακό τοίχωμα (στην προκειμένη περίπτωση ενός β-λακταμικού αντιβιοτικού) μαζί με αμινογλυκοσίδη έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση αμινογλυκοσίδης με συνέπεια τη βακτηριοκτόνο δράση [155, 156]. Η συνεργιστική δράση

αποδίδεται στη βλάβη που προκαλεί η πενικιλίνη ή η βανκομυκίνη στο κυτταρικό τοίχωμα με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαπερατότητα για τις αμινογλυκοσίδες και να επιτυγχάνονται υψηλότερες ενδοκυττάρειες συγκεντρώσεις [157]. Η ισχυρότερη αυτή δράση επιτυγχάνεται με χαμηλότερες δόσεις αμινογλυκοσιδών. Οι μόνες αμινογλυκοσίδες που ενδείκνυνται σε συνεργιστικό σχήμα με β-λακταμικά αντιβιοτικά ή γλυκοπεπτιδία είναι η γενταμυκίνη και η στρεπτομυκίνη [1, 147]. Ο συνδυασμός αμπικιλίνης ή πενικιλίνης με αμινογλυκοσίδες προτιμάται έναντι της βανκομυκίνης-αμινογλυκοσίδης, καθώς ο τελευταίος συνδυασμός χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά νεφροτοξικότητας.

Συνέργεια έναντι στελεχών *E. faecalis* επιτυγχάνεται επίσης με τη συγχορήγηση αμοξικιλίνης και κεφοταξίμης [158] αλλά με ένα διαφορετικό μηχανισμό. Χαμηλές δόσεις αμινοπενικιλινών (αμπικιλίνης και αμοξικιλίνης) προκαλούν κορεσμό των χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεϊνών δέσμευσης της πενικιλίνης-4 και -5 (PBP-4 και PBP-5) αλλά όχι των πρωτεϊνών δέσμευσης της πενικιλίνης-2 και -3 (PBP-2 και PBP-3). Η προσθήκη κεφοταξίμης ή κεφτριαξόνης προκαλεί πλήρη κορεσμό των πρωτεϊνών δέσμευσης της πενικιλίνης-2 και -3 με αποτέλεσμα συνεργιστική δράση [158]. Σε μία προοπτική μη τυχαιοποιημένη μελέτη, σε ασθενείς με ενδοκαρδίτιδα από στελέχη *E. faecalis*, θεραπεία με αμπικιλίνη 2 g κάθε 4 ώρες και κεφτριαξόνη 2 g κάθε 12 ώρες για 6 εβδομάδες ήταν εξίσου αποτελεσματική με θεραπεία με αμπικιλίνη σε συνδυασμό με γενταμυκίνη 3 mg/kg/ημέρα [152, 159]. Ωστόσο διακοπή της θεραπευτικής αγωγής λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών ήταν πιά συχνή σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με αμπικιλίνη και γενταμυκίνη, κυρίως λόγω νεφρικής ανεπάρκειας. Δεν είναι σαφές αν ο συνδυασμός αυτός υπερέχει της θεραπείας με υψηλή δόση αμπικιλίνης. Ο συνδυασμός αυτός δεν παρουσιάζει συνεργιστική δράση σε κλινικά στελέχη *E. faecium* [158].

Η συνεργιστική δράση αμπικιλίνης σε συνδυασμό με arbekacin, μία υπό μελέτη αμινογλυκοσίδα ανθεκτική στη δράση του ένζυμου *Aac(6')-Ie-Aph(2'')*-Ia, είναι τεκμηριωμένη σε πειραματικά μοντέλα ενδοκαρδίτιδας [160]. Ο συνδυασμός αμπικιλίνης, ιμιπενέμης και βανκομυκίνης έχουν επιτυχώς χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό στη θεραπεία ενδοκαρδίτιδας από *E. faecalis* με υψηλού βαθμού αντοχή στις αμινογλυκοσίδες [161, 162].

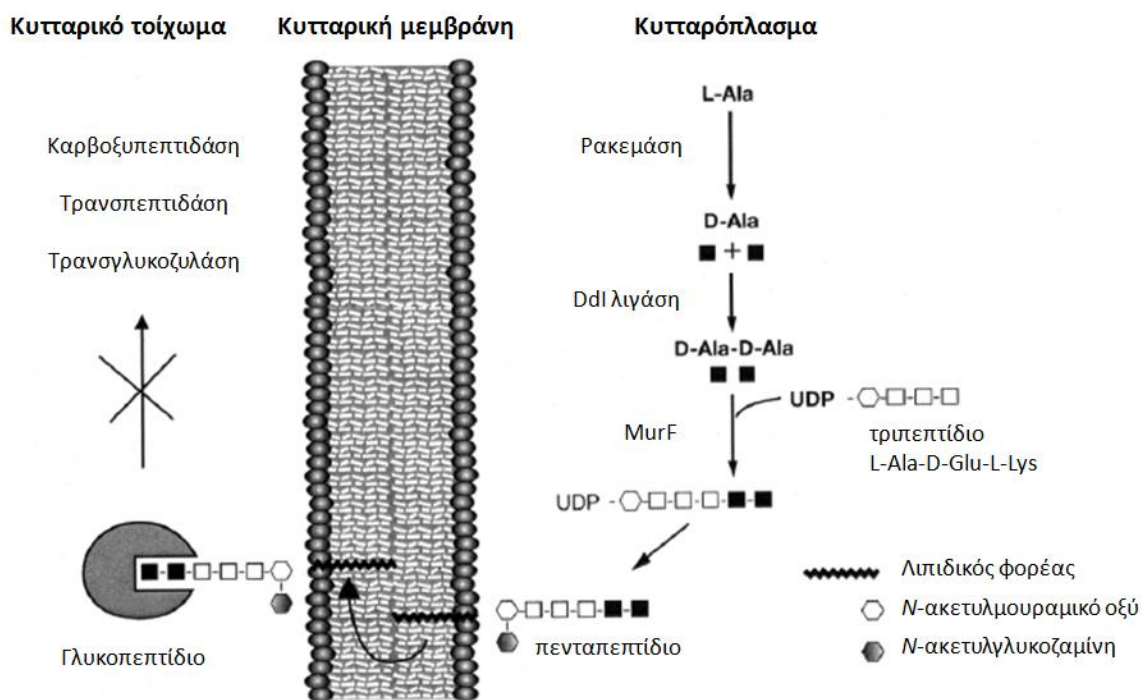
Συνέργεια αντιβιοτικών ενδείκνυται σε λοιμώξεις όπου είναι απαραίτητη βακτηριοκτόνος δράση. Τέτοιες λοιμώξεις χαρακτηρίζονται από σοβαρές επιπλοκές και υψηλή θνητότητα και περιλαμβάνουν την Εντεροκοκκική σηψαιμία, την ενδοκαρδίτιδα, ενδοαγγειακές λοιμώξεις ή λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος. Για παράδειγμα, μονοθεραπεία Εντεροκοκκικής ενδοκαρδίτιδας με πενικιλίνη χαρακτηρίζεται από 60% αποτυχία [1], ενώ η προσθήκη στρεπτομυκίνης (ή άλλης αμινογλυκοσίδης) αυξάνει τα ποσοστά ίασης σε 88% [163, 164].

10.3. Θεραπεία ανθεκτικών στελεχών

10.3.1. Θεραπεία λοιμώξεων από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στην πενικιλίνη και αμπικιλίνη

Η θεραπεία λοιμώξεων από ανθεκτικά στελέχη συνοδεύεται από υψηλά ποσοστά αποτυχίας. Υψηλού βαθμού αντοχή στην αμπικιλίνη ή πενικιλίνη ορίζεται ως ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα ίση ή μεγαλύτερη από 16 mcg/mL (MIC \geq 16 mcg/mL) [121]. Ο μηχανισμός αντοχής περιλαμβάνει τη δομική μεταβολή της πρωτεΐνης δέσμευσης της πενικιλίνης είτε σπανιότερα την παραγωγή β -λακταμασών. Στις σπανιότερες περιπτώσεις όπου ο μηχανισμός αντοχής περιλαμβάνει την παραγωγή β -λακταμασών αντιβιοτικό επιλογής είναι η αμπικιλίνη-σουλμπακτάμη [165]. Ειδάλλως, για τη θεραπεία λοιμώξεων από στελέχη ανθεκτικά στην αμπικιλίνη ή σε ασθενείς αλλεργικούς στην πενικιλίνη χρησιμοποιείται η βανκομυκίνη (30 mg/kg ημερησίως κάθε 12 ώρες). Η βανκομυκίνη αναστέλλει το τελευταίο στάδιο σύνθεσης των πεπτιδογλυκανών του κυτταρικού τοιχώματος, το οποίο περιλαμβάνει την τρανσγλυκοζυλίωση των πενταπεπτιδικών μονάδων [132] (Εικόνα 7).

Εικόνα 7. Βιοσύνθεση πεπτιδογλυκανών και μηχανισμός δράσης βανκομυκίνης



(από Courvalin P. *Clin Infect Dis.* 2006;42:S25-34, [166])

Υψηλή δόση αμπικιλίνης μπορεί να επιτύχει συγκεντρώσεις στο πλάσμα που κυμαίνονται μεταξύ 100-150 µg/mL. Για Εντεροκοκκικά στελέχη με ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα για την αμπικιλίνη ≤ 64 µg/mL έχει κατά συνέπεια προταθεί η θεραπεία με υψηλή δόση αμπικιλίνης και συγκεκριμένα 18-30 gm/ημέρα είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με μία αμινογλυκοσίδη [143]. Ωστόσο, η ασφάλεια της αμπικιλίνης σε αυτή τη δόση δεν έχει τεκμηριωθεί.

10.3.2. Θεραπεία λοιμώξεων από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη

Για τα ανθεκτικά στη βανκομυκίνη στελέχη χρησιμοποιούνται μία σειρά αντιβιοτικών ενώ η έρευνα και ανάπτυξη νέων είναι συνεχής. Η λινεζολίδη (Linezolid, Zyvox[®]) είναι μία συνθετική οξαζολιδίνη με βακτηριοστατική δράση έναντι των ανθεκτικών Εντερόκοκκων. *In vivo* η λινεζολίδη αλληλεπιδρά με τα ριβοσώματα παρεμβαίνοντας στη λειτουργία των αμινοακυλο-tRNAs (aminoacyl-tRNA) [167]. Κλινικές μελέτες έχουν τεκμηριώσει την αποτελεσματικότητα της λινεζολίδης για τη θεραπεία Εντερόκοκκου ανθεκτικού στη βανκομυκίνη [168] εκτός από περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας.

Η στρεπτογραμίνη κινोπριστίνη-δαλφοπριστίνη (Quinupristin-dalfopristin, Synercid[®]) είναι συνδυασμός δύο αντιβιοτικών (μίγμα 70: 30 αντίστοιχα) με δράση μόνο έναντι των *E. faecium* συμπεριλαμβανόμενων και ανθεκτικών στη βανκομυκίνη στελεχών [169]. Αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση δρώντας στα ριβοσώματα όπου διακόπτουν την επιμήκυνση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων [170]. Η αποτελεσματικότητα της κινοπριστίνης-δαλφοπριστίνης έχει διερευνηθεί σε δύο προοπτικές μη συγκριτικές μελέτες [171, 172]. Μέχρι τώρα μόνο η λινεζολίδη και η κινοπριστίνη-δαλφοπριστίνη έχουν έγκριση από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA) για τη θεραπεία λοιμώξεων από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη.

Η δαπτομυκίνη (Daptomycin, Cubicin[®]), ένα κυκλικό λιποπεπτιδικό αντιβιοτικό, παρουσιάζει βακτηριοκτόνο δράση έναντι των Εντερόκοκκων *in vitro*, η οποία εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους [173, 174]. Ο μηχανισμός δράσης της δαπτομυκίνης δεν έχει τελείως διεκρινιστεί, αλλά φαίνεται ότι μεταβάλλει το διαμεμβρανικό δυναμικό με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο [175]. Η δαπτομυκίνη έχει εγκριθεί για λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων από *E. faecalis* από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) αλλά δεν έχει έγκριση για θεραπεία ειδών *E. faecium* συμπεριλαμβανόμενων και των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη Εντερόκοκκων.

Η τιγκεκυκλίνη (Tigecycline, Tygacil®) ένα παράγωγο της μινοκυκλίνης, χαρακτηρίζεται από ελάχιστες ανασταλτικές πυκνότητες (MIC₉₀) έναντι του ανθεκτικού στη βανκομυκίνη Εντερόκοκκου που κυμαίνονται μεταξύ 0.13 και 0.5 mg/L [176]. Ενώ έχει ένδειξη για τη θεραπεία ευαίσθητου *E. faecalis*, δεν έχει έγκριση από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για είδη *E. faecium* ή για στελέχη ανθεκτικού στη βανκομυκίνη Εντερόκοκκου.

Το νεώτερο ημισυνθετικό γλυκοπεπτιδίο oritavancin, χαρακτηρίζεται από βακτηριοκτόνο δράση έναντι στελεχών Εντερόκοκκων ευαίσθητων αλλά και ανθεκτικών στη βανκομυκίνη [177]. Ο μηχανισμός δράσης της oritavancin εκτός από αναστολή σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος στο διπεπτιδικό υπόλειμμα των πεπτιδογλυκανικών προδρόμων, προκαλεί και εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης [178]. Η oritavancin βρίσκεται σε στάδιο κλινικής αξιολόγησης.

Η dalbavancin είναι ένα νεώτερο γλυκοπεπτιδίο με δράση έναντι Εντερόκοκκων που φέρουν τα συμπλέγματα γονιδίων VanB και VanC αλλά όχι *E. faecium* που φέρουν σύμπλεγμα γονιδίων VanA [179, 180]. Τέλος, η telavancin είναι ένα ημισυνθετικό γλυκοπεπτιδίο που έχει ασθενή δράση έναντι των ανθεκτικών στα γλυκοπεπτιδία Εντεροκοκκικών στελεχών [181].

11. ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Οι Εντεροκοκκικές λοιμώξεις χαρακτηρίζονται από σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα [4, 5, 7, 8, 11]. Σε μία μελέτη ασθενών-μαρτύρων η θνητότητα από Εντεροκοκκική βακτηριαιμία νοσοκομειακής προέλευσης προσδιορίστηκε στο 31% [182]. Η μελέτη δεν περιελάμβανε στελέχη ανθεκτικά στη βανκομυκίνη. Λοιμώξεις από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη έχουν δυσμενέστερη πρόγνωση από λοιμώξεις με ευαίσθητα στη βανκομυκίνη στελέχη. Το συμπέρασμα μίας συστηματικής ανασκόπησης και μετα-ανάλυσης 13 δημοσιεύσεων ήταν ότι η βακτηριαιμία από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη χαρακτηρίζεται από 2,6 φορές αύξηση στην ολική θνητότητα (crude mortality) και 1,8 φορές αύξηση στην αποδιδόμενη θνητότητα (attributable mortality) σε σύγκριση με ευαίσθητα στελέχη [6]. Ωστόσο σε κάποιες μελέτες διαπιστώθηκαν ανεπαρκή δείγματα και συχνά ανεπαρκής προσαρμογή του μοντέλου σε αρνητικούς προγνωστικούς παράγοντες. Σε μία αναδρομική μελέτη σε ουδετεροπενικούς ασθενείς με εντεροκοκκική βακτηριαιμία, η αντοχή στη βανκομυκίνη συνοδευόταν από αυξημένη θνητότητα σε σύγκριση με βακτηριαιμία από ευαίσθητα στελέχη (κλάσμα λόγου πιθανοτήτων - odds ratio [OR]:2.5; διάστημα εμπιστοσύνης - confidence interval [CI]: 1.9-3.4) [4]. Η μελέτη αναφέρεται σε χρονική περίοδο πριν την ευρεία χρήση λινεζολίδης και κινοπριστίνης-

δαλφοπριστίνης. Αντίστοιχα ήταν και τα ευρήματα μίας παλαιότερης μελέτης σε λήπτες μεταμόσχευσης ήπατος [7].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Α΄

Μοριακή επιδημιολογία αποικισμού και βακτηριαμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πριν την εμφάνιση ανθεκτικών στη βανκομυκίνη στελεχών Εντεροκοκκικές λοιμώξεις προκαλούνταν συχνότερα από είδη *Enterococcus faecalis*. Μετά την περιγραφή λοιμώξεων από στελέχη ανθεκτικά στη βανκομυκίνη [23, 24] ο *Enterococcus faecium* αναδείχθηκε σε σημαντικότατο νοσοκομειακό παθογόνο και έχει επικρατήσει έναντι ειδών *faecalis* σε συχνότητα [3, 39]. Οι ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες αντιπροσωπεύουν ομάδα υψηλού κινδύνου για αποικισμό και λοίμωξη [9] από ανθεκτικό Εντερόκοκκο, και οι λοιμώξεις αυτές συνοδεύονται από σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα [4, 5].

Σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία, στο Roswell Park Cancer Institute, αποικισμός από ανθεκτικό στη βανκομυκίνη Εντερόκοκκο παρατηρείται κατά κύριο λόγο σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες και λήπτες μεταμόσχευσης αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων. Σε αντίθεση ωστόσο με μελέτες που υποστηρίζουν την αποτελεσματικότητα των εντατικών μέτρων ελέγχου λοιμώξεων για την πρόληψη αποικισμού από ανθεκτικά στελέχη, δεν υπήρξε όφελος από το συστηματικό προληπτικό έλεγχο κοπράνων σε συνδυασμό με αυστηρή απομόνωση επαφής αποικισμένων ασθενών. Κατά την έναρξη εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής, πραγματοποιήθηκε μία εκτενής βιβλιογραφική ανασκόπηση από την οποία διαπιστώθηκε μικρός αριθμός δημοσιεύσεων σχετικά με την επιδημιολογία του ανθεκτικού στη βανκομυκίνη Εντερόκοκκου σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες [9]. Ακόμη πιο περιορισμένη ήταν η βιβλιογραφία της μοριακής επιδημιολογίας στον πληθυσμό αυτό [183-186].

Με στόχο τον έλεγχο της μετάδοσης ανθεκτικών στελεχών, αρχικά μελετήθηκε η μοριακή επιδημιολογία του αποικισμού και της βακτηριαμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη. Σκοπός της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της κλωνικότητας ή του σποραδικού χαρακτήρα της επιδημίας. Κλωνικότητα υποδηλώνει κοινή προέλευση και αντιμετωπίζεται είτε με την εξάλειψη της πηγής ή με την αυστηρότερη τήρηση των κανόνων πρόληψης λοιμώξεων και στη συγκεκριμένη περίπτωση της απομόνωσης επαφής. Αντίθετα σποραδικά κρούσματα αντιμετωπίζονται είτε με τη μεταβολή τροποποιήσιμων παραγόντων κινδύνου, ή αν αυτό δεν είναι εφικτό, με εμπειρική κάλυψη εμπύρετων επεισοδίων σε ασθενείς υψηλού κινδύνου. Η μελέτη της μοριακής επιδημιολογίας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε

παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulse field gel electrophoresis, PFGE) σε στελέχη που απομονώθηκαν από περιοριστικές καλλιέργειες και από το αίμα ασθενών και παρατίθεται στο πρώτο μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΣΕ ΠΑΛΛΟΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ

Το γενετικό υλικό του κάθε κυττάρου είναι μοναδικό για το κύτταρο αυτό και τον κλώνο του. Κατά συνέπεια η ανίχνευση και σύγκριση της θέσης και του αριθμού επιλεγμένων χρωμοσωμικών αλληλουχιών αποτελεί ιδεώδη μέσο για την τυποποίηση των μικροβιακών στελεχών, τον προσδιορισμό της γενετικής τους συγγένειας, και την αξιολόγηση της κλωνικότητας ή τη σποραδική φύση μίας επιδημικής έξαρσης. Μία από τις πιο αξιόπιστες και αναπαραγώγιμες μεθόδους για τη μοριακή τυποποίηση μικροβιακών στελεχών είναι η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulse Field Gel Electrophoresis, PFGE) [187-190]. Τα βασικά στάδια της μεθόδου περιλαμβάνουν την πέψη του μικροβιακού χρωμοσώματος με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών και ακολούθως την ηλεκτροφόρησή τους σε γέλη αгарόζης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο.

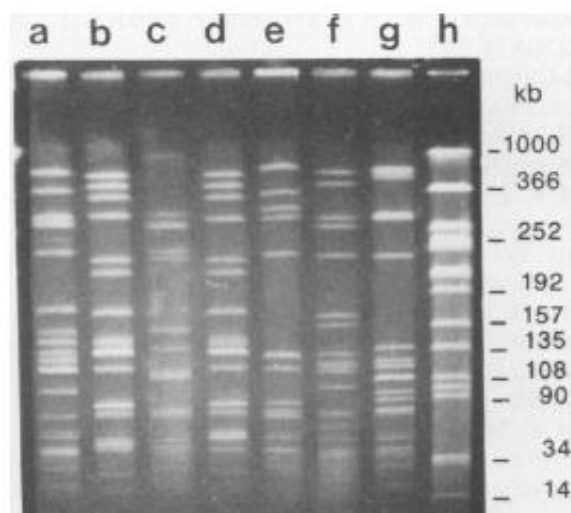
2.1. Περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Η πέψη του μικροβιακού DNA πραγματοποιείται με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών, ενζύμων που αναγνωρίζουν και τέμνουν συγκεκριμένες αλληλουχίες στο DNA [191]. Οι αλληλουχίες αυτές ονομάζονται αλληλουχίες αναγνώρισης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό θραυσμάτων DNA (DNA fragments) ποικίλων μεγεθών τα οποία μετά από ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης σχηματίζουν μία ποικιλία ηλεκτροφορητικών προτύπων (patterns). Τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα που προκύπτουν αποτελούνται από ζώνες (bands) ή τμήματα περιορισμού (restriction fragments) (Εικόνα 8) [192]. Οι διαστάσεις και η διάταξή τους εξαρτώνται από τη συχνότητα των αλληλουχιών που τέμνουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες και από τη θέση των αλληλουχιών αυτών στο χρωμοσωμικό DNA, και συνιστούν το γενετικό αποτύπωμα (genetic fingerprint) του συγκεκριμένου στελέχους. Οι διαφορές μεταξύ των ηλεκτροφορημάτων αναφέρονται ως πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP).

Σε αντίθεση με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, οι κοινές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν και τέμνουν νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που επαναλαμβάνονται συχνά στο μικροβιακό χρωμόσωμα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλου αριθμού

θραυσμάτων των οποίων η σύγκριση είναι δυσχερής. Αντιθέτως, οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν σπάνιες αλληλουχίες και παράγουν ένα μικρότερο αριθμό θραυσμάτων διευκολύνοντας έτσι τη σύγκριση των ηλεκτροφορητικών προτύπων. Αναγνωρίζουν συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, συνήθως 4 - 8 ζεύγη βάσεων, τέμνουν και τις δύο έλικες του DNA, και παράγουν μεταξύ 10 και 20 - 30 θραύσματα (Πίνακας 5) [191].

Εικόνα 8. Ηλεκτροφορητικά πρότυπα στελεχών Εντερόκοκκου μετά από πέψη με περιοριστικό ένζυμο *Sma*-I [192].



Πίνακας 5. Παραδείγματα περιοριστικών ενδονουκλεασών για Gram θετικά βακτήρια.

Παθογόνος Οργανισμός	Περιοριστικό ένζυμο	Αριθμός θραυσμάτων	Μέγεθος θραυσμάτων (kb)
<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Sma</i> I	15-20	5-400
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Sma</i> I	10-15	10-900
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Sac</i> II	10-15	10-900
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Sma</i> I	12	45-1460
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Sac</i> II	10	45-1460
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Sma</i> I	15-20	10-700
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Csp</i> I	10-15	30-500
<i>Staphylococcus</i> spp. (coagulase negative)	<i>Sma</i> I	15-20	5-400
<i>Streptococcus</i> spp. (group A & B)	<i>Sma</i> I	15-20	5-400
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Sma</i> I	10-19	20-300
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Ap</i> I	10-19	20-250

Η επιλογή του σωστού ενζύμου είναι καθοριστικής σημασίας για την απόδοση της ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE) και εξαρτάται από τη συχνότητα των αλληλουχιών αναγνώρισης στο χρωμοσωμικό DNA. Το γενετικό υλικό των Gram θετικών βακτηριδίων είναι πλούσιο σε αδενίνη (A, Adenine) και θυμίνη (T, Thymine). Κατά συνέπεια, ένζυμα που αναγνωρίζουν αλληλουχίες πλούσιες σε γουανίνη (G, Guanine) και κυτοσίνη (C, Cytosine) αναμένεται να παράγουν ένα μικρότερο αριθμό ζωνών που αντιστοιχούν σε θραύσματα μεγάλου μοριακού βάρους [193]. Παράδειγμα τέτοιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης είναι το ένζυμο *SmaI* που αναγνωρίζει την αλληλουχία CCCGGG και το οποίο χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα μελέτη (Εικόνα 9) [192]. Γένη *Enterococcus faecium* και *Enterococcus faecalis* περιέχουν βάσεις γουανίνης και κυτοσίνης σε ποσοστό 37-43% [21, 192].

Εικόνα 9. Παραδείγματα περιοριστικών ενδονουκλεασών και οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν.

Παραδείγματα περιοριστικών ενζύμων		
<i>SmaI</i>	Αναγνώριση αλληλουχίας:	5'CCCGGG 3' 3'GGGCCC 5'
	Σημείο τομής:	5'CCC GGG 3' 3'GGG CCC 5'
<i>EcoRI</i>	Αναγνώριση αλληλουχίας:	5'GAATTC 3' 3'CTTAAG 5'
	Σημείο τομής:	5'G AATTC 3' 3'CTTAA G 5'

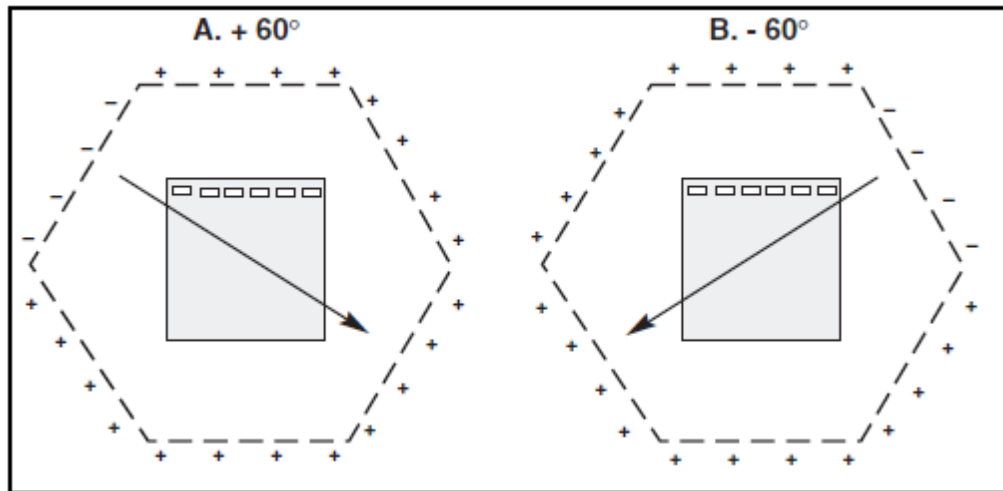
Τέλος, ως μία διεθνής μονάδα ενζύμου (IU) ορίζεται η ποσότητα που απαιτείται για να ολοκληρωθεί η πέψη 1μg DNA, σε προκαθορισμένο ρυθμιστικό διάλυμα, συνθήκες χρόνου και θερμοκρασία επώασης και τελικό όγκο δράσης 30 mL [191].

2.2. Ηλεκτροφόρηση σε Παλλόμενο Ηλεκτρικό πεδίο

Η ηλεκτροφόρηση σε πεδίο γέλης αгарόζης είναι μία τεχνική διαχωρισμού των θραυσμάτων DNA που έχουν παραχθεί με τη δράση των περιοριστικών ενδονουκλεασών. Ο διαχωρισμός των θραυσμάτων αυτών κατά την ηλεκτροφόρηση βασίζεται στο φαινόμενο ότι τα θραύσματα του DNA υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου κινούνται προς το θετικό πόλο. Αυτό οφείλεται στο αρνητικό τους φορτίο λόγω των φωσφορικών ομάδων που περιέχουν.

Αν και με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών παράγεται ένας μικρότερος αριθμός θραυσμάτων διευκολύνοντας τη σύγκρισή τους, τα θραύσματα αυτά έχουν μεγαλύτερο μέγεθος κάνοντας τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό τους δυσχερέστερο. Συγκεκριμένα, ενώ κατά τη συμβατική ηλεκτροφόρηση σε στατικό πεδίο μικρά θραύσματα DNA διαχωρίζονται επαρκώς, θραύσματα μεγέθους μεγαλύτερου από 40 - 50 kb κινούνται μαζί και με την ίδια ταχύτητα σχηματίζοντας μία και μοναδική ευρεία ζώνη. Έτσι, η σύγκρισή τους καθίσταται αδύνατη. Ο διαχωρισμός θραυσμάτων DNA μεγάλου μεγέθους επιτυγχάνεται με τη χρήση παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου [189]. Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να διαχωριστούν μόρια μεγαλύτερα από 1000 kb. Η τεχνική περιλαμβάνει περισσότερο από ένα ηλεκτρικά πεδία τα οποία ενεργοποιούνται διαδοχικά (Εικόνες 10 & 11). Τα πεδία είναι προσανατολισμένα έτσι ώστε η κατεύθυνση του δυναμικού τους να σχηματίζει γωνία 120° μεταξύ τους (Reorientation Angle). Περιοδική ενεργοποίηση των πεδίων αυτών συνεπάγεται συνεχή επαναπροσανατολισμό των θραυσμάτων του DNA [188]. Επιπλέον, η διάρκεια ενεργοποίησης του ηλεκτρικού πεδίου (Χρόνος εναλλαγής πεδίου, Switch Interval ή Pulse Time) αποτελεί μία ακόμα σημαντική μεταβλητή που μπορεί να τροποποιηθεί ανάλογα με τις ανάγκες της μεθόδου. Συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερο είναι το μόριο του DNA τόσο μεγαλύτερη είναι η διάρκεια ενεργοποίησης του ηλεκτρικού πεδίου που απαιτείται για τον επαναπροσανατολισμό του. Ηλεκτρικοί παλμοί μεγάλης διάρκειας επιτυγχάνουν τον επαναπροσανατολισμό μεγαλύτερων μορίων DNA και αντιστρόφως [194]. Προκειμένου να διαχωριστούν θραύσματα όλων των μεγεθών, ο χρόνος εναλλαγής πεδίου αυξάνεται σταδιακά (Ramping). Σε μοριακό επίπεδο, υπό την επίδραση των ηλεκτρικών παλμών τα μόρια του DNA επιμηκύνονται περιοδικά, ενώ η συνεχής εναλλαγή των ηλεκτρικών πεδίων προκαλεί τον ευθυγραμμισμό τους σε διαφορετική κατεύθυνση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το βαθμιαίο διαχωρισμό τους.

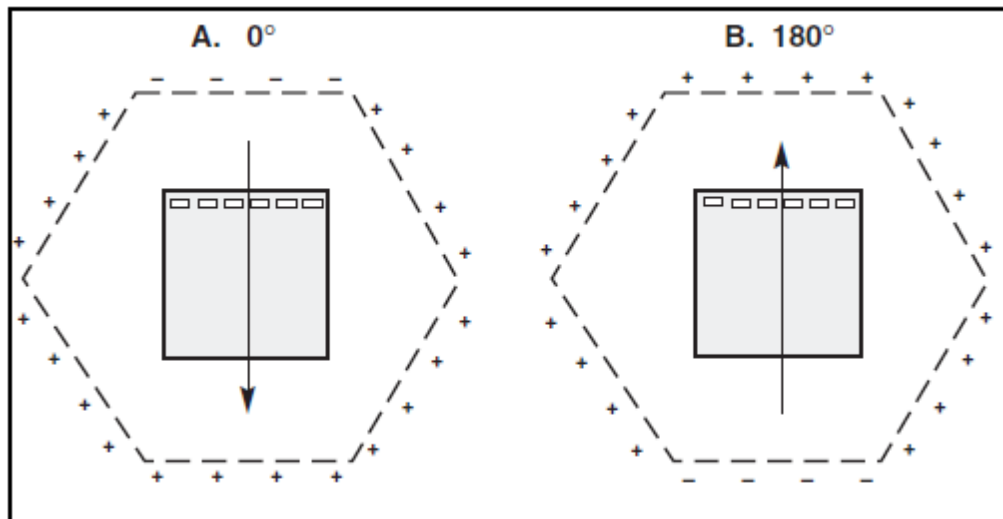
Εικόνα 10. Επαναπροσανατολισμός ηλεκτρικού πεδίου στο σύστημα CHEF Mapper.



Επαναπροσανατολισμός ηλεκτρικού πεδίου στο σύστημα CHEF Mapper (Bio-Rad, Hercules, Calif.):

- A. Κατεύθυνση ηλεκτρικού δυναμικού μετά από ενεργοποίηση πεδίου γωνίας $+60^\circ$.
- B. Κατεύθυνση ηλεκτρικού δυναμικού μετά από ενεργοποίηση πεδίου γωνίας -60° .

Εικόνα 11. Επαναπροσανατολισμός ηλεκτρικού πεδίου με το σύστημα CHEF Mapper.



Επαναπροσανατολισμός ηλεκτρικού πεδίου με το σύστημα CHEF Mapper (Bio-Rad, Hercules, Calif.):

- A. Κατεύθυνση ηλεκτρικού δυναμικού μετά από ενεργοποίηση πεδίου γωνίας 0° μοιρών.
- B. Κατεύθυνση ηλεκτρικού δυναμικού μετά από ενεργοποίηση πεδίου γωνίας 180° μοιρών.

Για την ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο χρησιμοποιείται η συσκευή ομοιογενούς περιμετρικού ηλεκτρικού πεδίου CHEF (contour-clamped homogeneous electric field apparatus) (Εικόνα 12) (Bio-Rad, Hercules, Calif.). Η συσκευή είναι σχεδιασμένη έτσι ώστε τα ηλεκτρικά πεδία να σχηματίζουν ένα εξάγωνο στο κέντρο του οποίου βρίσκεται η ηλεκτροφορητική δεξαμενή (chamber) όπου τοποθετείται το πήκτωμα. Στη διαμόρφωση αυτή τα πεδία σχηματίζουν μεταξύ τους γωνίες 60° και 120° μοιρών.

Εικόνα 12. Συσκευή ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο πεδίο CHEF Mapper (Bio-Rad, Hercules, Calif.)



2.3. Στάδια της μεθόδου

Τα στάδια της μεθόδου περιλαμβάνουν την ανακαλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους, το σχηματισμό διαλύματος αγαρόζης και τον ενοφθαλμισμό των μικροβιακών στελεχών σε πλάκα αγαρόζης, τη λύση του κυτταρικού τοιχώματος και εκχύλιση του DNA, την πέψη του DNA από την περιοριστική ενδονουκλεάση, την ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο, τη χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο, τη φωτογράφιση των ηλεκτροφορητικών προτύπων και την οπτική ανάλυση των αποτελεσμάτων ή την ανάλυση με τη χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή. Από τεχνικής πλευράς τα πιο κρίσιμα βήματα για την επιτυχία της μεθόδου είναι το στάδιο προετοιμασίας του DNA και οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης. Η ποιότητα του DNA καθορίζεται από την καθαρότητα των θραυσμάτων DNA και την επαρκή αρχική συγκέντρωσή τους ($1 - 5 \times 10^9$ CFU/ml). Όπως ήδη αναφέρθηκε εξαιρετικά σημαντική είναι η επιλογή κατάλληλου περιοριστικού ενζύμου.

2.4. Μεταβλητές

Μεταβλητές που έχουν προτυποποιηθεί περιλαμβάνουν τον τύπο και τη συγκέντρωση της αгарόζης (0.8 – 1.0%), το πάχος του πηκτώματος, το ηλεκτροφορητικό διάλυμα, τη γωνία μεταξύ των αξόνων των ηλεκτρικών πεδίων (Reorientation angle, 120°) και την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (6 V/cm). Μεταβλητές που καθορίζονται εμπειρικά περιλαμβάνουν το συνολικό χρόνο ηλεκτροφόρησης και το χρόνο εναλλαγής πεδίου (Pulse time, Switch interval). Ο καθορισμός τους εξαρτάται από το μέγεθος των τμημάτων περιορισμού του DNA που πρόκειται να διαχωριστούν. Θραύσματα μεγαλύτερου μεγέθους απαιτούν περισσότερο χρόνο για να διαχωριστούν.

2.5. Σύγκριση ηλεκτροφορητικών προτύπων και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Η αξιολόγηση των ηλεκτροφορητικών προτύπων και η μετατροπή τους σε επιδημιολογικά χρήσιμες πληροφορίες πραγματοποιείται με τη χρήση προκαθορισμένων κριτηρίων [195-197]. Ωστόσο, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων περιπλέκεται από το γεγονός ότι οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των χρωμοσωμάτων μεταβάλλονται διαρκώς σαν αποτέλεσμα γενετικών συμβάντων. Τέτοια γενετικά συμβάντα περιλαμβάνουν προσθήκη γονιδίων (Insertions), διαγραφή (Deletions), ανασυνδιασμό (Rearrangements) γονιδίων και μονο-νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις (Single-base substitutions) [198-200]. Κατά συνέπεια, ενώ στελέχη με ίδιους ηλεκτροφορητικούς τύπους είναι λογικό να προέρχονται από κοινό προγονικό στέλεχος, στελέχη με μικρές διαφορές δεν αποκλείεται να σχετίζονται επιδημιολογικά. Γίνεται αποδεκτό ότι στελέχη που διαφέρουν κατά ένα γενετικό συμβάν, με αρκετή βεβαιότητα (probably) σχετίζονται επιδημιολογικά (Πίνακας 6). Στελέχη που διαφέρουν ως προς δύο γενετικά συμβάντα, πιθανά (possibly) σχετίζονται επιδημιολογικά. Τέλος, στελέχη που διαφέρουν κατά τρία ή περισσότερα γενετικά συμβάντα δεν σχετίζονται επιδημιολογικά [195]. Κατά την οπτική ερμηνεία των ηλεκτροφορητικών προτύπων, σύμφωνα με τους Tenover et al. διαφορά 3 ζωνών προκαλείται από ένα γενετικό συμβάν. Διαφορά σε 4-6 τμήματα περιορισμού πιθανά αντιστοιχεί σε δύο γενετικά συμβάντα, ενώ διαφορές σε περισσότερα από 7 τμήματα περιορισμού αντιστοιχούν σε τρία γενετικά συμβάντα.

Πίνακας 6. Κριτήρια ερμηνείας Ηλεκτροφόρησης σε Παλλόμενο Ηλεκτρικό Πεδίο σύμφωνα με τους Tenover et al. [195].

Κατηγορία	Διαφορά αριθμού γενετικών συμβάντων*	Διαφορά αριθμού θραυσμάτων*	Επιδημιολογική ερμηνεία
Μή διακριτά (Indistinguishable)	0	0	Το στέλεχος είναι μέρος της επιδημίας
Στενά σχετιζόμενα (Closely related)	1	2-3	Το στέλεχος είναι μέρος της επιδημίας με αρκετή βεβαιότητα
Πιθανά σχετιζόμενα (Possibly related)	2	4-6	Το στέλεχος είναι πιθανά μέρος της επιδημίας
Διακριτά (Different)	≥ 3	≥ 7	Το στέλεχος δεν είναι μέρος της επιδημίας

* Σύγκριση στελέχους με το αντιπροσωπευτικό στέλεχος της επιδημίας.

Ταυτόσημα θεωρούνται τα στελέχη που παρουσιάζουν 100% ομοιότητα, ενώ κλωνικά τα στελέχη που παρουσιάζουν ομοιότητα ίση ή μεγαλύτερη από 80%.

Η σύγκριση των ηλεκτροφορητικών προτύπων και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται είτε με οπτική ανάλυση από το χειριστή είτε με τη χρήση λογισμικού όπως το BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), από ηλεκτρονικό υπολογιστή. Τα προγράμματα αυτά έχουν τη δυνατότητα να εξομαλύνουν (normalization) τις ηλεκτροφορητικές ζώνες, να ολοκληρώνουν τη μελέτη πολλών στελεχών σε σύντομο χρονικό διάστημα και να αποθηκεύουν τα πρότυπα αυτά σε βάσεις δεδομένων για μελλοντική χρήση. Φέρουν επίσης αλγόριθμους για τη φυλογενετική ανάλυση των στελεχών και το σχηματισμό δενδρογραμμάτων [201, 202].

Πρέπει να τονιστεί ότι οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες επιλέγουν και δρουν σε συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που είναι και οι λιγότερο συχνές. Έτσι, αν και αντιπροσωπεύεται το βακτηριακό χρωμόσωμα στο σύνολό του, η μέθοδος δεν περιλαμβάνει τη λεπτομερή ανάλυση του χρωμοσώματος. Επομένως, η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης δεν μπορεί να αποδείξει την πλήρη ομοιότητα δύο στελεχών. Κατά συνέπεια στελέχη που παρουσιάζουν τα ίδια ηλεκτροφορητικά πρότυπα είναι καταλληλότερο να χαρακτηρίζονται ως «μη διακριτά» (indistinguishable) παρά «όμοια» (identical).

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι συχνά οι επιδημιολογικές διερευνήσεις διενεργούνται χωρίς να είναι διαθέσιμο το αρχικό προγονικό στέλεχος. Επομένως, στελέχη ίδιων ή μεταγενέστερων γενεών συγκρίνονται μεταξύ τους παρά με το κοινό προγονικό στέλεχος δυσκολεύοντας την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Συμπερασματικά, η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο αντιπροσωπεύει τη μέθοδο επιλογής για επιδημιολογικές διερευνήσεις καθώς χαρακτηρίζεται από υψηλή διακριτική ικανότητα αλλά και αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων ακόμα και μετά από ανακαλλιέργεια των μικροβιακών στελεχών [203]. Άλλα πλεονεκτήματα είναι η δυνατότητα ευχερούς σύγκρισης των ζωνών DNA και η εκπροσώπηση όλης της έκτασης του βακτηριακού χρωμοσώματος. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνουν το χρονοβόρο χαρακτήρα της (που οφείλεται στο μεγαλύτερο μέγεθος θραυσμάτων DNA), την τεχνογνωσία και εμπειρία που απαιτείται και το υψηλό κόστος εξοπλισμού. Παρόλα αυτά η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο παραμένει η πρότυπη μέθοδος για τη μελέτη των επιδημικών εξάρσεων.

3. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η μελέτη περιέλαβε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες και ασθενείς που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων και εισήχθησαν στις αιματολογικές μονάδες του Roswell Park Cancer Institute (RPCI). Το Roswell Park Cancer Institute είναι ένα εξειδικευμένο αντικαρκινικό ινστιτούτο τριτογενούς περίθαλψης μεγέθους 120 κλινών, στο Buffalo της πολιτείας της Νέας Υόρκης. Οι αιματολογικές μονάδες περιλαμβάνουν τις μονάδες λευχαιμίας, λεμφωμάτων και μεταμόσχευσης μυελού των οστών. Κατά τη χρονική διάρκεια πραγματοποίησης της μελέτης οι αιματολογικές κλινικές περιελάμβαναν δύο πτέρυγες, με 14 μονόκλινα δωμάτια η κάθε μία. Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την αρμόδια Επιστημονική Επιτροπή και Επιτροπή Δεοντολογίας του νοσοκομείου.

3.1. Κανονισμός πρόληψης λοιμώξεων

Σύμφωνα με τον κανονισμό πρόληψης λοιμώξεων του Roswell Park Cancer Institute, όλοι οι ασθενείς που εισάγονταν στις αιματολογικές μονάδες υποβάλλονταν σε συστηματική εβδομαδιαία περιοριστική καλλιέργεια για την ανίχνευση Εντερόκοκκου ανθεκτικού στη βανκομυκίνη. Τα δείγματα συλλέγονταν με βαμβακοφόρο στείλο από την περιοριστική χώρα είτε σπανιότερα από πρόσφατα κόπρανα. Τα δείγματα συλλέγονταν κάθε Δευτέρα ανεξάρτητα από την ημέρα εισαγωγής. Εάν η καλλιέργεια ήταν θετική για Εντερόκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη, οι ασθενείς τοποθετούνταν σε προληπτική απομόνωση επαφής για το υπόλοιπο της παραμονής τους στο νοσοκομείο και για όλες τις μελλοντικές εισαγωγές, κανονισμός σύμφωνος με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Εταιρείας Νοσοκομειακής Επιδημιολογίας της Αμερικής (Society of Hospital Epidemiology of America, SHEA) [10]. Όλα τα στελέχη Εντερόκοκκου ανθεκτικού στη βανκομυκίνη που απομονώνονταν από δείγματα κοπράνων και αίματος αποθηκεύονταν σε ζωμό σόγιας trypticase με γλυκερίνη στους -70° F στο εργαστήριο κλινικής μικροβιολογίας του Roswell Park Cancer Institute.

3.2. Μέθοδοι καλλιέργειας για απομόνωση Εντερόκοκκου ανθεκτικού στη βανκομυκίνη

Όλα τα δείγματα που συλλέγονταν από τις περιοριστικές καλλιέργειες επιδημιολογικής εποπτείας (surveillance) καλλιεργούνταν σε phenylethyl alcohol (PEA) άγαρ, ένα θρεπτικό υλικό εκλεκτικό για την απομόνωση των Gram θετικών βακτηρίων. Τα τρυβλία επωάζονταν στους 37° C και εξετάζονταν 24 και 48 ώρες αργότερα. Στη συνέχεια, αποικίες Gram θετικών βακτηρίων εξετάζονταν με τη δοκιμή υδρόλυσης της pyrgrolidonylarylamidase (PYR) για την ανίχνευση Εντεροκοκκικών ειδών. Περαιτέρω ταυτοποίηση και προσδιορισμός ευαισθησίας στα αντιβιοτικά πραγματοποιούνταν μόνο σε στελέχη από καλλιέργειες αίματος χρησιμοποιώντας το

αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK και το επιλεκτικό άγαρ βανκομυκίνης (Vancomycin screen agar; BBL™, Becton Dickinson, με 6.0 µg/mL βανκομυκίνης).

3.3. Ορισμοί

Υποτροπιάζον επεισόδιο βακτηριαιμίας από γενετικά συγγενή (κλωνικά) στελέχη ορίστηκε το επεισόδιο που προέρχεται από τον ίδιο ασθενή και του οποίου η καλλιέργεια αίματος απέχει χρονικά τουλάχιστον 14 ημέρες από την έναρξη του πιο πρόσφατου επεισοδίου και τουλάχιστον 4 ημέρες μετά την ολοκλήρωση της ενδεικνυόμενης αντιβιοτικής αγωγής. Για τη διάκριση επεισοδίων βακτηριαιμίας από γενετικά μη σχετιζόμενα στελέχη στον ίδιο ασθενή, χρησιμοποιήθηκε ο ηλεκτροφορητικός τύπος και το όριο ομοιότητας λιγότερο από <80%, ανεξάρτητα από το χρόνο επέλευσης της βακτηριαιμίας.

3.4. Μοριακή τυποποίηση

Στη μελέτη της μοριακής επιδημιολογίας συμπεριελήφθησαν στελέχη ανθεκτικού στη βανκομυκίνη *Εντερόκοκκου faecium* που απομονώθηκαν από περιοριστικές καλλιέργειες και καλλιέργειες αίματος από τον Ιανουάριο έως το Δεκέμβριο του 2004 στην πτέρυγα του αιματολογικού τμήματος. Η μελέτη της μοριακής επιδημιολογίας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulse field gel electrophoresis, PFGE).

3.5. Πρωτόκολλο Ηλεκτροφόρησης σε Παλλόμενο Ηλεκτρικό Πεδίο

3.5.1. Προετοιμασία δειγμάτων:

Μετά από απόψυξη τα στελέχη ανακαλλιεργήθηκαν σε Brain Heart Infusion άγαρ (άγαρ έγχυσης εγκεφάλου-καρδιάς) και επωάστηκαν στους 37°C για 16-18 ώρες. Στη συνέχεια μία μικροβιακή αποικία από κάθε καλλιέργεια ενοφθαλμίστηκε σε 5 ml BHI και το διάλυμα τοποθετήθηκε σε αναδευόμενο επωαστήρα στους 37°C για 18-20 ώρες με συχνότητα ανάδευσης 250 rpm.

3.5.2. Προετοιμασία δίσκων αгарόζης και βακτηριδιακού DNA:

Η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE) πραγματοποιήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο του Veterans Affairs Medical Center στο Buffalo της Νέας Υόρκης. Η κύρια μεθοδολογία είναι παρόμοια με αυτή του McDougal et al. [204]. Η βακτηριακή πυκνότητα του εναιωρήματος προσαρμόστηκε σε οπτική πυκνότητα (optical density, OD) 1.0 σε 610 nm με τη χρήση φυσιολογικού ορού. Στη συνέχεια, 200 µl του εναιωρήματος αυτού υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση σε 12.000 g για 4 λεπτά. Ακολούθησε η αναρρόφηση του υπερκείμενου και η επαναδιάλυση του ιζήματος σε 300 µl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-EDTA (TE buffer), (10 mM

Tris HCL, 1 mM EDTA [pH 8]). Το διάλυμα που προέκυψε τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 37° C για 10 λεπτά. Στο κυτταρικό εναιώρημα προστέθηκαν 3 µl ανασυνδυασμένου διαλύματος lysostaphin πυκνότητας 1 mg/ml (L-0761, Sigma, St. Louis, Mo.) και 300 µl 1,8% (wt/vol) SeaKem Gold αγαρόζης (FMC, Rockland, Maine) σε ρυθμιστικό διάλυμα TE (TE buffer) και το εναιώρημα τοποθετήθηκε σε εκμαγείο για τη δημιουργία πηκτωμάτων αγαρόζης. Στη συνέχεια τα πηκτώματα αφέθηκαν να στερεοποιηθούν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 – 15 λεπτά.

Οι δίσκοι αγαρόζης που παρασκευάστηκαν υποβλήθηκαν σε λύση με EC lysis buffer (ρυθμιστικό διάλυμα λύσης) (6 mM HCl Tris [pH 7.5], 1 M NaCl, 100 mM EDTA [pH 8], 0,5% Brij-58, 0,2% δεοξυχολικό νάτριο, 0,5% άλατος νάτριου Lauroylsarcosine) και επωάστηκαν στους 37° C επί τουλάχιστον 4 ώρες. Ακολούθως απομακρύνθηκε το λυτικό διάλυμα EC και ακολούθησε πλύσιμο με 4 ml διαλύματος TE. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές και οι δίσκοι αποθηκεύτηκαν στους 4° C.

3.5.3. Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση και ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο:

Αφού οι δίσκοι αγαρόζης κόπηκαν στο κατάλληλο μέγεθος, προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα για εξισορρόπηση του pH. Μετά από αφαίρεση του ρυθμιστικού διαλύματος οι δίσκοι υποβλήθηκαν σε πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση *SmaI* (Promega no. R6125, 10 U/µl, Promega Corp., Madison, Wis.). Η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE) πραγματοποιήθηκε σε 1% SeaKem πήγμα αγαρόζης σε 0,5% ρυθμιστικό διάλυμα TBE. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο στέλεχος *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 στην πρώτη, έβδομη, δέκατη τέταρτη και εικοστή θέση. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή ομοιογενούς περιμετρικού ηλεκτρικού πεδίου (contour-clamped homogeneous electric field apparatus), CHEF Mapper (Bio-Rad, Hercules, Calif.) (Εικόνα 12). Το πρόγραμμα και οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης περιελάμβαναν αρχικό χρόνο εναλλαγής πεδίου 5 sec, τελικό χρόνο 40 sec, συνολικό χρόνος 21 h, τάση 200 V (6 V/cm) σε θερμοκρασία 14° C. Ακολούθησε χρώση του πηκτώματος με 1.5 µg/ml διαλύματος βρωμιούχου αιθίδιου για 20 λεπτά και πλύσιμο με αποσταγμένο νερό για 45 λεπτά.

3.5.4. Ανάλυση και ερμηνεία ηλεκτροφορητικών προτύπων:

Η ανάλυση των ηλεκτροφορητικών προτύπων, η σύγκρισή τους και η δημιουργία δενδρογραμμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση λογισμικού Bionumerics (version 5.1, Kortrijk, Belgium). Τα ποσοστά ομοιότητας που αναγνωρίστηκαν στα δενδρογράμματα καθορίστηκαν με τη Μέθοδο Ομαδοποίησης Αστάθμιστων Ζευγών με Αριθμητικούς Μέσους Όρους (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages, UPGMA) χρησιμοποιώντας

το συντελεστή Dice (Dice coefficient). Τιμή συντελεστή ομοιότητας ίση ή μεγαλύτερη του 80% χρησιμοποιήθηκε για να οριστεί η γενετική συγγένεια των ηλεκτροφορητικών προτύπων [204]. Ο όρος «ταυτόσημα» στελέχη αναφέρεται στα στελέχη εκείνα που χαρακτηρίζονται από ηλεκτροφορητική ομοιότητα 100%, ενώ ο όρος «γενετικά συγγενή» στελέχη αναφέρεται στα στελέχη εκείνα που παρουσιάζουν ομοιότητα ίση ή μεγαλύτερη του 80%. Με τον όρο «κλωνικά στελέχη» περιγράφονται είτε τα γενετικά συγγενή (80-99% ομοιότητα) είτε τα ταυτόσημα στελέχη (ομοιότητα 100%). Τέλος, «γενετικά ποικίλα» είναι τα στελέχη που παρουσιάζουν ομοιότητα μικρότερη από 80% στα ηλεκτροφορητικά τους πρότυπα, στοιχείο που υποδηλώνει ότι προέρχονται από διαφορετικά προγονικά στελέχη. Η ανάδειξη γενετικής ποικιλίας μεταξύ των στελεχών υποστηρίζει το σποραδικό χαρακτήρα της επιδημίας, ενώ η ανεύρεση γενετικά συγγενών ή ταυτόσημων στελεχών την κλωνική φύση της επιδημίας.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Από τον Ιανουάριο έως το Δεκέμβριο 2004, 21 ασθενείς αποικίστηκαν από *Enterococcus faecium* ανθεκτικό στη βανκομυκίνη στις πτέρυγες του αιματολογικού τμήματος όπως προέκυψε από τη θετικοποίηση των περιοριστικών καλλιεργείων. Από τους 21 ασθενείς που αποικίστηκαν, 15 στελέχη περιοριστικών καλλιεργείων από 14 ασθενείς υποβλήθηκαν σε γονοτυπική ανάλυση. Το ίδιο χρονικό διάστημα 14 ασθενείς ανέπτυξαν 18 επεισόδια βακτηριαιμίας. Οι ασθενείς αυτοί περιλαμβάνουν 5 ασθενείς που αποικίστηκαν το έτος 2004 και 9 αποικισθέντες σε προηγούμενα έτη. Συνολικά 27 στελέχη από καλλιέργειες αίματος υποβλήθηκαν σε ανάλυση. Σε 5 ασθενείς υπήρχαν διαθέσιμα στελέχη από περιοριστικές καλλιέργειες και καλλιέργειες αίματος προερχόμενα από τον ίδιο ασθενή. Ένας ασθενής (ασθενής # 5) ανέπτυξε 5 επεισόδια υποτροπιάζουσας βακτηριαιμίας κατά τη διάρκεια μίας χρονικής περιόδου 5,5 μηνών. Τέλος, σε 5 ασθενείς απομονώθηκαν περισσότερα από ένα στελέχη κατά τη διάρκεια του ίδιου επεισοδίου βακτηριαιμίας. Η γονοτυπική ανάλυση περιέλαβε συνολικά 42 στελέχη (15 περιοριστικών καλλιεργείων και 27 στελέχη αίματος) που αντιστοιχούσαν σε 23 ασθενείς. Δημογραφικά δεδομένα, υποκείμενη νόσος και τμήματα εισαγωγής παρατίθενται στον πίνακα 7.

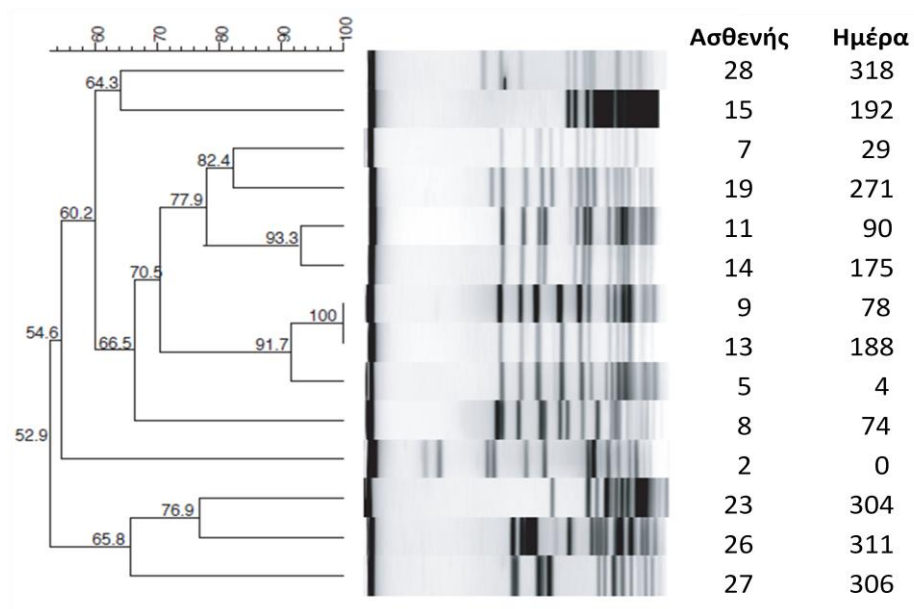
Πίνακας 7. Δημογραφικά στοιχεία ασθενών.

	Αριθμός ασθενών n: 23
Μέση ηλικία - έτη (εύρος)	58 (31-79)
Άνδρες (%) / Γυναίκες (%)	12 (52%) / 11 (48%)
Τμήματα	
Λευχαιμίας	17
Λεμφώματος	2
Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών	4
Υποκείμενη κακοήθεια	
Οξεία Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία	3
Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία	15
Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία	2
Νόσος του Hodgkin's	2
Πολλαπλό μύελωμα	1

4.1. Σύγκριση στελεχών περιοριστικών καλλιεργειών

Η ταυτοποίηση των 14 στελεχών κοπράνων που αντιστοιχούσαν σε 14 ασθενείς έδειξε ότι τα στελέχη αυτά ήταν γενετικά ποικίλα (Εικόνα 13). Εξαιρέση αποτελούν τα στελέχη των ασθενών 9 και 13 από τους οποίους ταυτόσημα στελέχη (100% ομοιότητα) απομονώθηκαν με χρονική διαφορά 4 μηνών. Επίσης, το στέλεχος αυτό σχετιζόταν στενά (91,7% ομοιότητα) με ένα στέλεχος που απομονώθηκε από τον ασθενή 5 με χρονική διαφορά 2.5 μηνών. Άλλα γενετικά συγγενή (κλωνικά) στελέχη προήλθαν από τους ασθενείς 11 και 14 (93.3% ομοιότητα) και τους ασθενείς 7 και 19 (82.3% ομοιότητα).

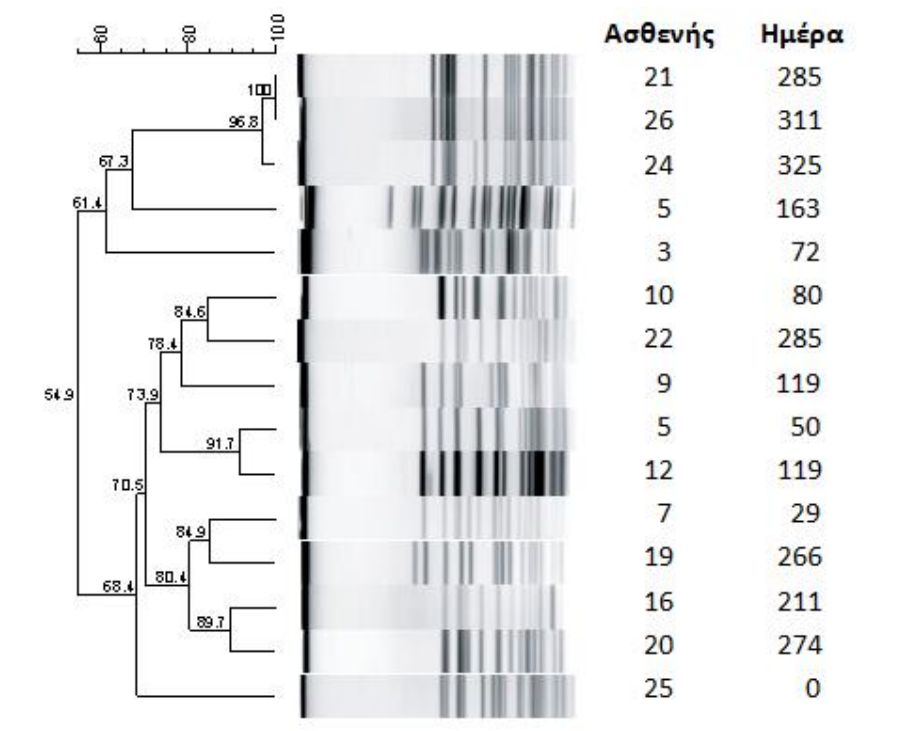
Εικόνα 13. Ηλεκτροφορητικά πρότυπα στελεχών περιοριστικών καλλιεργειών.



4.2. Σύγκριση στελεχών που απομονώθηκαν από καλλιέργειες αίματος

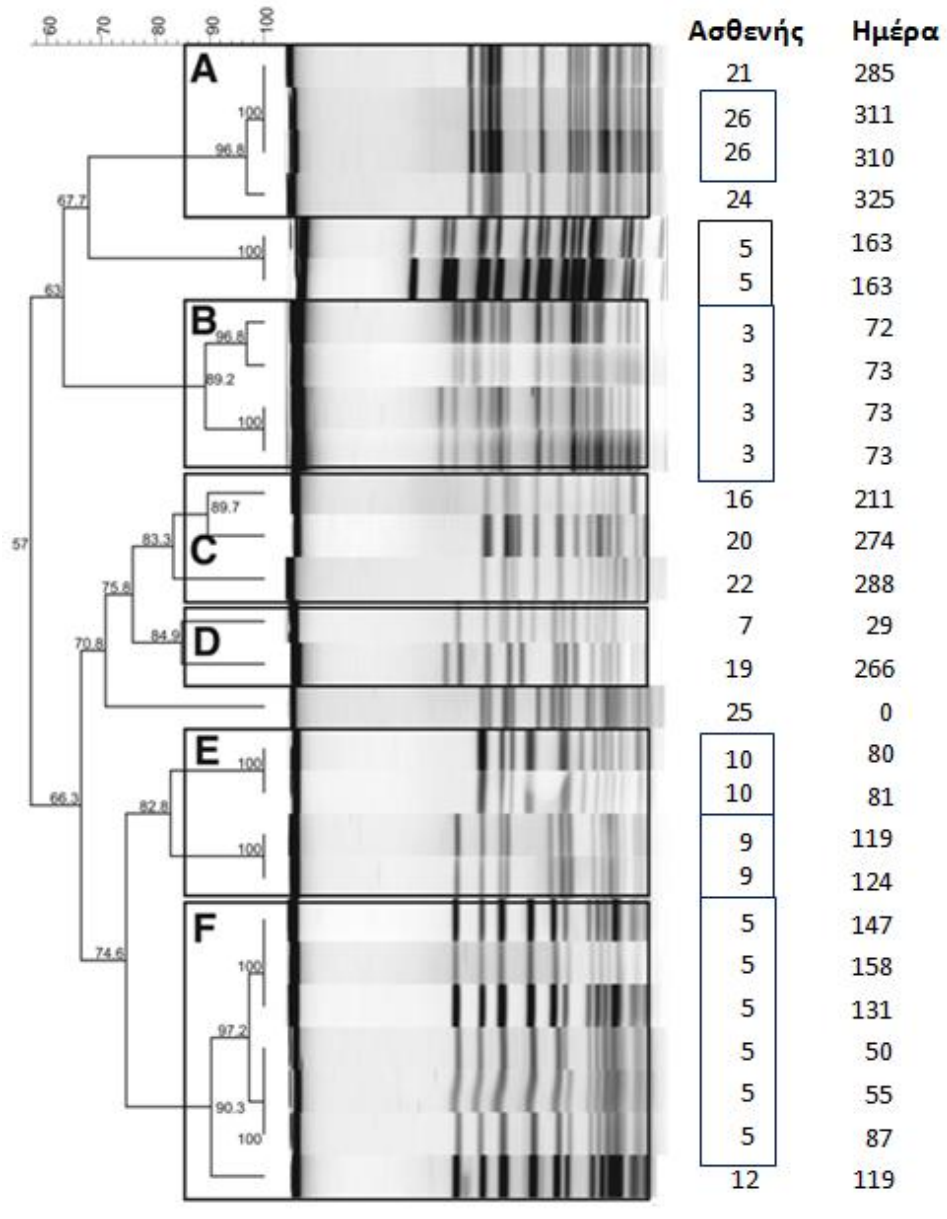
Στελέχη που απομονώθηκαν από το αίμα διαφορετικών ασθενών ήταν στην πλειοψηφία τους γενετικά ποικίλα με εξαιρέσεις μικρών ομάδων γενετικά συγγενών (κλωνικών) στελεχών. Το δενδρόγραμμα των στελεχών που απομονώθηκαν από το αίμα παρουσιάζεται στις εικόνες 14 και 15. Διαπιστώθηκαν μόνο 5 ομάδες βακτηριαίμιας με γενετικά συγγενή ή ταυτόσημα στελέχη που συμπεριλάμβαναν δύο ή το πολύ τρεις ασθενείς (Εικόνα 15). Μία προφανής γενετικά συγγενής ομάδα (Εικόνα 15, ομάδα A) σημειώθηκε στα τέλη Νοεμβρίου και το Δεκέμβριο του 2004, με τρεις ασθενείς (ασθενείς 21, 26, 24) να έχουν κλωνικά ή και ταυτόσημα στελέχη (96,8% - 100% ομοιότητα). Μία άλλη ομάδα (Εικόνα 15, ομάδα F, ασθενείς 5 & 12), περιελάμβανε 2 στελέχη που είχαν ομοιότητα πάνω από 90%. Τέλος, δύο άλλα στελέχη (Εικόνα 15, ομάδα C, ασθενείς 16 & 20), είχαν 89,7% ομοιότητα. Χρησιμοποιώντας το όριο ομοιότητας του 80%, διαπιστώθηκαν 5 διακριτές ομάδες σχετιζόμενων στελεχών, αλλά όχι κυρίαρχος κλώνος. Υπήρχαν 8 ηλεκτροφορητικοί τύποι (Εικόνα 15) και 15 μοναδικά στελέχη απομονωθέντα από το αίμα (Εικόνα 14). Συνολικά, μεταξύ στελεχών που απομονώθηκαν από καλλιέργειες αίματος υπήρχε μεγαλύτερη γενετική ομοιογένεια από ότι μεταξύ στελεχών που απομονώθηκαν από περιοριστικές καλλιέργειες.

Εικόνα 14. Ηλεκτροφορητικά πρότυπα στελεχών από καλλιέργειες αίματος*.



* Δεκαπέντε αντιπροσωπευτικά στελέχη από επεισόδια βακτηριαίμιας προερχόμενα από 14 ασθενείς.

Εικόνα 15. Ηλεκτροφορητικά πρότυπα στελεχών από καλλιέργειες αίματος*.

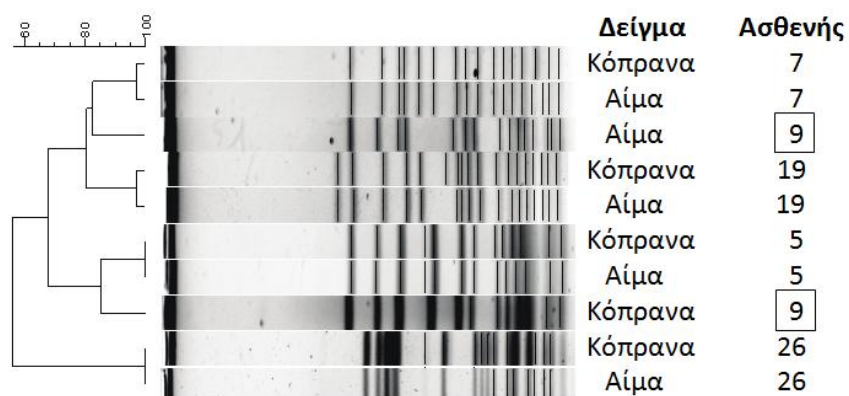


* Πολλαπλά στελέχη από κάθε επεισόδιο βακτηριαιμίας. Ομάδες A - F αντιπροσωπεύουν κλωνικά στελέχη.

4.3. Ζεύγη στελεχών αίματος και περιορθικών καλλιέργειών προερχόμενα από τον ίδιο ασθενή

Σε 5 ασθενείς απομονώθηκαν στελέχη από το αίμα και από περιορθικές καλλιέργειες. Τα ζεύγη στελεχών αίματος και περιορθικών καλλιέργειών προερχόμενα από τον ίδιο ασθενή συγκρίθηκαν μεταξύ τους και 4 από τα 5 ήταν γενετικά συγγενή ή ταυτόσημα (97-100%) (Εικόνα 16). Εξάιρεση αποτελούσε ο ασθενής 9 του οποίου το στέλεχος της περιορθικής καλλιέργειας είχε μόνο 76% ομοιότητα με το στέλεχος αίματος, το οποίο όμως απομονώθηκε 6 εβδομάδες αργότερα.

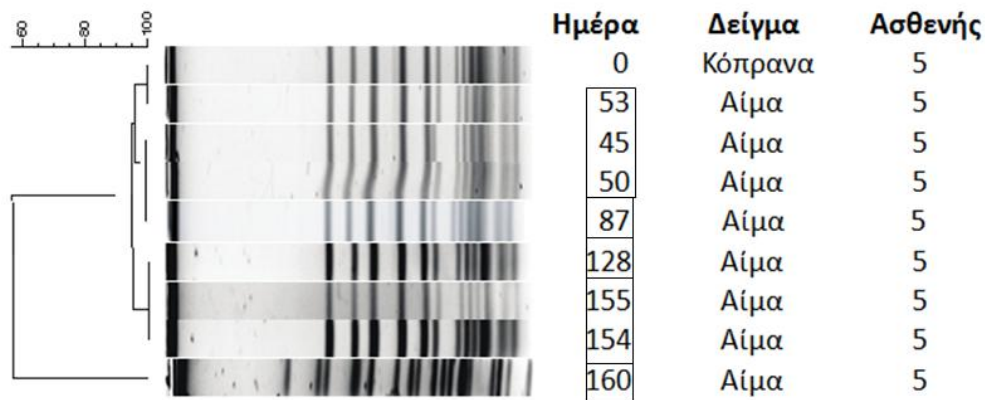
Εικόνα 16. Ζεύγη στελεχών αίματος και περιορθικών καλλιέργειών προερχόμενα από τον ίδιο ασθενή



4.4. Σύγκριση στελεχών από υποτροπιάζοντα επεισόδια βακτηριαμίας

Ένας ασθενής (ασθενής #5) παρουσίασε 5 υποτροπιάζοντα επεισόδια βακτηριαμίας κατά τη διάρκεια του έτους 2004 (Εικόνα 17). Τέσσερα από αυτά προκλήθηκαν από γενετικά συγγενή ή ταυτόσημα στελέχη. Ωστόσο το στέλεχος που απομονώθηκε από την καλλιέργεια αίματος κατά τη διάρκεια του τελευταίου επεισοδίου βακτηριαμίας, εμφανίζει σαφώς διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο. Το επεισόδιο αυτό ήταν το πέμπτο κατά σειρά και σημειώθηκε 5,5 μήνες μετά τον αποικισμό του γαστρεντερικού σωλήνα από στελέχη ανθεκτικού στη βανκομυκίνη Εντερόκοκκου. Σε σχέση με το ηλεκτροφορητικό πρότυπο του στελέχους της περιοριστικής καλλιέργειας που απομονώθηκε κατά το χρόνο αποικισμού, τα δύο πρώτα επεισόδια βακτηριαμίας προκλήθηκαν από ταυτόσημα στελέχη με το στέλεχος της περιοριστικής καλλιέργειας (100% ομοιότητα), το τρίτο και τέταρτο επεισόδιο βακτηριαμίας από γενετικά συγγενή στελέχη (97.2% ομοιότητα με το στέλεχος της περιοριστικής καλλιέργειας) και το πέμπτο από γενετικά ποικίλο στέλεχος.

Εικόνα 17. Ηλεκτροφορητικά πρότυπα στελεχών από ένα ασθενή με πολλαπλά επεισόδια βακτηριαμίας*.

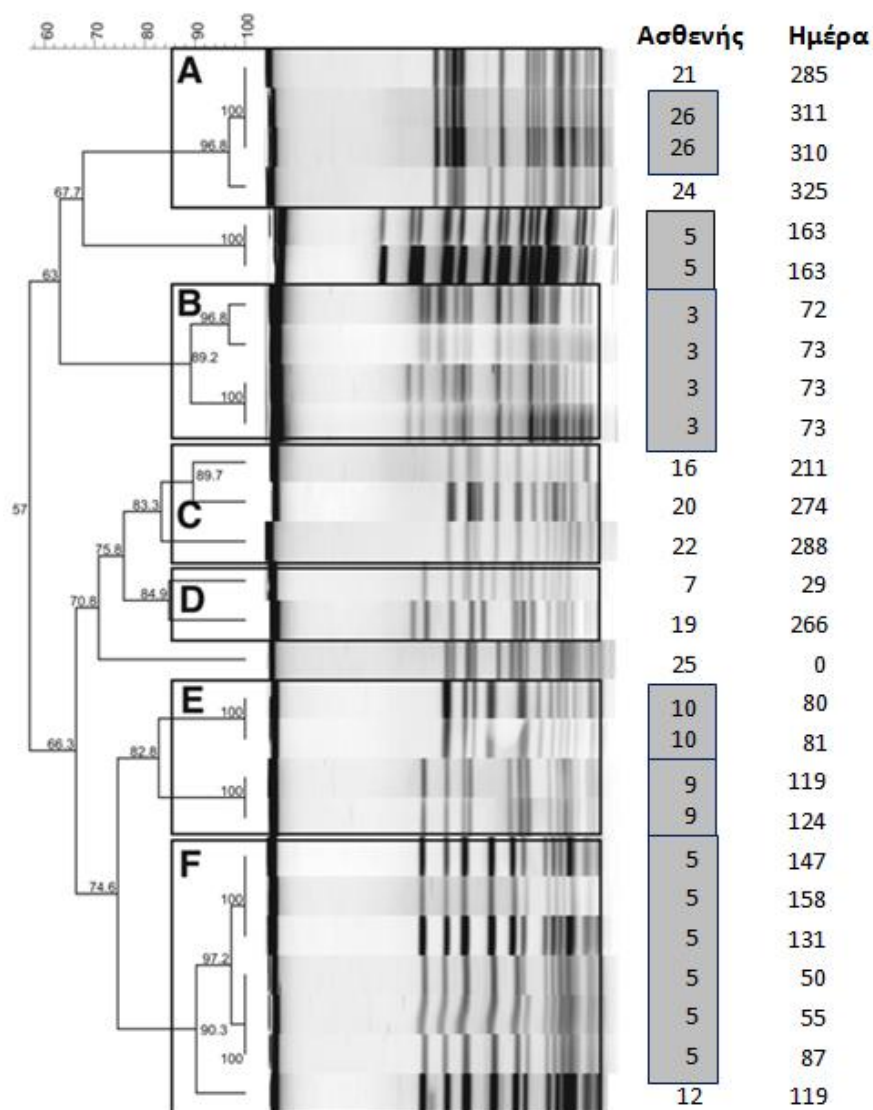


* Τα πρώτα 4 επεισόδια βακτηριαμίας διακρίθηκαν μεταξύ τους βάσει του χρόνου επέλευσης της βακτηριαμίας. Το 5^ο επεισόδιο διακρίθηκε από το 4^ο βάσει του ηλεκτροφορητικού του προτύπου.

4.5. Σύγκριση στελεχών καλλιεργείων αίματος που απομονώθηκαν από το ίδιο επεισόδιο βακτηριαιμίας

Σε 6 επεισόδια βακτηριαιμίας που αντιστοιχούσαν σε 5 ασθενείς (ασθενείς 26, 5, 3, 10, και 9) απομονώθηκαν περισσότερα από ένα στελέχη κατά τη διάρκεια του ίδιου επεισοδίου βακτηριαιμίας, όλα από καλλιέργειες αίματος (Εικόνα 18). Στα 5 από τα 6 αυτά επεισόδια τα στελέχη ήταν ταυτόσημα (100% ομοιότητα). Μόνο σε ένα επεισόδιο βακτηριαιμίας (ασθενής 3) απομονώθηκαν κλωνικά αλλά όχι ταυτόσημα στελέχη (89% ομοιότητα) την πρώτη και δεύτερη ημέρα βακτηριαιμίας.

Εικόνα 18. Σύγκριση στελεχών καλλιεργείων αίματος που απομονώθηκαν από το ίδιο επεισόδιο βακτηριαιμίας.



Κατά την περαιτέρω επιδημιολογική μελέτη των μικρών κλώνων που αναγνωρίστηκαν δεν διαπιστώθηκε κοινή πηγή προέλευσης ή συγκεκριμένο μοντέλο μετάδοσης. Οι ασθενείς είχαν εισαχθεί σε διαφορετικούς θαλάμους και οι εισαγωγές απείχαν χρονικά μεταξύ τους.

Συμπερασματικά, διαπιστώσαμε ότι στην πλειοψηφία τους τα στελέχη κοπράνων και αίματος ήταν γενετικά ποικίλα και κατά κύριο λόγο μοναδικά για τον κάθε ασθενή ατομικά.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Παρά το γεγονός ότι λοιμώξεις από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη συνιστούν ιδιαίτερο πρόβλημα σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες, η βιβλιογραφία της μοριακής επιδημιολογίας του ανθεκτικού Εντερόκοκκου στον πληθυσμό αυτό είναι περιορισμένη. Επιπλέον, η έλλειψη προτυποποίησης της τεχνικής για τον Εντερόκοκκο δυσκολεύει τη σύγκριση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών μελετών. Αρκετά συμπεράσματα μπορούν ωστόσο να εξαχθούν από τη μοριακή τυποποίηση στην παρούσα μελέτη.

Στελέχη περιορθικών καλλιεργείων προερχόμενα από διαφορετικούς ασθενείς ήταν κατά κανόνα γενετικά ποικίλα. Διαπιστώθηκαν μόνο μικροί κλώνοι γενετικά συγγενών στελεχών. Εν γένει η έλλειψη κλωνικότητας αποκλείει την κοινή πηγή προέλευσης ανθεκτικών στελεχών, ή τις παραβιάσεις των κανονισμών πρόληψης λοιμώξεων. Επιπλέον, δεν υποδεικνύει τον τρόπο μετάδοσης των ανθεκτικών στελεχών. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της μοριακής μελέτης από μόνα τους δεν οδήγησαν στην εξάλειψη της επιδημίας.

Κατά τη σύγκριση των ηλεκτροφορητικών προτύπων στελεχών που απομονώθηκαν από καλλιέργειες αίματος από διαφορετικούς ασθενείς διαπιστώθηκε επίσης γενετική ποικιλία όπως και κατά τη σύγκριση στελεχών περιορθικών καλλιεργείων με εξαίρεση μικρών κλώνων. Ωστόσο φαίνεται να υπήρχε μεγαλύτερη γενετική συγγένεια συνολικά μεταξύ στελεχών αίματος από ότι μεταξύ στελεχών κοπράνων. Αυτό συνηγορεί υπέρ συγκεκριμένου φαινότυπου που χαρακτηρίζεται από υψηλότερη παθογονικότητα και ικανότητα επιβίωσης στο αίμα, επιπρόσθετα της δυνατότητας των στελεχών αυτών να αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα. Οι καθοριστικοί παράγοντες για τη φυσική αυτή επιλογή παραμένουν προς το παρόν άγνωστοι.

Αντίθετα, στελέχη περιορθικών καλλιεργείων και αίματος προερχόμενα από τον ίδιο ασθενή ήταν κατά κανόνα γενετικά συγγενή ή ταυτόσημα αποδεικνύοντας ότι στους περισσότερους ασθενείς η βακτηριαμία προκαλείται από ένα ενδογενές στέλεχος. Το εύρημα αυτό αποδεικνύει ότι το στέλεχος που είναι υπεύθυνο για τη βακτηριαμία είναι το κυρίαρχο στέλεχος που αποικίζει το έντερο και στην απουσία εναλλακτικής εστίας ο γαστρεντερικός σωλήνας αποτελεί την πηγή της βακτηριαμίας. Επιπλέον, επιβεβαιώνει την καλά τεκμηριωμένη γνώση ότι ο γαστρεντερικός σωλήνας αποτελεί τη δεξαμενή αποικισμού (reservoir) για τον ανθεκτικό στη βανκομυκίνη Εντερόκοκκο [71]. Αυτό ήταν σταθερό εύρημα όταν το χρονικό διάστημα μεταξύ του χρόνου αποικισμού και βακτηριαμίας ήταν βραχύ. Στον ασθενή 9 που

αποτελεί τη μοναδική εξαίρεση (ομοιότητα 76.2%) το διάστημα μεταξύ του χρόνου αποικισμού και του χρόνου βακτηριαμίας ήταν 6 εβδομάδες. Η μεταβολή αυτή του ηλεκτροφορητικού προτύπου ερμηνεύεται από την επέλευση γενετικών συμβάντων κατά την παρέλευση του χρόνου [195]. Το φαινόμενο αυτό είναι επίσης προφανές στον ασθενή 5 που είχε πολλαπλά επεισόδια βακτηριαμίας.

Η σύγκριση των στελεχών καλλιέργειών αίματος από τον ασθενή 5 που ανέπτυξε 5 διαδοχικά επεισόδια βακτηριαμίας με το στέλεχος που αποικίζει το γαστρεντερικό σωλήνα αλλά και μεταξύ τους έδειξε ταυτόσημα ή κλωνικά στελέχη για τα πρώτα 4 επεισόδια βακτηριαμίας εκτός από το τελευταίο επεισόδιο το οποίο όμως σημειώθηκε 5,5 μήνες μετά το χρόνο αποικισμού. Το εύρημα αυτό υποστηρίζει τη θεωρία ότι το στέλεχος που αποικίζει το γαστρεντερικό σωλήνα μπορεί να παραμείνει κυρίαρχο για μεγάλο χρονικό διάστημα. Με την πάροδο του χρόνου το επικρατών στέλεχος μπορεί να υποστεί μεταλλάξεις και γενετικά συμβάντα που αντικατοπτρίζονται στο ηλεκτροφορητικό του πρότυπο, είτε μπορεί να υποκατασταθεί από ένα νέο στέλεχος το οποίο είναι πιο κατάλληλο για το περιβάλλον αυτό, χαρακτηρίζεται από υψηλότερη ικανότητα αποικισμού, και επικρατεί έναντι των άλλων στελεχών στο γαστρεντερικό σωλήνα. Χαρακτηριστική είναι η βαθμιαία μείωση της γενετικής ομοιότητας του γενετικού υλικού με την πάροδο του χρόνου, φαινόμενο που αντικατοπτρίζει τη σταδιακή επέλευση γενετικών συμβάντων. Συγκεκριμένα, η γενετική ομοιότητα μειώθηκε βαθμιαία από 100% σε 97,2% και τελικά σε 53,1%. Αν και στην παρούσα μελέτη περιλαμβάνεται μόνο ένας ασθενής με πολλαπλά υποτροπιάζοντα επεισόδια βακτηριαμίας, τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα είναι ενδεικτικά της εξέλιξης του γονιδιόματος των μικροβιακών στελεχών σε μοριακό επίπεδο.

Τέλος, στελέχη που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια του ίδιου επεισοδίου βακτηριαμίας ήταν κατά κανόνα γενετικά συγγενή. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι η βακτηριαμία προκαλείται από ένα και μοναδικό στέλεχος το οποίο όχι μόνο επικρατεί στην εντερική χλωρίδα έναντι άλλων μικροβίων (π.χ. είδη *Streptococcus viridans*, εντεροβακτηριοειδών, κ.λ.π.) αλλά και έναντι στελεχών *Enterococcus faecium*.

Συμπερασματικά, με την εξαίρεση μικρών κλώνων, η επιδημία ήταν ως επί το πλείστον σποραδική, χωρίς να υποδεικνύεται μια κοινή περιβαλλοντική πηγή. Μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα συνολικά παρατηρήθηκε μεταξύ στελεχών που απομονώθηκαν από καλλιέργειες αίματος από ότι μεταξύ στελεχών κοπράνων. Ολιγοκλωνικές [183, 185, 205, 206] και πολυκλωνικές [74, 185, 205, 207, 208] επιδημίες έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία συμπεριλαμβανομένων και ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες. Έχει προταθεί ότι η πολυκλωνικότητα είναι το αποτέλεσμα της εισαγωγής νέων στελεχών από πολλαπλές πηγές

στο νοσοκομειακό περιβάλλον και όχι το αποτέλεσμα οριζόντιας εξάπλωσης [74]. Ωστόσο δεν υπάρχουν δεδομένα που να αποδεικνύουν αυτή την υπόθεση. Άλλες μελέτες οδήγησαν στην υπόθεση ότι οι επιδημικές εξάρσεις από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη είναι αρχικά μονοκλωνικές σύντομα μετά την εισαγωγή ενός καινούριου στελέχους στο νοσοκομειακό περιβάλλον και πολυκλωνικές αργότερα όταν τα ανθεκτικά στελέχη επιτυγχάνουν ενδημικά επίπεδα στη νοσοκομειακή χλωρίδα [10, 147, 206].

Μία άλλη μελέτη συσχέτισε το συστηματικό προληπτικό έλεγχο κοπράνων και την απομόνωση επαφής των αποικισμένων ασθενών με την πολυκλωνικότητα [205]. Ειδικότερα, η γενετική συγγένεια ανθεκτικών στελεχών από στελέχη αίματος μελετήθηκε σε δύο νοσοκομεία παρόμοιου μεγέθους, ένα από τα οποία υπέβαλε τους ασθενείς υψηλού κινδύνου για αποικισμό, σε συστηματικό προληπτικό έλεγχο κοπράνων. Η επιδημία ήταν πολυκλωνική στο νοσοκομείο που είχε υιοθετήσει το συστηματικό προληπτικό έλεγχο κοπράνων και ολιγοκλωνική στο άλλο. Τα ποσοστά βακτηριαιμίας ήταν χαμηλότερα στο νοσοκομείο που ακολουθούσε το συστηματικό προληπτικό έλεγχο κοπράνων [205]. Σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία η παρούσα μελέτη της μοριακής επιδημιολογίας κατέδειξε πολυκλωνικότητα στη βάση αυστηρής απομόνωσης επαφής των αποικισμένων με ανθεκτικά στελέχη ασθενών.

Με τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα πιθανολογείται ότι τα ανθεκτικά Εντεροκοκκικά στελέχη μεταδίδονται με δύο διαφορετικούς τρόπους. Η μετάδοση πραγματοποιείται είτε μέσω της εξάπλωσης ανθεκτικών μικροβιακών στελεχών ή μέσω μετάδοσης γονιδίων και γενετικών παραγόντων καθοριστικών αντοχής από το ένα στέλεχος στο άλλο. Ειδικότερα, μετά την απόκτηση ενός ανθεκτικού στελέχους, γενετικό υλικό που προσδίδει αντοχή, μεταφέρεται μέσω ενός τρανσποζονίου (που με τη σειρά του συχνά φέρεται σε ένα πλασμίδιο), και μεταδίδεται σε ευαίσθητα στη βανκομυκίνη στελέχη Εντερόκοκκων που είναι παρόντα στο γαστρεντερικό σωλήνα κατά το χρόνο μετάδοσης [10]. Σύμφωνα με αυτήν την υπόθεση το ανθεκτικό στέλεχος που μεταδόθηκε ενεργεί ως πηγή γονιδίων αντοχής και δεν αντιπροσωπεύει το προγονικό στέλεχος που στη συνέχεια θα αναπτυχθεί κλωνικά και θα κυριαρχήσει στη χλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα. Τα Εντεροκοκκικά στελέχη-λήπτες των γονιδίων που καθορίζουν αντοχή είναι μοναδικά για κάθε ασθενή και, ως εκ τούτου, σαφώς διακριτά γενετικά.

Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν αυτή τη θεωρία χωρίς ωστόσο να την αποδεικνύουν. Σε μία μελέτη, 215 στελέχη Εντερόκοκκων ανθεκτικών στη βανκομυκίνη προερχόμενα από ένα νοσοκομείο τριτοπαθούς φροντίδας, υποβλήθηκαν σε μοριακή τυποποίηση με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE) [208]. Συγχρόνως, τα στελέχη διερευνήθηκαν για το

τρανσποζόνιο *Tn1546* που φέρει γονίδια αντοχής στη βανκομυκίνη (VanA) με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (long-range PCR) και ανάλυση με πολυμορφισμό μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) με τη χρήση περιοριστικού ενζύμου. Η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο ανέδειξε 172 ηλεκτροφορητικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων 21 κλώνων (που περιελάμβαναν 2-10 στελέχη ο καθένας). Αντίθετα, η τυποποίηση του τρανσποζονίου *Tn1546* από 169 στελέχη τα οποία κατατάχθηκαν σε 15 ηλεκτροφορητικούς τύπους και 158 στελέχη τα οποία ανήκαν σε 4 κλώνους τρανσποζονίων [208]. Συμπερασματικά, σε αντίθεση με την κλωνική ποικιλομορφία των Εντεροκοκκικών στελεχών, τα τρανσποζόνια χαρακτηρίζονταν από μεγαλύτερη γενετική ομοιογένεια στον ίδιο πληθυσμό. Κατά συνέπεια το τρανσποζόνιο *Tn1546* έχει τη δυνατότητα εκτεταμένης οριζόντιας εξάπλωσης στο νοσοκομειακό περιβάλλον η οποία είναι ανεξάρτητη από την εξάπλωση των Εντεροκοκκικών στελεχών στα οποία ανευρίσκεται. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα σε άλλες μελέτες [209].

Δύο πρόσφατες μελέτες υπογραμμίζουν περαιτέρω το ρόλο των τρανσποζονίων, των πλασμιδίων και των βακτηριοφάγων στη διάδοση αντοχής στα αντιβιοτικά. Με τη μέθοδο της πυροαλληλούχησης (Pyrosequencing) αναλύθηκε το γενετικό υλικό 7 στελεχών *E. faecium* (4 παθογόνα στελέχη που απομονώθηκαν από εστίες νόσου, 2 που απομονώθηκαν από κόπρωνα ασθενών και 1 που απομονώθηκε στα πλαίσια ενός νοσοκομειακού προγράμματος επιτήρησης) [210]. Το γονιδίωμα των στελεχών ήταν ποικίλο σε μέγεθος, υποδεικνύοντας ότι ο *E. faecium* μπορεί να αποκτήσει και να ενσωματώσει εξωγενές DNA στο γονιδίωμά του. Επίσης, η ανάλυση του γενετικού υλικού κατέδειξε την ύπαρξη αλληλουχιών προερχόμενων από βακτηριοφάγους. Τα στελέχη που αλληλουχήθηκαν στερούνταν λειτουργικού συστήματος CRISPR-Cas (στερούνταν το *cas1* γονίδιο) [210]. Το σύστημα CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) συνίσταται από βραχείες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που στην παρουσία του γονιδίου *Cas* προσδίδει ανοσία έναντι μόλυνσης από ξένα γενετικά στοιχεία όπως πλασμίδια και βακτηριοφάγους [211]. Σε μία άλλη μελέτη η παρουσία επίκτητης αντίστασης σε στελέχη *E. faecalis* ήταν αντιστρόφως ανάλογη με την παρουσία των αλληλουχιών CRIPR-Cas [212].

Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν τη θεωρία ότι η εξάπλωση του ανθεκτικού στη βανκομυκίνη *E. faecium* πραγματοποιείται όχι μόνο με τη μετάδοση ανθεκτικών στελεχών μεταξύ ασθενών αλλά και με τη μετάδοση γενετικού υλικού που κωδικοποιεί παράγοντες αντοχής μεταξύ στελεχών. Η απομόνωση επαφής μπορεί να εμποδίσει την εξάπλωση

ανθεκτικών στελεχών αλλά είναι αναποτελεσματική στη διακοπή της μετάδοσης των γονιδίων που φέρουν αντοχή στη βανκομυκίνη.

Συμπερασματικά, ο αποικισμός από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες ήταν κυρίως σποραδικός με την εξαίρεση μικρών κλώνων. Η μοριακή επιδημιολογία δεν κατέδειξε μία κοινή πηγή περιβαλλοντικής προέλευσης, τρόπους μετάδοσης ή παραβιάσεις των κανονισμών πρόληψης λοιμώξεων και συγκεκριμένα των κανόνων απομόνωσης επαφής.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Β΄

Παράγοντες κινδύνου για αποικισμό από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μελέτη της μοριακής επιδημιολογίας στελεχών που απομονώθηκαν από τα κόπρανα αποικισμένων ασθενών και το αίμα ασθενών με βακτηριαιμία και περιλαμβάνεται στο Ειδικό Μέρος Α΄ της παρούσας διδακτορικής διατριβής κατέδειξε ότι στην πλειονότητα τους τα στελέχη χαρακτηρίζονταν από γενετική ανομοιογένεια και με την εξαίρεση μικρών κλώνων η επιδημία ήταν πρωτίστως σποραδική. Ακολούθησε μελέτη τύπου «ασθενών-μαρτύρων» με σκοπό την αναγνώριση παραγόντων κινδύνου που σχετίζονται με αποικισμό από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη. Οι μεταβλητές που μελετήθηκαν επιλέχθηκαν όχι μόνο με κριτήριο την καλύτερη κατανόηση της παθογένεσης του αποικισμού αλλά κυρίως για τη δυνατότητα τροποποίησής τους ώστε να καταστεί δυνατός ο έλεγχος του αποικισμού από ανθεκτικά στελέχη. Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας κατά την έναρξη της μελέτης κατέδειξε ένα περιορισμένο αριθμό μελετών αναγνώρισης παραγόντων κινδύνου σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες. Κυρίως όμως οι μελέτες αυτές χρησιμοποιούσαν ευρύτερους ορισμούς για την αναγνώριση αποικισμένων ασθενών με αποτέλεσμα να περιλαμβάνουν και ασθενείς με βακτηριαιμία. Η μελέτη αναγνώρισης παραγόντων κινδύνου για αποικισμό από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες όπως και η μελέτη της μοριακής επιδημιολογίας αλλά συμπεριέλαβε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών. Η μελέτη αυτή παρατίθεται στο δεύτερο μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο νοσοκομείο του Roswell Park Cancer Institute (RPCI) που βρίσκεται στην πόλη του Buffalo στην πολιτεία της Νέας Υόρκης και το οποίο είναι ένα εξειδικευμένο κέντρο καρκίνου μεγέθους 120 κλινών. Οι αιματολογικές μονάδες περιλαμβάνουν τις μονάδες λευχαιμίας, λεμφώματος, και μεταμόσχευσης μυελού των οστών. Οι ασθενείς εισάγονταν σε δύο αιματολογικές πτέρυγες που απαρτίζονταν από 14 μονόκλινα δωμάτια η κάθε μία. Η μελέτη εγκρίθηκε από την αρμόδια Επιστημονική Επιτροπή και Επιτροπή

Δεοντολογίας του νοσοκομείου. Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν ασθενείς που είχαν εισαχθεί στα τμήματα λευχαιμίας, λεμφώματος, και μεταμόσχευσης μυελού των οστών κατά τη διάρκεια τριών ετών, από τον Ιανουάριο του 2004 μέχρι το Δεκέμβριο του 2006.

2.1. Κανονισμός πρόληψης λοιμώξεων

Σύμφωνα με τον κανονισμό πρόληψης λοιμώξεων όλοι οι ασθενείς με αιματολογικά νοσήματα συμπεριλαμβανομένων και των ασθενών της μονάδας μεταμόσχευσης μυελού, υποβάλλονταν σε εβδομαδιαία περιοριστική καλλιέργεια για την έγκαιρη αναγνώριση ασθενών αποικισμένων από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη. Τα δείγματα συλλέγονταν με βαμβακοφόρο στειλεό από την περιοριστική χώρα και σπανιότερα από τα κόπρανα. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιούνταν κάθε Δευτέρα ανεξάρτητα από την ημέρα εισαγωγής. Ασθενείς, θετικοί για Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη, τοποθετούνταν σε απομόνωση επαφής για το υπόλοιπο διάστημα της νοσηλείας τους και για όλες τις μελλοντικές εισαγωγές. Ο κανονισμός αυτός είναι σύμφωνος με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Εταιρείας Νοσοκομειακής Επιδημιολογίας της Αμερικής (Society of Hospital Epidemiology of America, SHEA) [10].

2.2. Εμπειρική αγωγή ουδετεροπενικού πυρετού

Κατά τη διάρκεια της μελέτης το αντιβιοτικό πρώτης επιλογής για την εμπειρική θεραπεία ουδετεροπενικού πυρετού ήταν η κεφταζιδίμη 2 gm κάθε 8 ώρες ενδοφλεβίως. Αν αναερόβια δράση κρινόταν αναγκαία, στην αγωγή προστίθετο μετρονιδαζόλη 500 mg κάθε 8 ώρες ενδοφλεβίως ή ο ασθενής ετίθετο σε μονοθεραπεία με πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη 4,5 gm ενδοφλεβίως κάθε 6 ώρες ή σε μονοθεραπεία με ιμιπενέμη-σιλαστατίνη 500 mg ενδοφλεβίως κάθε 6 ώρες. Κριτήρια για προσθήκη βανκομυκίνης περιελάμβαναν την παρουσία υπότασης ή καρδιαγγειακής επιβάρυνσης, σημεία λοίμωξης κεντρικού φλεβικού καθετήρα ή δέρματος και μαλακών μορίων, θετικές καλλιέργειες αίματος για Gram θετικά βακτηρίδια, ή αποικισμός από χρυσίζων Σταφυλόκοκκο ανθεκτικό στη μεθικιλίνη. Η πρακτική αυτή είναι σύμφωνη με τις κατευθυντήριες οδηγίες για τη θεραπευτική αντιμετώπιση του ουδετεροπενικού πυρετού (National Comprehensive Cancer Network, NCCN) [213].

2.3. Μέθοδοι καλλιέργειας για απομόνωση Εντερόκοκκου ανθεκτικού στη βανκομυκίνη

Τα δείγματα κοπράνων που συλλέγονταν από τις περιοριστικές καλλιέργειες επιδημιολογικής επιτήρησης (surveillance) ή από καλλιέργειες αίματος καλλιεργούνταν σε phenylethyl alcohol (PEA) άγαρ, ένα υλικό εκλεκτικό για την απομόνωση των Gram θετικών βακτηρίων. Τα τρυβλία επωάζονταν στους 37°C και εξετάζονταν 24 και 48 ώρες αργότερα. Στη συνέχεια, αποικίες Gram θετικών βακτηρίων εξετάζονταν με τη δοκιμή υδρόλυσης της

pyrrolidonylarylamidase (PYR) για την ανίχνευση Εντεροκοκκικών ειδών. Περαιτέρω ταυτοποίηση και προσδιορισμός ευαισθησίας στα αντιβιοτικά σε στελέχη από καλλιέργειες αίματος εκτελούνταν χρησιμοποιώντας το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK και το επιλεκτικό άγαρ βανκομυκίνης (Vancomycin screen agar; BBL™, Becton Dickinson, με 6.0 μg/mL βανκομυκίνης).

2.4. Σχεδιασμός μελέτης «ασθενών-μαρτύρων»

Η διερεύνηση των παραγόντων κινδύνου για αποικισμό από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη πραγματοποιήθηκε με μελέτη τύπου «ασθενών-μαρτύρων». Αποικισμός ορίστηκε ως η ανίχνευση Εντερόκοκκου ανθεκτικού στη βανκομυκίνη στην καλλιέργεια περιοριστικού επιχρίσματος. «Ασθενείς» ορίστηκαν εκείνοι που αποικίσθηκαν από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους όπως προέκυψε από τη θετικοποίηση της περιοριστικής καλλιέργειας επιδημιολογικής επιτήρησης. «Μάρτυρες» ορίστηκαν οι ασθενείς που παρέμειναν αρνητικοί για αποικισμό από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη κατά τη διάρκεια της παραμονής τους στο νοσοκομείο. Ασθενείς που είχαν ήδη αποικισθεί ή είχαν αναπτύξει λοίμωξη σε προγενέστερο χρόνο αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Ασθενείς και «μάρτυρες» περιελήφθησαν στη μελέτη εφόσον είχαν πλήρη σειρά εβδομαδιαίων περιοριστικών καλλιεργειών. Τέλος, ασθενείς και «μάρτυρες» είχαν τουλάχιστον 6 ημέρες ενδονοσοκομειακής νοσηλείας ώστε να εξασφαλιστεί ένας ελάχιστος χρόνος έκθεσης στο νοσοκομειακό περιβάλλον και στους υποψήφιους παράγοντες κινδύνου. Μόνο ασθενείς αποικισμένοι από είδη *E. faecium* συμπεριελήφθησαν στη μελέτη. Η έκθεση στους υποψήφιους παράγοντες κινδύνου καταγράφηκε από την ημέρα εισαγωγής μέχρι το χρόνο αποικισμού για τους «ασθενείς», για ισότιμο χρόνο για τους «μάρτυρες» και για μέγιστο χρονικό διάστημα 30 ημερών. Το χρονικό αυτό διάστημα ορίστηκε ως «χρόνος υπό διερεύνηση». Ως κριτήρια εξομοίωσης χρησιμοποιήθηκαν η ηλικία, το φύλο και η μονάδα εισαγωγής (μονάδα λευχαιμίας, λεμφώματος και μεταμόσχευσης μυελού των οστών). Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στη διάρκεια νοσηλείας των «μαρτύρων» ώστε να έχουν χρόνο παραμονής στο νοσοκομείο τουλάχιστον ίσο με αυτό του «χρόνου υπό διερεύνηση» των ασθενών. Ασθενείς και «μάρτυρες» εξομοιώθηκαν ατομικά με σταθερό ηλικίο 1:2.

2.5. Ανεξάρτητες μεταβλητές και ορισμοί

Ανεξάρτητες μεταβλητές που μελετήθηκαν ως υποψήφιοι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν την υποκείμενη αιματολογική κακοήθεια, τη διάρκεια παραμονής στο νοσοκομείο, την παρουσία βλενογοννίτιδας και ουδετεροπενίας, την έκθεση στα αντιβιοτικά και αντιμυκητιασικά, την έκθεση σε ανοσοκατασταλτικά (κορτικοστεροειδή, μυκοφαινόλη μοφετίλ,

κυκλοσπορίνη Α, τακρόλιμους, σιρόλιμους), τη χορήγηση ολικής παρεντερικής διατροφής, τη λήψη αναστολέων γαστρικής οξύτητας (H₂-αναστολείς και αναστολείς αντλίας πρωτονίων) και τη χορήγηση ποικίλων χημειοθεραπευτικών παραγόντων.

Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες μελετήθηκαν ατομικά, αλλά και σε ομάδες βάσει του αντιμικροβιακού τους φάσματος. Οι ομάδες αυτές περιελάμβαναν αντιβιοτικά με αναερόβια δράση (μετρονιδαζόλη, κλινδαμυκίνη, αμπικιλίνη-σουλμπακτάμη, πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη, ιμιπενέμη-σιλαστατίνη, μεροπενέμη) με ή χωρίς πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη, αζόλες (φλουконаζόλη, βορικοναζόλη) εχινοκανδίνες, αλλά και όλοι οι αντιμηκυτιασικοί παράγοντες μαζί (αζόλες, εχινοκανδίνες και πολυένες). Ομάδες αντιβιοτικών με ισχυρή αναερόβιο δράση μελετήθηκαν με ή χωρίς την πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη καθώς κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ένα προστατευτικό ρόλο του αντιβιοτικού αυτού έναντι αποικισμού από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη [214-216]. Αφού υπολογίστηκε ο συνολικός αριθμός ημερών έκθεσης στις ανεξάρτητες μεταβλητές για τον κάθε ασθενή χωριστά συγκρίθηκε η διάμεση τιμή έκθεσης μεταξύ αποικισμένων και μη αποικισμένων ασθενών.

Καθώς η βλεννογονίτιδα του κατώτερου πεπτικού σωλήνα δεν συνοδεύεται από αντικειμενικά ευρήματα στη φυσική εξέταση ούτε είναι μετρήσιμο μέγεθος, έγινε η παραδοχή ότι η παρουσία διάρροιας αντιπροσωπεύει την ύπαρξη βλεννογονίτιδας. Διάρροια ορίστηκε ως η παραγωγή τουλάχιστον 500 mL υδαρών κοπράνων την ημέρα. Η παρουσία λευκοπενίας (αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων $\leq 1.5 \times 10^9/L$), ουδετεροπενίας (απόλυτη τιμή ουδετερόφιλων $\leq 0.5 \times 10^9/L$) και βλεννογονίτιδας μελετήθηκαν ως συνεχείς μεταβλητές κατά τη διάρκεια των 2 τελευταίων εβδομάδων προ του αποικισμού για τους ασθενείς και για αντίστοιχο χρόνο για τους «μάρτυρες». Η βαρύτητα της νόσου υπολογίστηκε 1 και 7 ημέρες προ του αποικισμού για τους ασθενείς και του τέλους του χρόνου υπό διερεύνηση για τους «μάρτυρες» με το σύστημα APACHE II [217].

2.6. Στατιστική ανάλυση

Για την επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα SPSS (ver. 16.0). Η μονοπαραγοντική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμή Pearson's chi-squared και τη μέθοδο της ανάλυσης της διακύμανσης (analysis of variant, ANOVA) όπου κρίθηκε απαραίτητο. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 0.05 (p -value ≤ 0.05) με αμφίπλευρο α -επίπεδο. Η ακριβής δοκιμασία του Fisher (Fisher exact test) χρησιμοποιήθηκε για αναμενόμενες συχνότητες μικρότερες του 5. Πολυπαραγοντική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με παλίνδρομη εξάλειψη με $P > 0.1$ για την αφαίρεση των παραγόντων από το μοντέλο. Παράγοντες που συμπεριελήφθησαν στο μοντέλο ήταν η έκθεση στην κεφαζιδίμη, η έκθεση

στην πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη, η συνολική έκθεση σε οποιοδήποτε αντιβιοτικό, η παρουσία λευκοπενίας και βλεννογονίτιδας. Η προηγηθείσα έκθεση στην κεφταζιδίμη συμπεριελήφθη στο μοντέλο βάσει των αποτελεσμάτων της μονοπαραγοντικής ανάλυσης. Οι υπόλοιποι παράγοντες συμπεριελήφθησαν στο μοντέλο καθώς στη βιβλιογραφία έχουν συσχετισθεί με αποικισμό από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη [214, 215, 218].

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μελέτη περιλαμβάνει 39 «ασθενείς» και 78 «μάρτυρες». Δημογραφικά δεδομένα και χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον πίνακα 8, ενώ τα αποτελέσματα στους πίνακες 9 και 10. Κατά τη χρονική περίοδο των τριών ετών πραγματοποίησης της μελέτης η συχνότητα θετικοποίησης των δειγμάτων παρέμεινε σταθερή (πίνακας 11). Από όλα τα αντιβιοτικά που μελετήθηκαν μόνο η χορήγηση κεφταζιδίμης συσχετίστηκε με αποικισμό από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη ($p < 0,001$). Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ του αποικισμού από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη με την παρουσία βλεννογονίτιδας, ουδετεροπενίας, τη χορήγηση χημειοθεραπείας, τη λήψη ανοσοκατασταλτικών παραγόντων, τη χορήγηση παρεντερικής διατροφής ή τη λήψη αναστολέων γαστρικής οξύτητας. Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη βαρύτητα νόσου όπως μετρήθηκε με το σύστημα APACHE II μεταξύ των δύο ομάδων στους προκαθορισμένους χρόνους. Από του στόματος βανκομυκίνη για τη θεραπεία κολίτιδας από *Clostridium difficile* χορηγήθηκε μόνο σε ένα «μάρτυρα».

Η διάμεση τιμή του χρόνου παραμονής στο νοσοκομείο για τους «ασθενείς» ήταν μεγαλύτερη κατά 5 ημέρες σε σχέση με αυτή των «μαρτύρων» ($p: 0,001$) (Πίνακας 9). Μεταξύ των 39 «ασθενών», 7 (18%) ανέπτυξαν βακτηριαιμία από ανθεκτικό στη βανκομυκίνη Εντερόκοκκο κατά τη διάρκεια της παραμονής τους στο νοσοκομείο. Η υποομάδα των 7 «ασθενών» που ανέπτυξαν βακτηριαιμία χαρακτηριζόταν από παράταση του χρόνου παραμονής κατά 20.5 ημέρες σε σχέση με τους «μάρτυρες» τους ($p: 0,04$). Όταν η διάρκεια νοσοκομειακής νοσηλείας συγκρίθηκε μεταξύ των υπόλοιπων 32 «ασθενών» οι οποίοι δεν ανέπτυξαν βακτηριαιμία και των αντίστοιχων «μαρτύρων» τους η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p: 0,09$).

Πίνακας 8. Δημογραφικά στοιχεία.

	«Ασθενείς» n: 39	«Μάρτυρες» n: 78
Μέση ηλικία - έτη (εύρος)	59 (5-85)	56 (9-89)
Άνδρες (%) / Γυναίκες (%)	18 (46%)	36 (46%)
Τμήματα		
Λευχαιμίας	17	34
Λεμφώματος	4	8
Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών	18	36
Υποκείμενη νόσος		
Οξεία Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία	3	11
Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία	17	26
Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία	1	2
Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία	2	4
Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο	2	3
Μυελοϊνωση	1	1
Νόσος του Hodgkin's	3	6
Non-Hodgkin's Λέμφωμα	7	17
Πολλαπλό μύελωμα	3	7
Αμυλοείδωση	0	1

Πίνακας 9. Αποτελέσματα.

Μεταβλητές	«Ασθενείς» n = 39 Διάμεση τιμή σε ημέρες (εύρος)	«Μάρτυρες» n = 78 Διάμεση τιμή σε ημέρες (εύρος)	p-value *
Διάμεσος χρόνος έως την τελευταία περιοριστική καλλιέργεια	14 (6-41)	13 (6-40)	NS
Διάμεσος χρόνος αποικισμού	14 (6-41)	-	-
Διάρκεια παραμονής στο νοσοκομείο	26 (8-93)	21 (8-68)	0,001
Αντιβιοτικά			
Αριθμός ασθενών που έλαβε ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά	39 (100%)	68 (87%)	0,029
Αριθμός ημερών σε οποιοδήποτε αντιβιοτικό	10 (3-30)	8 (0-30)	NS
Ενδοφλέβια βανκομυκίνη	3 (0-19)	3 (0-24)	NS
Κεφταζιδίμη	5 (0-16)	2 (0-13)	<0,001
Πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη	0 (0-3)	0 (0-24)	NS
Καρβαπενέμες (Ιμιπενέμη/σιλαστατίνη, μεροπενέμη)	3 (0-19)	0 (0-22)	NS
Tobramycin	0 (0-3)	0 (0-2)	NS
Φλουοροκινολόνες	0 (0-14)	0 (0-23)	NS
Μετρονιδαζόλη	0 (0-15)	0 (0-18)	NS
Μετρονιδαζόλη-κλινδαμυκίνη- καρβαπενέμες- πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη	4 (0-26)	1.5 (0-33)	NS
Μετρονιδαζόλη-κλινδαμυκίνη- καρβαπενέμες	4 (0-26)	1 (0-22)	NS
Αντιμυκητιασικοί παράγοντες			
Αζόλες (Φλουκοναζόλη, βορικοναζόλη)	9 (0-31)	6.5 (0-27)	NS
Αντιμυκητιασικοί παράγοντες (αζόλες, εχινοκανδίνες, πολυένες)	9 (0-38)	9 (0-33)	NS

* NS = Τιμή στατιστικά μη σημαντική ($p > 0.05$)

Πίνακας 10. Αποτελέσματα.

Μεταβλητές	«Ασθενείς» n = 39 Διάμεση τιμή σε ημέρες (εύρος)	«Μάρτυρες» n = 78 Διάμεση τιμή σε ημέρες (εύρος)	p-value **
Ανοσοκατασταλτικά			
Στεροειδή	3 (0-20)	3.5 (0-28)	NS
Κυκλοσπορίνη Α	0 (0-7)	0 (0-28)	NS
Μυκοφαινόλη μοφετίλ	0 (0-22)	0 (0-28)	NS
Τακρόλιμους- Σιρόλιμους	0 (0-22)	0 (0-28)	NS
Βλεννογονίτιδα (διάρκεια σε ημέρες)			
Βλεννογονίτιδα (εντός 2 εβδομάδων)	3 (0-14)	1 (0-14)	NS
Ουδετεροπενία (διάρκεια σε ημέρες)			
Κατά τη διάρκεια 2 εβδομάδων	7 (0-14)	6 (0-14)	NS
Κατά τη διάρκεια 4 εβδομάδων	10 (0-28)	6 (0-28)	NS
Βαρύτητα νόσου (APACHE II)			
1 ημέρα πριν την τελευταία περιοριστική καλλιέργεια	14 (7-23)	14 (5-24)	NS
7 ημέρες πριν την τελευταία περιοριστική καλλιέργεια	14 (5-21)	14 (5-20)	NS

Πίνακας 11. Εβδομαδιαίες καλλιέργειες επιδημιολογικής εποπτείας για την ανίχνευση αποικισμού από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη.

Έτος	Συνολικός αριθμός συλλεχθέντων δειγμάτων	Ποσοστό θετικών περιοριστικών δειγμάτων
2004	169	18.9%
2005	389	19.0%
2006	310	18.3%

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες χαρακτηρίζονται από παρατεταμένες νοσοκομειακές νοσηλείες, ουδετεροπενία, βλενογοννίτιδα και συχνή χορήγηση ενδοφλέβιας αντιβίωσης, παράγοντες που ενδεχομένως προδιαθέτουν σε αποικισμό και λοίμωξη από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη. Στην παρούσα μελέτη ακολουθήσαμε τη συνιστώμενη μεθοδολογία για μελέτες «ασθενών-μαρτύρων» για την αναγνώριση παραγόντων κινδύνου για αποικισμό και λοίμωξη από ανθεκτικά βακτήρια [219]. Συγκεκριμένα, η ομάδα των «μαρτύρων» ήταν αντιπροσωπευτική του συνόλου των αιματολογικών ασθενών, το χρονικό διάστημα της έκθεσης στους υποψήφιους παράγοντες κινδύνου ήταν ίσο για τις δύο ομάδες, ενώ συμπεριελήφθησαν και δεδομένα σχετικά με τη βαρύτητα της νόσου. Χρησιμοποιώντας σαν στοιχείο εξομοίωσης το τμήμα εισαγωγής (τμήματα λευχαιμίας, λεμφώματος και μεταμόσχευσης μυελού των οστών) ελαχιστοποιήθηκε η μεταβλητότητα που προκαλείται από τον ανθρώπινο παράγοντα (τους θεράποντες ιατρούς και το νοσηλευτικό προσωπικό) εις βάρος ωστόσο της μελέτης της υποκείμενης κακοήθειας και των χημειοθεραπευτικών σχημάτων. Το ισότιμο χρονικό διάστημα έκθεσης στους υποψήφιους παράγοντες κινδύνου για τους «ασθενείς» και τους «μάρτυρες» εξασφάλισε τη δυνατότητα ακριβούς μελέτης και σύγκρισης των παραγόντων αυτών.

Η διάμεση τιμή του χρόνου ανίχνευσης του ανθεκτικού στη βανκομυκίνη Εντερόκοκκου στα επιχρίσματα ορθού ήταν 14 ημέρες μετά την εισαγωγή στο νοσοκομείο. Αποικισμός από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη χαρακτηριζόταν από μεγαλύτερο χρόνο παραμονής στο νοσοκομείο ($p: 0,001$). Το εύρημα αυτό είναι σύμφωνο με τη βιβλιογραφία [8, 220] και ήταν ανεξάρτητο από τη βαρύτητα της νόσου που όμως υπολογίστηκε προ του χρόνου αποικισμού και όχι κατά το χρόνο επέλευσης της βακτηριαιμίας. Επίσης, το αποτέλεσμα αυτό ήταν στατιστικά σημαντικό μόνο για το υποσύνολο των ασθενών που στη συνέχεια ανέπτυξαν βακτηριαιμία κατά τη διάρκεια της ίδιας νοσοκομειακής νοσηλείας ($p: 0,04$). Ο μακρύτερος χρόνος νοσηλείας μεταξύ των ασθενών που ανέπτυξαν βακτηριαιμία είτε σχετίζεται άμεσα με την παραμονή τους στο νοσοκομείο για τη θεραπεία της βακτηριαιμίας, είτε είναι απόρροια αυξημένης βαρύτητας νόσου και πιθανών συνυπαρχόντων παθολογικών καταστάσεων που χαρακτήριζε τους ασθενείς αυτούς.

Έκθεση σε αντιβιοτικά είναι ένας καθιερωμένος παράγοντας κινδύνου για αποικισμό από ποικίλα ανθεκτικά μικροβιακά στελέχη. Κατά τη μελέτη της επίδρασης ενός αντιβιοτικού στην εντερική χλωρίδα είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη η δράση τους όχι μόνο στο υπό μελέτη

παθογόνο, αλλά και στην ανταγωνιστική χλωρίδα [71]. Η συγκέντρωση των αντιβιοτικών στο γαστρεντερικό σωλήνα είναι συνάρτηση του βαθμού απέκκρισης τους στο έντερο μέσω των χοληφόρων και για κάποια αντιβιοτικά του βαθμού αδρανοποίησης τους στο γαστρεντερικό σωλήνα. Τέλος, για την κατανόηση των μεταβολών που επιφέρουν τα αντιβιοτικά στην εντερική χλωρίδα είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη ότι μετά από αρκετές ημέρες ενδοφλέβιας θεραπείας επιτυγχάνουν συγκεντρώσεις πολύ υψηλότερες από εκείνες στον ορό του ασθενή. Έτσι το αντιμικροβιακό τους φάσμα στον εντερικό σωλήνα μπορεί να είναι ευρύτερο από εκείνο στο αίμα και στους ιστούς.

Στη παρούσα μελέτη αποδείξαμε ότι προηγηθείσα χορήγηση κεφαζιδίμης σχετίζεται με αποικισμό από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο ($p < 0,001$). Οι κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς έχουν επανειλημμένα συσχετισθεί με αποικισμό και λοίμωξη από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε ασθενείς [46, 221-224] αλλά και σε πειραματικά ζωικά μοντέλα [225]. Αν και το εύρημα αυτό δεν είναι σταθερό σε όλες τις μελέτες και η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας δείχνει συσχετισμούς με μία ποικιλία αντιβιοτικών, οι κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς είναι σταθερά η πιο συσχετιζόμενη κατηγορία αντιβιοτικών. Ωστόσο, οι μελέτες αυτές δεν περιλαμβάνουν ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες.

Ο μηχανισμός με τον οποίο οι κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς αλλοιώνουν την εντερική χλωρίδα παραμένει ασαφής. Παρόλο που η κεφαζιδίμη απεκκρίνεται κυρίως από τα νεφρά, επιτυγχάνει συγκεντρώσεις στην εντερική χλωρίδα μέσω της μερικής απέκκρισης της από τη χολή. Μετά την παρέλευση ημερών η συγκέντρωση της κεφαζιδίμης στο γαστρεντερικό σωλήνα είναι σημαντικά υψηλότερη από αυτή στο αίμα. Στις υψηλές αυτές συγκεντρώσεις, η δράση της είναι εντονότερη στα Gram αρνητικά βακτηρίδια, είναι μέτρια στην αναερόβια χλωρίδα και ελάχιστη στα είδη Εντερόκοκκων [226]. Έχει προταθεί ότι η κεφαζιδίμη προάγει τον αποικισμό, εξαλείφοντας την ανταγωνιστική αναερόβια χλωρίδα. Ωστόσο, η έλλειψη συσχετισμού στην παρούσα μελέτη μεταξύ αποικισμού από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη με αντιβιοτικά με αναερόβια δραστηριότητα έρχεται σε αντίθεση με αυτή την υπόθεση.

Σε μια παλαιότερη δημοσίευση, μελετήθηκε η επίπτωση διαφόρων παρεντερικών αντιβιοτικών στα είδη *Enterococcus faecium* στη χλωρίδα του εντέρου σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες [227]. Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση της παθοφυσιολογίας της βακτηριαιμίας από είδη *Enterococcus faecium*, εκ των οποίων μόνο το 2% των στελεχών χαρακτηρίζονταν από μειωμένη ευαισθησία στη βανκομυκίνη. Η μελέτη αυτή κατέδειξε αύξηση της πυκνότητας ειδών *faecium* έναντι άλλων Εντεροκοκκικών ειδών στο 55% των ασθενών,

εύρημα που συσχετιζόταν με προηγούμενη χρήση κεφαλοσπορινών τρίτης γενιάς στο 93% των ασθενών. Η μελέτη αυτή εισηγείται ότι χορήγηση κεφαλοσπορινών τρίτης γενιάς πιθανά προάγει τον αποικισμό από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη μέσω της επιλεκτικής αύξησης ειδών *faecium* έναντι άλλων Εντεροκοκκικών ειδών. Μέσω της επέκτασης του πληθυσμού ειδών *faecium*, παρέχεται το κατάλληλο βακτηριακό υπόστρωμα για την απόκτηση των γενετικών παραγόντων που καθορίζουν την ανάπτυξη αντοχής έναντι της βανκομυκίνης αλλά και άλλων αντιβιοτικών.

Μία πρόσφατη μελέτη σε ένα πειραματικό μοντέλο ποντικού υπέδειξε ένα εναλλακτικό μηχανισμό με τον οποίο αντιβιοτικά με φάσμα έναντι Gram αρνητικών βακτηριδίων επιδρούν στην εντερική χλωρίδα και ευνοούν την επέκταση των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη Εντεροκοκκικών στελεχών [81]. Η RegIIIγ λεκτίνη παράγεται από το εντερικό επιθήλιο και τα κύτταρα Paneth και ασκεί βακτηριοκτόνο δράση έναντι Gram θετικών βακτηριδίων συμπεριλαμβανομένου και του Εντερόκοκκου. Η παραγωγή του πεπτιδίου RegIIIγ προάγεται από τη λιποπολυσακχαριδική μεμβράνη των Gram αρνητικών. Αντιβιοτικά ευρέως φάσματος χορηγήθηκαν σε μοντέλα ποντικού ανέστειλαν την παραγωγή του πεπτιδίου RegIIIγ με αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση του πληθυσμού Εντεροκοκκικών στελεχών ανθεκτικών στη βανκομυκίνη τα οποία χορηγήθηκαν από την ορογαστρική οδό [81]. Αντίθετα, η από του στόματος χορήγηση λιποπολυσακχαρίδης μείωσε την πυκνότητα των ανθεκτικών Εντερόκοκκων. Σε μία αντίστοιχη μελέτη η χορήγηση φλατζελλίνης (flagellin), δομικό συστατικό του μαστιγίου των Gram αρνητικών και συνδέτη (ligand) των Toll-like receptor 5 (TLR-5), μείωσε σημαντικά τον αποικισμό από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε μοντέλο ποντικού στο οποίο προηγουμένως χορηγήθηκαν αντιβιοτικά ευρέως φάσματος, μέσω προαγωγής του αντιμικροβιακού πεπτιδίου RegIIIγ [82]. Τα αντιβιοτικά που χορηγήθηκαν δεν περιελάμβαναν την κεφταζιδίμη, ωστόσο οι δύο αυτές μελέτες εισηγούνται ένα εναλλακτικό μηχανισμό μέσω του οποίου αντιβιοτικά με Gram αρνητικό φάσμα αλλοιώνουν τη σύσταση της εντερικής χλωρίδας.

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι λόγω της μεθοδολογίας της μελέτης «ασθενών-μαρτύρων», δεν αποδείξαμε αιτιολογική σχέση μεταξύ έκθεσης στην κεφταζιδίμη και στον αποικισμό από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη αλλά μόνο συσχέτιση.

Στην παρούσα μελέτη η πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη δεν συσχετίστηκε με αποικισμό από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη. Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας της επίδρασης της πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης στον αποικισμό από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη κατέδειξε είτε μείωση της συχνότητας αποικισμού [214-216, 228, 229], είτε ουδέτερη δράση [230, 231]. Οι μελέτες αυτές ήταν μεθοδολογικά ποικίλες, οι μελετώμενοι

πληθυσμοί διέφεραν σημαντικά, και δεν ήλεγξαν για συγχυτικούς παράγοντες. Ωστόσο, η πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη έχει σπανίως αναγνωριστεί ως παράγοντας κινδύνου για αποικισμό.

Μέσω της απέκκρισης από τα χοληφόρα, ενδοφλέβια χορήγηση πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης επιτυγχάνει υψηλές συγκεντρώσεις στον εντερικό σωλήνα [232] που υπερβαίνουν τις ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις για τον ανθεκτικό στη βανκομυκίνη Εντερόκοκκο. Σε ένα πειραματικό μοντέλο ποντικού, υποδόρια χορήγηση πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης ανέστειλε τον αποικισμό, όταν στελέχη ανθεκτικού στη βανκομυκίνη Εντερόκοκκου χορηγήθηκαν ταυτόχρονα με το αντιβιοτικό μέσω ορογαστρικού καθετήρα [233]. Ωστόσο, μετά τη διακοπή χορήγησης πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης ο αποικισμός προήχθη προφανώς σαν αποτέλεσμα της διαταραχής που προκάλεσε η πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη στην αναερόβιο χλωρίδα. Σε ασθενείς που αποικίστηκαν από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη η ισχυρή αναερόβιος δράση της πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης προήγαγε υψηλού βαθμού αποικισμό [72].

Στην παρούσα μελέτη δεν αποδείχτηκε συσχέτιση μεταξύ ενδοφλέβιας χρήσης βανκομυκίνης και αποικισμού από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη. Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με την παρεντερική χορήγηση βανκομυκίνης αποδίδει αντιφατικά αποτελέσματα με πολλές μελέτες να αποδεικνύουν συσχέτιση [74, 78, 221-223, 234-237] ενώ άλλες ουδέτερη δράση [28, 76, 238]. Ωστόσο σε μία συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση [80] η οποία συμπεριέλαβε μόνο μελέτες που εξομοίωσαν τις μεταβλητές με τη διάρκεια παραμονής στο νοσοκομείο, η συσχέτιση με την παρεντερική βανκομυκίνη ήταν αδύναμη και όχι στατιστικά σημαντική. Η ίδια μελέτη κατέδειξε σφάλμα επιλεκτικής δημοσίευσης (publication bias) υπέρ μελετών με θετική συσχέτιση. Καθώς η απέκκριση της βανκομυκίνης από τα χοληφόρα είναι αμελητέα δεν αναμένεται οποιαδήποτε δράση στη χλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα. Τέλος, ενδοφλέβια χορήγηση βανκομυκίνης πιθανά αντιπροσωπεύει συγχυτικό παράγοντα ανεπαρκούς εφαρμογής κανόνων υγιεινής καθώς η ευρεία χρήση βανκομυκίνης σχετίζεται με συχνότερη επίπτωση στελεχών *Staphylococcus aureus* ανθεκτικών στη μεθικιλίνη στο νοσοκομειακό περιβάλλον.

Αντιβιοτικά με αναερόβιο αντιμικροβιακό φάσμα έχουν επανειλημμένα συσχετισθεί με αποικισμό και λοίμωξη από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη [46, 76] αν και το εύρημα αυτό δεν είναι σταθερό σε όλες τις μελέτες. Η συσχέτιση αυτή απεικονίζεται καλύτερα σε μία κλινική μελέτη όπου μετρήθηκε η μικροβιακή πυκνότητα ανθεκτικών στελεχών σε κόπρανα ασθενών κατά τη διάρκεια και μετά τη διακοπή χορήγησης αντιμικροβιακής θεραπείας [72]. Στην

πλειοψηφία της η εντερική χλωρίδα απαρτίζεται από υποχρεωτικά αναερόβια και κυρίως είδη από τα γένη *Bacteriodes*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobaccillus* και άλλα γένη μαζί με μία ποικιλία από ζυμομύκητες [239, 240]. Οι μικροοργανισμοί αυτοί σχηματίζουν ένα σύμπλοκο οικοσύστημα το οποίο βρίσκεται σε μία διαρκή δυναμική ισορροπία. Μία από τις λειτουργίες του είναι η αναστολή της αύξησης ενός μικροβιακού πληθυσμού έναντι άλλου. Αυτή η συσχέτιση δεν επιβεβαιώθηκε στην παρούσα μελέτη ακόμα και όταν οι αντιμικροβιακοί παράγοντες με αναερόβια δράση εξετάστηκαν χωρίς να συμπεριληφθεί η πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη που σύμφωνα με κάποιες μελέτες αναστέλλει τον αποικισμό από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη.

Τέλος, σε αντίθεση με άλλες μελέτες δεν αποδείχθηκε συσχέτιση μεταξύ ουδετεροπενίας, βλεννογονίτιδας και αποικισμού από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη. Αυτό πιθανά ερμηνεύεται από τον ορισμό που χρησιμοποιήσαμε για αποικισμό, ο οποίος περιλαμβάνει μόνο ασθενείς με θετικές περιοριστικές καλλιέργειες και όχι εκείνους με θετικές καλλιέργειες αίματος και άλλες μορφές συστηματικών λοιμώξεων όπου οι δύο αυτοί παράγοντες είναι ιδιαίτερα σημαντικοί.

Συμπερασματικά, ο μόνος τροποποιήσιμος παράγοντας κινδύνου που αναγνωρίστηκε στην παρούσα μελέτη ήταν η προηγηθείσα έκθεση στην κεφταζιδίμη. Μολονότι η μελέτη αυτή δεν μπορεί να αποδείξει αιτιολογική σχέση μεταξύ κεφταζιδίμης και αποικισμού από ανθεκτικά στελέχη, τα δεδομένα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον καθορισμό στρατηγικής για τη χρήση αντιβιοτικών με σκοπό τον έλεγχο αποικισμού από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Γ΄

Η επίδραση της υποκατάστασης της κεφταζιδίμης από την πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη στην επίπτωση αποικισμού και βακτηραιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στο Ειδικό Μέρος Α΄ της παρούσας διδακτορικής διατριβής μελετήθηκε η μοριακή επιδημιολογία του αποικισμού και της βακτηραιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε προκειμένου να προσδιοριστεί ο τρόπος μετάδοσης ανθεκτικών στελεχών μεταξύ των ασθενών [241]. Η μελέτη της μοριακής ποικιλομορφίας απέδειξε ότι τα στελέχη ήταν στην πλειοψηφία τους γενετικά ανομοιογενή και ότι ο χαρακτήρας της επιδημίας ήταν πρωτίστως σποραδικός. Τα αποτελέσματα αυτά δεν οδήγησαν στην αναγνώριση μίας κοινής πηγής προέλευσης ανθεκτικών στελεχών, δεν προσδιόρισαν τρόπους μετάδοσης, ούτε κατέδειξαν παραβιάσεις στους κανονισμούς πρόληψης λοιμώξεων και συγκεκριμένα στην τήρηση των κανόνων απομόνωσης επαφής.

Ακολούθησε μελέτη «ασθενών-μαρτύρων» στο Ειδικό Μέρος Β΄ με σκοπό τον προσδιορισμό δυνητικά τροποποιήσιμων παραγόντων κινδύνου που θα μπορούσαν να μεταβληθούν ώστε να περιοριστεί η επιδημία [241]. Η μελέτη «ασθενών-μαρτύρων» παρουσιάστηκε στο δεύτερο μέρος της διδακτορικής διατριβής. Η μελέτη αυτή κατέδειξε συσχέτιση μεταξύ έκθεσης στην κεφταζιδίμη και αποικισμό από ανθεκτικό Εντερόκοκκο ($p < 0.001$). Κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης της μελέτης η κεφταζιδίμη ήταν το αντιβιοτικό πρώτης επιλογής για τη θεραπεία ουδετεροπενικού πυρετού και ποικίλων άλλων λοιμώξεων όπου ενδεικνυόταν αντιβίωση με φάσμα έναντι Gram αρνητικών βακτηριδίων. Ο σχεδιασμός της μελέτης «ασθενών-μαρτύρων» αδυνατούσε να αποδείξει αιτιολογική συσχέτιση ανάμεσα στη χρήση κεφταζιδίμης και στον αποικισμό από ανθεκτικά στελέχη. Παρόλα αυτά, η κεφταζιδίμη υποκαταστάθηκε από την πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη ως αντιβιοτικό πρώτης επιλογής για τη θεραπεία ουδετεροπενικού πυρετού σε μία προσπάθεια να περιοριστεί η επιδημία. Η επίδραση αυτής της θεραπευτικής στρατηγικής στην επίπτωση του αποικισμού και βακτηραιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη παρατίθεται στο Ειδικό Μέρος Γ΄ της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η παρούσα προοπτική μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με αιματολογικά νοσήματα στο νοσοκομείο Roswell Park Cancer Institute στο Buffalo της πολιτείας της Νέας Υόρκης. Το Roswell Park Cancer Institute έχει μέγεθος 120 κλινών και είναι ένα εξειδικευμένο ογκολογικό νοσηλευτικό ίδρυμα. Οι ασθενείς με αιματολογικά νοσήματα εισάγονταν στις μονάδες λευχαιμίας, λεμφώματος και μεταμόσχευσης μυελού των οστών. Η μελέτη εγκρίθηκε από την αρμόδια Επιστημονική Επιτροπή και Επιτροπή Δεοντολογίας του νοσοκομείου. Η επίπτωση αποικισμού και βακτηριαιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη καταγράφηκε προοπτικά. Δημογραφικά στοιχεία και δεδομένα στην κατανάλωση αντιβιοτικών συλλέχθηκαν αναδρομικά.

2.1. Κανονισμός πρόληψης λοιμώξεων

Κατά τη χρονική διάρκεια της μελέτης όλοι οι ασθενείς που εισάγονταν στα αιματολογικά τμήματα υποβάλλονταν σε περιοριστικές καλλιέργειες για την έγκαιρη αναγνώριση αποικισμένων ασθενών στα πλαίσια προγράμματος επιδημιολογικής επιτήρησης (surveillance). Οι αποικισμένοι ασθενείς ετίθεντο σε απομόνωση επαφής για το υπόλοιπο της νοσηλείας τους και κατά τη διάρκεια όλων των συνακόλουθων εισαγωγών στο νοσοκομείο. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιούνταν από την περιοριστική χώρα και σπανιότερα από τα κόπραννα. Τα δείγματα συλλέγονταν κάθε Δευτέρα ανεξάρτητα από την ημέρα εισαγωγής του ασθενή στο νοσοκομείο. Ο κανονισμός αυτός είναι σύμφωνος με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Εταιρείας Νοσοκομειακής Επιδημιολογίας της Αμερικής (Society of Hospital Epidemiology of America, SHEA) [10]. Επίσης, το έτος 2008 μηχανογραφήθηκε το σύστημα των ιατρικών εντολών και της παροχής νοσηλείας. Τέλος, τον Αύγουστο του 2010 η λεβοφλοξασίνη (levofloxacin) προστέθηκε στην προφυλακτική αντιβακτηριδιακή αγωγή των ασθενών με λευχαιμία και των ληπτών μεταμόσχευσης αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων καθ' όλη τη διάρκεια της ουδετεροπενίας ή μέχρι την ανάπτυξη ουδετεροπενικού πυρετού ή λοίμωξης [242].

2.2. Θεραπευτική παρέμβαση και χρονικοί περίοδοι της μελέτης

Βάσει των αποτελεσμάτων της μελέτης «ασθενών-μαρτύρων» που πραγματοποιήθηκε πρωτίτερα σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες [241], την 1^η Ιανουαρίου του 2008 η πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη υποκατέστησε την κεφταζιδίμη ως αντιβιοτικό πρώτης επιλογής για την εμπειρική θεραπεία του ουδετεροπενικού πυρετού. Παρά το γεγονός ότι ο κανονισμός αυτός αφορούσε τη θεραπεία του ουδετεροπενικού πυρετού, η χρήση πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης γενικεύθηκε και αποτέλεσε το αντιβιοτικό πρώτης επιλογής για την πλειοψηφία

των λοιμώξεων όπου υπήρχε ένδειξη για κάλυψη Gram αρνητικών μικροβίων. Συγκρίναμε την επίπτωση αποικισμού και βακτηριαιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε δύο χρονικές περιόδους διάρκειας τριών ετών η κάθε μία. Η πρώτη περίοδος περιλαμβάνει το χρονικό διάστημα από τον Ιανουάριο του 2005 μέχρι το Δεκέμβριο του 2007 και η δεύτερη το χρονικό διάστημα από τον Ιανουάριο του 2008 μέχρι το Δεκέμβριο του 2010 και αντιστοιχούν στη χρήση κεφαζιδίμης και πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης ως αντιβιοτικά πρώτης επιλογής για τη θεραπεία ουδετεροπενικού πυρετού.

2.3. Ορισμοί

Αποικισμός ορίστηκε ως η απομόνωση Εντερόκοκκου ανθεκτικού στη βανκομυκίνη σε δείγματα περιοριστικού επιχρίσματος, κοπράνων ή άλλων βιολογικών δειγμάτων. Βακτηριαιμία από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη ορίστηκε ως η απομόνωση των ανθεκτικών στελεχών από τουλάχιστον μία καλλιέργεια αίματος. Μόνο αποικισμός και βακτηριαιμία από είδη *Enterococcus faecium* συμπεριελήφθησαν στη μελέτη. Η ταυτοποίηση των Εντεροκοκκικών ειδών και ο προσδιορισμός ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά πραγματοποιήθηκε από το μικροβιολογικό εργαστήριο βάσει καθιερωμένων μεθόδων [127, 243].

2.4. Επίπτωση αποικισμού και βακτηριαιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη και χρήσης αντιβιοτικών

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίπτωση του αποικισμού του γαστρεντερικού σωλήνα από ανθεκτικά στελέχη Εντερόκοκκου και η επίπτωση βακτηριαιμίας η οποία αντιπροσωπεύει την πιο συχνή εκδήλωση νόσου από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες. Η επίπτωση αποικισμού του γαστρεντερικού σωλήνα και βακτηριαιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη υπολογίστηκε αρχικά ανά συνολικό αριθμό ασθενών αλλά και ως αριθμός συμβάντων ανά 1.000 ημέρες νοσηλείας ασθενών, συνολικά και κατ' έτος, αφού υπολογίστηκε ο συνολικός αριθμός ημερών νοσηλείας ασθενών για ολόκληρη την ομάδα. Χρήση αντιβιοτικών υπολογίστηκε ως αριθμός ημερών υπό αντιβίωση ανά 1.000 ημέρες νοσηλείας ασθενών για το σύνολο των ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες. Η χρήση αντιβιοτικών καταμετρήθηκε στο σύνολο των ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες ανεξαρτήτως ενδείξεων, αποικισμού ή βακτηριαιμίας. Τα αντιβιοτικά που μελετήθηκαν είναι η κεφαζιδίμη, η πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη, η ιμιπενέμη και η μεροπενέμη, η μετρονιδαζόλη και η βανκομυκίνη. Η ιμιπενέμη και η μεροπενέμη μελετήθηκαν μαζί σε μία ομάδα. Τα αντιβιοτικά αυτά επιλέχθηκαν με κριτήριο τη συχνότητα χρήσης τους στην κλινική πράξη. Τέλος, συνολική έκθεση σε όλα τα αντιβιοτικά υπολογίστηκε αθροιστικά για όλα τα αντιβιοτικά μαζί.

2.5. Βακτηριαμία από *Pseudomonas spp.*, *Escherichia coli* και είδη *Streptococcus viridans*

Η επίπτωση βακτηριαμίας από είδη *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli* και είδη *Pseudomonas* υπολογίστηκε για τη συγκριτική αξιολόγηση της επίπτωσης της βακτηριαμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη. Τα παθογόνα αυτά επελέγησαν διότι όπως και με τα Εντεροκοκκικά είδη η πηγή της βακτηριαμίας σε ουδετεροπενικούς ασθενείς είναι ο γαστρεντερικός σωλήνας και η βακτηριαμία χαρακτηρίζεται από τους ίδιους παράγοντες κινδύνου (ουδετεροπενία και βλεννογονίδια) και παθογενετικούς μηχανισμούς με αυτούς του Εντερόκοκκου. Επίσης τα παθογόνα αυτά αποτελούν συχνά αίτια βακτηριαμίας σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες. Η επίπτωση της βακτηριαμίας υπολογίστηκε επίσης ανά 1.000 ημέρες νοσηλείας ασθενών κατά τη διάρκεια του ίδιου χρονικού διαστήματος και για τον ίδιο πληθυσμό.

2.6. Στατιστική ανάλυση

Ο βαθμός συσχέτισης της επίπτωσης του αποικισμού και της βακτηριαμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη με τη χρήση αντιβιοτικής αγωγής υπολογίστηκε με τον παραμετρικό συντελεστή συσχέτισης Pearson (*Pearson correlation coefficient*). Η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε με τη δοκιμασία του Student (*t-test*) για συνεχείς μεταβλητές και με τη δοκιμή *chi-squared* όπου κρίθηκε απαραίτητο. Όριο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε <0.05 (p -value <0.05).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η πρώτη περίοδος περιλαμβάνει 896 ασθενείς, ενώ η δεύτερη περίοδος 902 ασθενείς. Δημογραφικά δεδομένα, τμήματα εισαγωγής και υποκείμενη νόσος παρατίθενται στον Πίνακα 12.

Ενώ η επίπτωση αποικισμού από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη ανά αριθμό ασθενών δεν μεταβλήθηκε ουσιαστικά στις δύο περιόδους (21.1% και 23.6% αντίστοιχα), η επίπτωση βακτηραιμίας μειώθηκε από 13.4% την πρώτη περίοδο σε 10.2% τη δεύτερη (p : 0.04) (Πίνακας 13). Ωστόσο, ο αριθμός των ασθενών που υποβλήθηκαν σε περιοριστικές καλλιέργειες αυξήθηκε τη δεύτερη περίοδο από 56.9% σε 79,9%.

Κατά την περίοδο οπότε η πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη ήταν το αντιβιοτικό πρώτης επιλογής για τη θεραπεία του ουδετεροπενικού πυρετού, η επίπτωση αποικισμού του γαστρεντερικού σωλήνα μειώθηκε από 6.04 σε 5.52 ανά 1.000 ημέρες νοσηλείας ασθενών αλλά όχι σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο (p : 0.65) (Πίνακας 13 και Εικόνα 19). Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση ανάμεσα στην επίπτωση αποικισμού του γαστρεντερικού σωλήνα και τη χρήση αντιβιοτικών. Η χρήση αντιβιοτικών παρατίθεται στις Εικόνες 20 και 21.

Κατά την περίοδο οπότε η πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη ήταν το αντιβιοτικό πρώτης επιλογής για τη θεραπεία του ουδετεροπενικού πυρετού, η επίπτωση βακτηραιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη μειώθηκε από 3.97 σε 2.62 επεισόδια βακτηραιμίας ανά 1.000 ημέρες νοσηλείας ασθενών (p : 0.004) (Πίνακας 13 και Εικόνα 19). Ο συντελεστής συσχέτισης Pearson κατέδειξε αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στη βακτηραιμία από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη και τη χρήση πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης (Pearson coefficient: -0.88, p : 0.005), και θετική συσχέτιση με τη χρήση μετρονιδαζόλης (Pearson coefficient: 0.91, p : 0.014). Τέλος, τάση προς θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε ανάμεσα στην επίπτωση βακτηραιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη και στη χρήση κεφαζιδίμης (Pearson coefficient: 0.89, p : 0.05). Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση ανάμεσα στην επίπτωση βακτηραιμίας και τη συνολική χρήση αντιβιοτικών. Τέλος, η επίπτωση βακτηραιμίας από είδη *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli* και είδη *Pseudomonas* παρέμεινε σταθερή κατά τη διάρκεια των δύο χρονικών περιόδων της μελέτης (Εικόνα 22).

Πίνακας 12. Δημογραφικά στοιχεία ασθενών και υποκείμενη νόσος.

	Περίοδος Α΄ (2005 - 2007) n = 896	Περίοδος Β΄ (2008 – 2010) n = 902	p-value *
Συνολικός αριθμός ασθενών	896	902	
Μέση ηλικία - έτη (εύρος)	59 (6-98)	59 (5-93)	NS
Άνδρες / Γυναίκες (%)	496 (55%)	517 (57%)	NS
Τμήματα Εισαγωγής			
Τμήμα Λευχαιμίας	423 (47%)	394 (44%)	
Τμήμα Λεμφωμάτων	332 (37%)	370 (41%)	
Τμήμα Μεταμόσχευσης Μυελού Οστών	141 (16%)	138 (15%)	
Υποκείμενη Νόσος			
Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία, Οξεία Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία	345 (39%)	312 (34%)	
Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο Μυελοϋπερπλαστικό σύνδρομο	88 (10%)	105 (12%)	
Νόσος του Hodgkin's, Non-Hodgkin's Λέμφωμα, Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία	326 (36%)	337 (37%)	
Πολλαπλό μυέλωμα, Αμυλοείδωση	111 (12%)	114 (13%)	
Άλλα νοσήματα**	26 (3%)	34 (4%)	
Αριθμός εισαγωγών στο νοσοκομείο	2321	2819	
Διάρκεια παραμονής στο νοσοκομείο	13.5 (1-122)	13.1 (1-411)	NS

* NS = Τιμή στατιστικά μη σημαντική ($p > 0.05$)

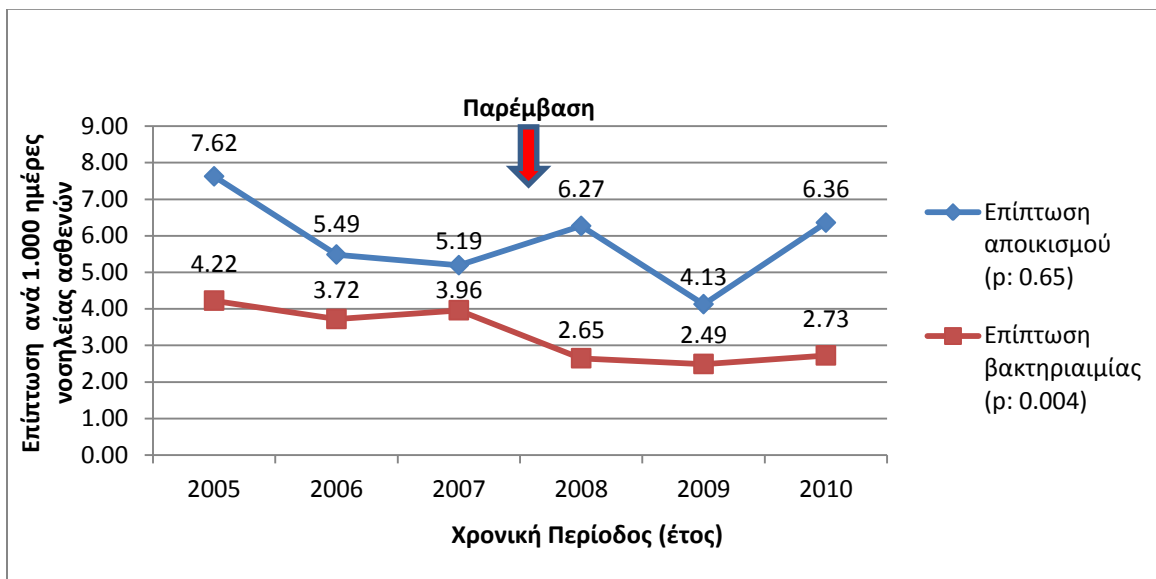
** Άλλα νοσήματα: Απλαστική αναιμία, Νόσος Kikuchi, νεοπλάσματα όρχεως, αδιευκρίνιστα νοσήματα.

Πίνακας 13. Επίπτωση αποικισμού και βακτηριαμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες.

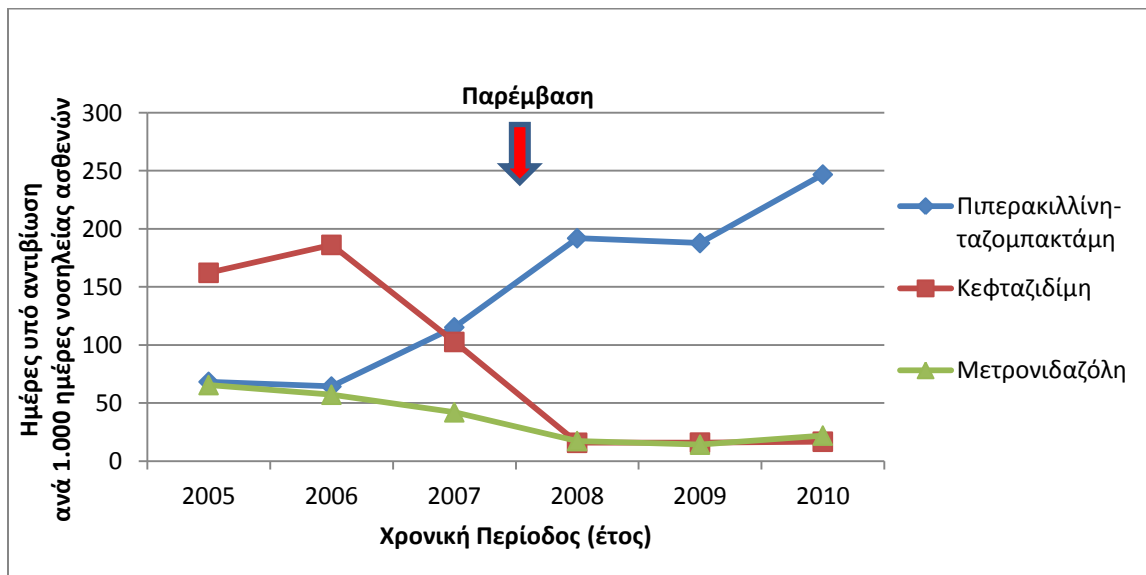
	Περίοδος Α΄ (2005 - 2007) n = 896	Περίοδος Β΄ (2008 – 2010) n = 902	p-value *
Αποικισμός			
Αποικισμός (ανά αριθμό ασθενών), (%)	189 (21.1%)	213 (23.6%)	NS
Αποικισμός (ανά 1000 ημέρες νοσηλείας ασθενών)	6.04	5.52	NS
Βακτηριαμία			
Βακτηριαμία (ανά αριθμό ασθενών), (%)	120 (13.4%)	92 (10.2%)	p: 0.04
Βακτηριαμία (ανά 1000 ημέρες νοσηλείας ασθενών)	3.97	2.62	p: 0.004

* NS = Τιμή στατιστικά μη σημαντική ($p > 0.05$)

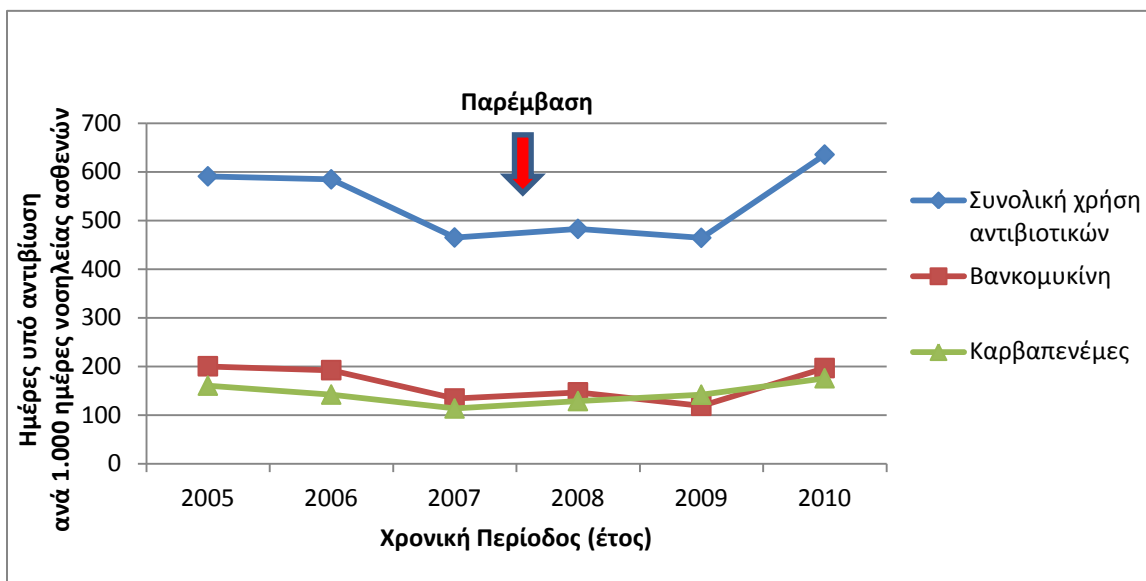
Εικόνα 19. Επίπτωση αποικισμού και βακτηριαμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες.



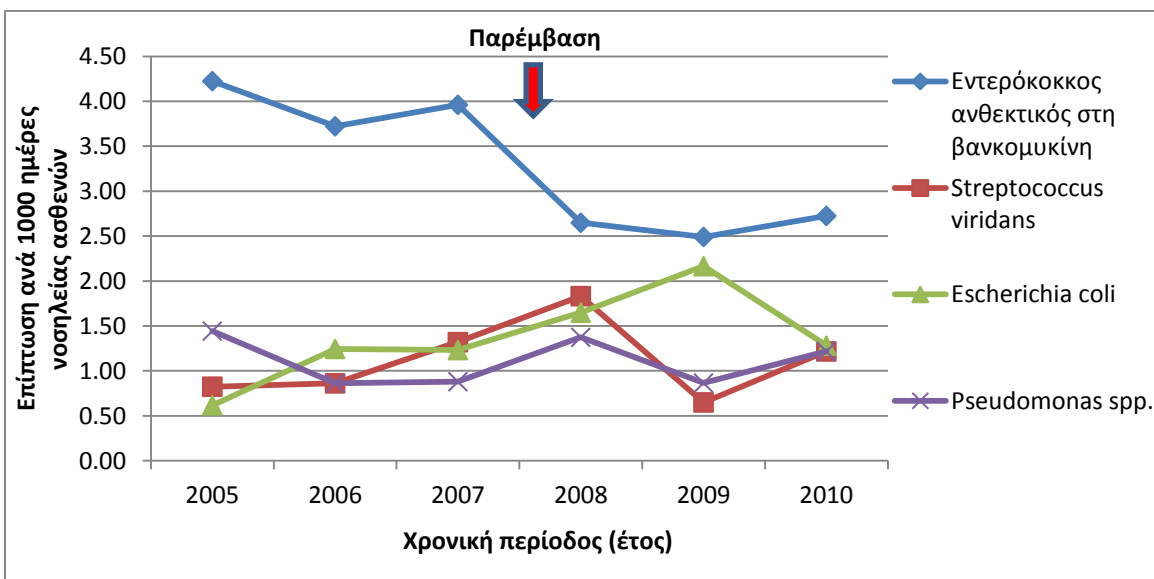
Εικόνα 20. Χρήση αντιβιοτικών σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες.



Εικόνα 21. Χρήση αντιβιοτικών σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες.



Εικόνα 22. Επίπτωση βακτηριαμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., και είδη *Streptococcus viridans*.



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πρόληψη λοιμώξεων από ανθεκτικά βακτηρίδια με παρεμβάσεις που βασίζονται στη στρατηγική χρήσης συγκεκριμένων αντιβιοτικών έχει το πλεονέκτημα ότι δεν απαιτεί συμμόρφωση του προσωπικού με κανονισμούς, αλλά μόνο προϋποθέτει την τήρηση των θεραπευτικών πρακτικών. Η στρατηγική χρήσης της πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης ως αντιβιοτικό πρώτης επιλογής για την εμπειρική θεραπεία του ουδετεροπενικού πυρετού και άλλων λοιμώξεων ήταν η μόνη εμφανής παρέμβαση τη χρονική εκείνη περίοδο. Δεν υπήρχαν ταυτόχρονες μεταβολές στην πολιτική πρόληψης λοιμώξεων αν και δεν έχουμε πλήρη στοιχεία σχετικά με τη συμμόρφωση του προσωπικού με τις πρακτικές απομόνωσης επαφής. Ενώ αυξήθηκε σημαντικά ο αριθμός των ασθενών που υποβάλλονταν σε περιοριστικές καλλιέργειες τη δεύτερη περίοδο, ο αποικισμός ασθενών από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη παρέμεινε σταθερός.

Η υποκατάσταση της κεφαζιδίδης από πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη συνιστά μία διπλή παρέμβαση. Αφενός περιλαμβάνει τη μείωση της χρήσης κεφαζιδίδης, αφετέρου τη σημαντική αύξηση στη θεραπευτική χρήση της πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης. Ο συντελεστής συσχέτισης Pearson κατέδειξε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης και της επίπτωσης βακτηριαιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη (Pearson coefficient: -0.88, p : 0.005) και τάση προς θετική συσχέτιση ανάμεσα στην επίπτωση βακτηριαιμίας και την κατανάλωση κεφαζιδίδης (Pearson coefficient: 0.89, p : 0.05). Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί ότι ο συντελεστής συσχέτισης Pearson δεν αποδεικνύει αιτιολογική σχέση. Σε αντίθεση με τη βιβλιογραφία, δεν αποδείχθηκε συσχέτιση μεταξύ συνολικής κατανάλωσης αντιβιοτικών και βακτηριαιμίας.

Ο συντελεστής συσχέτισης Pearson απέδειξε θετική συσχέτιση με τη χρήση μετρονιδαζόλης (Pearson coefficient: 0.91, p : 0.014) όχι όμως με άλλα αντιβιοτικά που έχουν αναερόβιο δράση. Η ασυμφωνία αυτή πιθανά ερμηνεύεται από το γεγονός ότι η μετρονιδαζόλη χρησιμοποιείται εμπειρικά σε συνδυασμό με την κεφαζιδίδη σε λοιμώξεις όπου ο γαστρεντερικός σωλήνας αποτελεί πιθανή εστία λοίμωξης. Ωστόσο, ο γαστρεντερικός σωλήνας αντιπροσωπεύει την πιο συχνή πηγή βακτηριαιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε ασθενείς με ουδετεροπενικό πυρετό και προφανώς αποτελεί συγχυτικό παράγοντα μεταξύ της προσθήκης μετρονιδαζόλης στο θεραπευτικό σχήμα και της βακτηριαιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη.

Η έκθεση σε κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς είναι ένας καθιερωμένος παράγοντας κινδύνου για λοίμωξη από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη [46, 221-225], ενώ η πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη δεν έχει συσχετισθεί με αποικισμό ή λοίμωξη από ανθεκτικό Εντερόκοκκο. Αντίθετα μία σειρά μελετών απέδειξαν όφελος από την υποκατάσταση των κεφαλοσπορινών από πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη [214, 215, 228, 229, 244] αν και σφάλμα δημοσίευσης (publication bias) υπέρ μελετών που αποδεικνύουν όφελος είναι πολύ πιθανό. Μόνο μία μελέτη αναφέρεται σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες [215]. Πιο συγκεκριμένα, υποκατάσταση κεφταζιδίμης από πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη συνοδεύτηκε από σημαντική μείωση της συχνότητας αποικισμού από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη. Όταν η πρακτική αυτή εγκαταλείφθηκε και η κεφταζιδίμη επανήλθε ως το αντιβιοτικό πρώτης επιλογής η συχνότητα του αποικισμού αυξήθηκε. Όμοια ήταν τα συμπεράσματα μελετών σε ασθενείς μονάδας εντατικής θεραπείας τραύματος και εγκαυμάτων [229] καθώς και σε ένα νοσηλευτικό ίδρυμα τριτοπαθούς φροντίδας [228] όπου η χρήση κεφαλοσπορινών τρίτης γενιάς μειώθηκε, ενώ η χρήση πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης αυξήθηκε. Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι οι μελέτες αυτές διαφέρουν μεθοδολογικά και περιλαμβάνουν περισσότερες από μία ταυτόχρονες παρεμβάσεις όπως ενδυνάμωση των μέτρων πρόληψης λοιμώξεων.

Σε ένα πειραματικό μοντέλο ποντικού, η υποδόρια χορήγηση πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης ανέστειλε τον αποικισμό όταν ενοφθάλμισμα Εντερόκοκκου ανθεκτικού στη βανκομυκίνη χορηγήθηκε ταυτόχρονα από την ορογαστρική οδό [233]. Μέσω της απέκκρισης από τα χοληφόρα, η πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη επιτυγχάνει υψηλές συγκεντρώσεις στον εντερικό σωλήνα οι οποίες υπερβαίνουν την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση για στελέχη Εντερόκοκκου ανθεκτικού στη βανκομυκίνη. Ωστόσο στην ίδια μελέτη, ο αποικισμός προήχθη μετά τη διακοπή της χορήγησης πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης, πιθανά λόγω της διαταραχής που προκάλεσε η αντιβίωση στην αναερόβιο χλωρίδα.

Αντίθετα, σε μία μελέτη ασθενών μονάδας εντατικής θεραπείας η συχνότητα αποικισμού από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη δεν διέφερε σε ασθενείς που θεραπεύτηκαν με κεφεπίμη έναντι αυτών που θεραπεύτηκαν με πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη [245]. Ωστόσο, σε αντίθεση με την κεφταζιδίμη, η απέκκριση της κεφεπίμης στα χοληφόρα είναι αμελητέα και κατά συνέπεια δεν αναμένεται να προκαλεί διαταραχή στη φυσιολογική εντερική χλωρίδα. Επιπλέον, στη μελέτη αυτή δεν αξιολογήθηκε η επίδραση των αντιβιοτικών στην επίπτωση βακτηριαιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη. Επίσης, σε μία αναδρομική οικολογική μελέτη σε τέσσερα ακαδημαϊκά νοσηλευτικά ιδρύματα των ΗΠΑ, όπου εξετάστηκε η συσχέτιση της κατανάλωσης πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης με τη συχνότητα απομόνωσης στελεχών

Εντερόκοκκων ανθεκτικών στη βανκομυκίνη σε καλλιέργειες ασθενών, δεν υπήρξε όφελος από τη χρήση αντιβιοτικών με δράση έναντι των Εντερόκοκκων [230]. Ωστόσο, πέρα από τον οικολογικό σχεδιασμό της μελέτης, η κατανάλωση του αντιβιοτικού συσχετίστηκε με την επίπτωση του ανθεκτικού Εντερόκοκκου σε ολόκληρο τον πληθυσμό και όχι σε υποομάδες ασθενών όπως ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες.

Η κατασταλτική δράση της πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης στον αποικισμό από στελέχη Εντερόκοκκου ανθεκτικού στη βανκομυκίνη ασκείται με διάφορους μηχανισμούς. Η συντριπτική πλειοψηφία των στελεχών του ανθεκτικού στη βανκομυκίνη Εντερόκοκκου είναι ανθεκτική και στην πενικιλίνη. Μέσω της απέκκρισής της από τα χοληφόρα στο γαστρεντερικό σωλήνα, η πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη εξαλείφει στελέχη Εντερόκοκκων ευαίσθητα στην αμπικιλίνη. Έτσι μειώνει τον αριθμό των διαθέσιμων στελεχών που είναι κατάλληλα να δεχτούν τους γενετικούς παράγοντες που καθορίζουν αντοχή έναντι της βανκομυκίνης και η δυνατότητα ανάπτυξης αποικισμού ελαχιστοποιείται. Εκτός αυτού, μετά από αδιάλειπτη ενδοφλέβια χορήγηση η συγκέντρωση της πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης στο γαστρεντερικό σωλήνα υπερβαίνει την ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα για στελέχη Εντερόκοκκου ανθεκτικού στη βανκομυκίνη ασκώντας βακτηριοστατική δράση. Έτσι αναστέλλει την εξάπλωση και την επικράτηση τους έναντι ανταγωνιστικής χλωρίδας στο γαστρεντερικό σωλήνα [233]. Σε αμφότερες τις περιπτώσεις, η πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη αποτρέπει τον αποικισμό αναστέλλοντας άμεσα ή έμμεσα την επέκταση των ανθεκτικών στελεχών.

Τέλος, δύο πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν το σημαντικό ρόλο της φυσικής ανοσίας στον αποικισμό του γαστρεντερικού σωλήνα από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη [81]. Το πεπτιδίιο RegIIIγ είναι μία λεκτίνη η οποία παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα Paneth του λεπτού εντέρου και χαρακτηρίζεται από βακτηριοκτόνο δράση έναντι Gram θετικών βακτηριδίων. Το πεπτιδίιο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση και ισορροπία της φυσιολογικής χλωρίδας στο γαστρεντερικό σωλήνα. Η παραγωγή της αντιμικροβιακής λεκτίνης RegIIIγ προάγεται από τη λιποπολυσακχαριδική μεμβράνη των Gram αρνητικών. Σε πειραματικό μοντέλο ποντικού, αντιβιοτικά ευρέως φάσματος ανέστειλαν την παραγωγή του αντιμικροβιακού πεπτιδίου RegIIIγ μέσω της εξάλειψης της Gram αρνητικής χλωρίδας του εντέρου [81]. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την επέκταση και επικράτηση στελεχών Εντερόκοκκων ανθεκτικών στη βανκομυκίνη όταν τα ανθεκτικά στελέχη χορηγήθηκαν στα ποντίκια αυτά από την ορογαστρική οδό. Αντιθέτως από του στόματος χορήγηση λιποπολυσακχαρίδης μείωσε την πυκνότητα των ανθεκτικών Εντερόκοκκων [81]. Σε μία άλλη μελέτη η συστηματική χορήγηση φλατζελλίνης (flagellin), συστατικό του μαστιγίου των Gram αρνητικών και συνδέτη (ligand) των

Toll-like receptor 5 (TLR-5), σε πειραματικό μοντέλο ποντικού στο οποίο είχαν προηγουμένως χορηγηθεί αντιβιοτικά ευρέως φάσματος, μείωσε σημαντικά τον αποικισμό από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη μέσω προαγωγής του αντιμικροβιακού πεπτιδίου RegIIIγ [82]. Αν και τα αντιβιοτικά που χορηγήθηκαν δεν περιελάμβαναν την κεφαζιδίμη ή την πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη, οι δύο αυτές μελέτες καταδεικνύουν τους πολλαπλούς και σύμπλοκους μηχανισμούς με τους οποίους τα αντιβιοτικά ασκούν τη δράση τους στην εντερική χλωρίδα.

Μειονεκτήματα της παρούσας μελέτης περιλαμβάνουν την έλλειψη δεδομένων σχετικά με πιθανές μεταβολές των χαρακτηριστικών των ασθενών στις δύο χρονικές περιόδους και την έλλειψη ελέγχου για συγχυτικούς παράγοντες. Επίσης, σημαντικό είναι το σφάλμα που συνδέεται με τις οικολογικές μελέτες εν γένει και είναι το αποτέλεσμα της χρήσης δεδομένων που αντιστοιχούν σε ολόκληρο τον πληθυσμό παρά δεδομένων που αντιστοιχούν στον κάθε ασθενή ατομικά. Κατά συνέπεια δεν μπορούμε να αποκλείσουμε μία συμπτωματική μείωση στην επίπτωση του αποικισμού και της βακτηριαιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη για μη εμφανείς λόγους. Τέλος, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης πρέπει να ερμηνευθούν με προσοχή καθώς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η μοριακή επιδημιολογία και οι παράγοντες κινδύνου για αποικισμό από ανθεκτικό Εντερόκοκκο ποικίλουν ευρύτατα μεταξύ νοσηλευτικών ιδρυμάτων και πληθυσμών ασθενών.

Συμπερασματικά, πέρα από την ορθολογική χρήση των αντιβιοτικών, η χρήση πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης μπορεί να περιορίσει την επίπτωση βακτηριαιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες.

ΣΥΝΟΨΗ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΩΝ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η επιδημιολογία του αποικισμού και της βακτηριαιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες. Αρχικά εξετάσαμε τη μοριακή επιδημιολογία του αποικισμού και της βακτηριαιμίας από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη σε ασθενείς που εισήχθησαν στα αιματολογικά τμήματα κατά τη διάρκεια ενός έτους. Κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης της μελέτης όλοι οι ασθενείς που εισάγονταν στις αιματολογικές μονάδες υποβάλλονταν σε εβδομαδιαία περιοριστική καλλιέργεια για την έγκαιρη αναγνώριση αποικισμένων ασθενών. Οι αποικισμένοι ασθενείς ετίθεντο σε απομόνωση επαφής. Σε γονοτυπική ανάλυση υποβλήθηκαν στελέχη που απομονώθηκαν από περιοριστικές καλλιέργειες και από καλλιέργειες αίματος. Μόνο ανθεκτικά στη βανκομυκίνη στελέχη είδους *Enterococcus faecium* περιελήφθησαν στη μελέτη. Η μοριακή ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Για την πέψη του βακτηριακού DNA χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο SmaI. Με την εξαίρεση μικρών κλώνων τα ανθεκτικά στελέχη ήταν γενετικά ανομοιογενή. Η γονοτυπική ανάλυση κατέδειξε τον πρωτίτως σποραδικό χαρακτήρα της επιδημίας. Η μοριακή επιδημιολογία δεν κατέδειξε μία κοινή πηγή περιβαλλοντικής προέλευσης ανθεκτικών στελεχών, τρόπους μετάδοσης ή παραβιάσεις στον κανονισμό πρόληψης λοιμώξεων και στην απομόνωση επαφής. Επιπλέον παρατηρήθηκε μεγαλύτερη γενετική ομοιογένεια συνολικά μεταξύ στελεχών καλλιεργείων αίματος από ότι μεταξύ στελεχών περιοριστικών καλλιεργείων. Αυτό συνηγορεί υπέρ επιλογής συγκεκριμένου φαινότυπου που χαρακτηρίζεται από παθογονικότητα και ικανότητα επιβίωσης στο αίμα.

Το δεύτερο μέρος της διδακτορικής διατριβής περιλαμβάνει μία μελέτη «ασθενών-μαρτύρων» που σκοπό είχε την αναγνώριση δυνητικά τροποίσιμων παραγόντων κινδύνου για αποικισμό από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη. Η ομάδα των «ασθενών» περιέλαβε ασθενείς που αποικίστηκαν από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη κατά τη διάρκεια παραμονής τους στο νοσοκομείο, ενώ η ομάδα των «μαρτύρων» περιέλαβε ασθενείς που παρέμειναν αρνητικοί για αποικισμό παρά την έκθεσή τους στο νοσοκομειακό περιβάλλον. «Ασθενείς» και «μάρτυρες» εξομοιώθηκαν ατομικά με σταθερό ηλικιακό 1:2 με βάση την ηλικία, το φύλο και το τμήμα εισαγωγής. Η μελέτη περιέλαβε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες από μία χρονική περίοδο τριών ετών. Η έκθεση στους υποψήφιους παράγοντες κινδύνου καταγράφηκε για ίσο χρονικό διάστημα για τους «ασθενείς» και τους «μάρτυρες». Η μελέτη συμπεριέλαβε 39 ασθενείς και 78 μάρτυρες και κατέδειξε θετική συσχέτιση μεταξύ προηγηθείσας έκθεσης στην κεφαζιδίμη και αποικισμό από Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη

βανκομυκίνη ($p: <0.001$). Αποικισμός επήλθε σε μία διάμεση τιμή 14 ημερών και οι αποικισμένοι ασθενείς χαρακτηρίζονταν από μεγαλύτερη διάρκεια παραμονής στο νοσοκομείο σε σχέση με τους μάρτυρες. Χορήγηση βανκομυκίνης ενδοφλεβίως, αντιβιοτικών με ισχυρή αντιαναερόβιο δράση και συνολική έκθεση σε αντιβιοτικά δεν συσχετίσθηκε με αποικισμό από *Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη*. Τέλος, η παρουσία βλεννογονίτιδας και ουδετεροπενίας όπως και η βαρύτητα της νόσου δεν αναδείχθηκαν ως παράγοντες κινδύνου. Συμπερασματικά, παράγοντας κινδύνου για αποικισμό αποτελεί η έκθεση στην κεφταζιδίμη και όχι χαρακτηριστικά του ξενιστή.

Βάσει των αποτελεσμάτων της μελέτης «ασθενών-μαρτύρων» που ανέδειξε ως παράγοντα κινδύνου την προηγηθείσα χορήγηση κεφταζιδίμης, αποφασίστηκε μία μεταβολή στη στρατηγική αντιβιοτικής θεραπείας με στόχο τον περιορισμό της έκθεσης στην κεφταζιδίμη. Η θεραπευτική αυτή παρέμβαση συνίστατο στην υποκατάσταση της κεφταζιδίμης από πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη ως αντιβιοτικό πρώτης επιλογής στη θεραπεία ασθενών με ουδετεροπενικό πυρετό. Το τρίτο μέρος της διδακτορικής διατριβής περιλαμβάνει τη μελέτη της επίδρασης που είχε η παρέμβαση αυτή στην επίπτωση του αποικισμού και της βακτηριαιμίας από *Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη* σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες. Η επίπτωση μελετήθηκε κατά τη διάρκεια δύο χρονικών περιόδων τριετούς διάρκειας η κάθε μία, οπότε η κεφταζιδίμη και η πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη αποτελούσαν αντίστοιχα το αντιβιοτικό πρώτης επιλογής για τη θεραπεία του ουδετεροπενικού πυρετού. Η επίπτωση συσχετίσθηκε με τη χρήση μίας σειράς αντιβιοτικών σε ολόκληρο τον πληθυσμό αιματολογικών ασθενών κατά τη διάρκεια των δύο αυτών χρονικών περιόδων με τον παραμετρικό συντελεστή συσχέτισης Pearson. Κατά τη περίοδο κατά την οποία η πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη αποτελούσε το αντιβιοτικό πρώτης επιλογής στη θεραπεία του ουδετεροπενικού πυρετού, η επίπτωση αποικισμού από *Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη* μειώθηκε από 6.04 σε 5.52 επεισόδια αποικισμού ανά 1.000 ημέρες νοσηλείας ασθενών αλλά όχι σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο ($p: 0.65$). Κατά την ίδια περίοδο, η επίπτωση βακτηριαιμίας μειώθηκε από 3.97 σε 2.62 επεισόδια βακτηριαιμίας ανά 1.000 ημέρες νοσηλείας ασθενών ($p: 0.004$). Ο συντελεστής συσχέτισης Pearson κατέδειξε αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στη βακτηριαιμία από *Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη* και τη χρήση πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης ($p: 0.005$) συνηγορώντας υπέρ προστατευτικής δράσης έναντι βακτηριαιμίας και συστηματικών λοιμώξεων. Τάση προς θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε ανάμεσα στην επίπτωση βακτηριαιμίας και στη χρήση κεφταζιδίμης ($p: 0.05$). Τέλος, δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση ανάμεσα στη επίπτωση βακτηριαιμίας και τη συνολική χρήση αντιβιοτικών. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη χάραξη μίας στρατηγικής με σκοπό την πρόληψη βακτηριαιμίας από *Εντερόκοκκο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη* και των επιπλοκών τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Murray, B.E., *The life and times of the Enterococcus*. Clin Microbiol Rev, 1990. **3**(1): p. 46-65.
2. Arias, C.A. and B.E. Murray, *Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2008. **6**(5): p. 637-55.
3. Hidron, A.I., et al., *NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2008. **29**(11): p. 996-1011.
4. DiazGranados, C.A. and J.A. Jernigan, *Impact of vancomycin resistance on mortality among patients with neutropenia and enterococcal bloodstream infection*. J Infect Dis, 2005. **191**(4): p. 588-95.
5. Zirakzadeh, A., et al., *Vancomycin-resistant enterococcal colonization appears associated with increased mortality among allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients*. Bone Marrow Transplant, 2008. **41**(4): p. 385-92.
6. Salgado, C.D. and B.M. Farr, *Outcomes associated with vancomycin-resistant enterococci: a meta-analysis*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2003. **24**(9): p. 690-8.
7. Vergis, E.N., et al., *Determinants of vancomycin resistance and mortality rates in enterococcal bacteremia. a prospective multicenter study*. Ann Intern Med, 2001. **135**(7): p. 484-92.
8. Carmeli, Y., et al., *Health and economic outcomes of vancomycin-resistant enterococci*. Arch Intern Med, 2002. **162**(19): p. 2223-8.
9. Matar, M.J., et al., *Colonization and infection with vancomycin-resistant Enterococcus among patients with cancer*. Am J Infect Control, 2006. **34**(8): p. 534-6.
10. Muto, C.A., et al., *SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of Staphylococcus aureus and enterococcus*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2003. **24**(5): p. 362-86.
11. DiazGranados, C.A., et al., *Comparison of mortality associated with vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bloodstream infections: a meta-analysis*. Clin Infect Dis, 2005. **41**(3): p. 327-33.
12. *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus--Pennsylvania, 2002*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2002. **51**(40): p. 902.
13. Hageman, J.C., et al., *Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus in a home health-care patient*. Emerg Infect Dis, 2001. **7**(6): p. 1023-5.
14. Chang, S., et al., *Infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus containing the vanA resistance gene*. N Engl J Med, 2003. **348**(14): p. 1342-7.
15. Thiercelin, E., *Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene*. . C R Soc Biol., 1899. **5**: p. 269-271.
16. MacMallum, W.G., Hastings, T.W., *A case of acute endocarditis caused by Micrococcus zymogenes (nov. spec.), with a description of the microorganism*. J Exp Med., 1899. **4**: p. 521-534.
17. Andrews, F., Horder, T., *A study of streptococcal pathogenic for man*. Lancet, 1906. **2**: p. 708-713.
18. Orla-Jensen, S., *The lactic acid bacteria*. Mem. Acad. R. Soc. Danemark Sect. Sci. Ser., 1919. **8**(5): p. 81-197.
19. Sherman, J.M., *The Streptococci*. Bacteriol Rev, 1937. **1**(1): p. 3-97.
20. Kalina, A., *The taxonomy and nomenclature of Enterococci*. J Syst Bacteriol, 1970. **20**: p. 185-189.

21. Schleifer, K.H., Kilpper-Baltz, 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**: p. 31-34.
22. Mederski-Samoraj, B.D. and B.E. Murray, *High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of enterococci.* J Infect Dis, 1983. **147**(4): p. 751-7.
23. Uttley, A.H., et al., *Vancomycin-resistant enterococci.* Lancet, 1988. **1**(8575-6): p. 57-8.
24. Leclercq, R., et al., *Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in Enterococcus faecium.* N Engl J Med, 1988. **319**(3): p. 157-61.
25. Sahm, D.F., et al., *In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant Enterococcus faecalis.* Antimicrob Agents Chemother, 1989. **33**(9): p. 1588-91.
26. Kirst, H.A., D.G. Thompson, and T.I. Nicas, *Historical yearly usage of vancomycin.* Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(5): p. 1303-4.
27. Al-Nassir, W.N., et al., *Both oral metronidazole and oral vancomycin promote persistent overgrowth of vancomycin-resistant enterococci during treatment of Clostridium difficile-associated disease.* Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(7): p. 2403-6.
28. Husni, R., et al., *Risk factors for vancomycin-resistant Enterococcus (VRE) infection in colonized patients with cancer.* Infect Control Hosp Epidemiol, 2002. **23**(2): p. 102-3.
29. Wegener, H.C., et al., *Use of antimicrobial growth promoters in food animals and Enterococcus faecium resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe.* Emerg Infect Dis, 1999. **5**(3): p. 329-35.
30. Beargie, R., et al., *Perinatal infection and vaginal flora.* Am J Obstet Gynecol, 1975. **122**(1): p. 31-3.
31. Smyth, C.J., M.K. Halpenny, and S.J. Ballagh, *Carriage rates of enterococci in the dental plaque of haemodialysis patients in Dublin.* Br J Oral Maxillofac Surg, 1987. **25**(1): p. 21-33.
32. Noble, C.J., *Carriage of group D streptococci in the human bowel.* J Clin Pathol, 1978. **31**(12): p. 1182-6.
33. Enzensberger, R., P.M. Shah, and H. Knothe, *Impact of oral ciprofloxacin on the faecal flora of healthy volunteers.* Infection, 1985. **13**(6): p. 273-5.
34. Edmond, M.B., et al., *Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis.* Clin Infect Dis, 1999. **29**(2): p. 239-44.
35. Wisplinghoff, H., et al., *Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study.* Clin Infect Dis, 2004. **39**(3): p. 309-17.
36. Deshpande, L.M., et al., *Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program.* Diagn Microbiol Infect Dis, 2007. **58**(2): p. 163-70.
37. Sahm, D.F., M.K. Marsilio, and G. Piazza, *Antimicrobial resistance in key bloodstream bacterial isolates: electronic surveillance with the Surveillance Network Database--USA.* Clin Infect Dis, 1999. **29**(2): p. 259-63.
38. Schouten, M.A., A. Voss, and J.A. Hoogkamp-Korstanje, *Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci causing infections in Europe. The European VRE Study Group.* Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(10): p. 2542-6.
39. Treitman, A.N., et al., *Emerging incidence of Enterococcus faecium among hospital isolates (1993 to 2002).* J Clin Microbiol, 2005. **43**(1): p. 462-3.
40. *National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004.* Am J Infect Control, 2004. **32**(8): p. 470-85.
41. Ramsey, A.M. and M.D. Zilberberg, *Secular trends of hospitalization with vancomycin-resistant enterococcus infection in the United States, 2000-2006.* Infect Control Hosp Epidemiol, 2009. **30**(2): p. 184-6.

42. *European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009.* Available at: www.ecdc.europa.eu.
43. *Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology (ICARE) Surveillance Report, data summary from January 1996 through December 1997: A report from the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System.* Am J Infect Control, 1999. **27**(3): p. 279-84.
44. Barbosa, D., et al., *Evaluation of the prevalence and risk factors for colonization by vancomycin-resistant Enterococcus among patients on dialysis.* Am J Kidney Dis, 2004. **44**(2): p. 337-43.
45. Rolston, K.V., Y. Jiang, and M. Matar, *VRE fecal colonization/infection in cancer patients.* Bone Marrow Transplant, 2007. **39**(9): p. 567-8.
46. McNeil, S.A., et al., *Vancomycin-resistant enterococcal colonization and infection in liver transplant candidates and recipients: a prospective surveillance study.* Clin Infect Dis, 2006. **42**(2): p. 195-203.
47. Freitas, M.C., et al., *Prevalence of vancomycin-resistant Enterococcus faecium fecal colonization among kidney transplant patients.* BMC Infect Dis, 2006. **6**: p. 133.
48. Willems, R.J., et al., *Global spread of vancomycin-resistant Enterococcus faecium from distinct nosocomial genetic complex.* Emerg Infect Dis, 2005. **11**(6): p. 821-8.
49. Homan, W.L., et al., *Multilocus sequence typing scheme for Enterococcus faecium.* J Clin Microbiol, 2002. **40**(6): p. 1963-71.
50. Leavis, H., et al., *A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of Enterococcus faecium and associated with epidemicity.* J Bacteriol, 2004. **186**(3): p. 672-82.
51. Reid, K.C., I.F. Cockerill, and R. Patel, *Clinical and epidemiological features of Enterococcus casseliflavus/flavescens and Enterococcus gallinarum bacteremia: a report of 20 cases.* Clin Infect Dis, 2001. **32**(11): p. 1540-6.
52. Drees, M., et al., *Prior environmental contamination increases the risk of acquisition of vancomycin-resistant enterococci.* Clin Infect Dis, 2008. **46**(5): p. 678-85.
53. Murray, B.E., et al., *Intrahospital spread of a single gentamicin-resistant, beta-lactamase-producing strain of Enterococcus faecalis in Argentina.* Antimicrob Agents Chemother, 1992. **36**(1): p. 230-2.
54. Murray, B.E., et al., *Evidence for clonal spread of a single strain of beta-lactamase-producing Enterococcus (Streptococcus) faecalis to six hospitals in five states.* J Infect Dis, 1991. **163**(4): p. 780-5.
55. Fridkin, S.K., et al., *Epidemiology of a dominant clonal strain of vancomycin-resistant Enterococcus faecium at separate hospitals in Boston, Massachusetts.* J Clin Microbiol, 1998. **36**(4): p. 965-70.
56. Noskin, G.A., et al., *Recovery of vancomycin-resistant enterococci on fingertips and environmental surfaces.* Infect Control Hosp Epidemiol, 1995. **16**(10): p. 577-81.
57. Freeman, R., A.M. Kearns, and N.F. Lightfoot, *Heat resistance of nosocomial enterococci.* Lancet, 1994. **344**(8914): p. 64-5.
58. Bradley, C.R. and A.P. Fraiese, *Heat and chemical resistance of enterococci.* J Hosp Infect, 1996. **34**(3): p. 191-6.
59. Duckro, A.N., et al., *Transfer of vancomycin-resistant enterococci via health care worker hands.* Arch Intern Med, 2005. **165**(3): p. 302-7.
60. Snyder, G.M., et al., *Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and vancomycin-resistant enterococci on the gowns and gloves of healthcare workers.* Infect Control Hosp Epidemiol, 2008. **29**(7): p. 583-9.

61. Kac, G., et al., *Microbiological evaluation of two hand hygiene procedures achieved by healthcare workers during routine patient care: a randomized study*. J Hosp Infect, 2005. **60**(1): p. 32-9.
62. Arias, C.A. and B.E. Murray, *The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance*. Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(4): p. 266-78.
63. Ray, A.J., et al., *Improving healthcare workers' compliance with hand hygiene: is a picture worth a thousand words?* Infect Control Hosp Epidemiol, 2002. **23**(8): p. 418-9.
64. Aarestrup, F.M., *Occurrence of glycopeptide resistance among Enterococcus faecium isolates from conventional and ecological poultry farms*. Microb Drug Resist, 1995. **1**(3): p. 255-7.
65. Aarestrup, F.M., et al., *Glycopeptide susceptibility among Danish Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis isolates of animal and human origin and PCR identification of genes within the VanA cluster*. Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(8): p. 1938-40.
66. *Commission directive 97/6/EC of 30, January 1997 amending council directive 70/524/EEC concerning additives in feeding stuffs*. Official Journal of the European Communities, 1997. **35**: p. 11-13.
67. Rende-Fournier, R., et al., *Identification of the satA gene encoding a streptogramin A acetyltransferase in Enterococcus faecium BM4145*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. **37**(10): p. 2119-25.
68. McDonald, L.C., et al., *Quinupristin-dalfopristin-resistant Enterococcus faecium on chicken and in human stool specimens*. N Engl J Med, 2001. **345**(16): p. 1155-60.
69. Vollaard, E.J. and H.A. Clasener, *Colonization resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(3): p. 409-14.
70. Ley, R.E., D.A. Peterson, and J.I. Gordon, *Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine*. Cell, 2006. **124**(4): p. 837-48.
71. Donskey, C.J., *The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens*. Clin Infect Dis, 2004. **39**(2): p. 219-26.
72. Donskey, C.J., et al., *Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients*. N Engl J Med, 2000. **343**(26): p. 1925-32.
73. Donskey, C.J., et al., *Effect of parenteral antibiotic administration on persistence of vancomycin-resistant Enterococcus faecium in the mouse gastrointestinal tract*. J Infect Dis, 1999. **180**(2): p. 384-90.
74. Morris, J.G., Jr., et al., *Enterococci resistant to multiple antimicrobial agents, including vancomycin. Establishment of endemicity in a university medical center*. Ann Intern Med, 1995. **123**(4): p. 250-9.
75. Beezhold, D.W., et al., *Skin colonization with vancomycin-resistant enterococci among hospitalized patients with bacteremia*. Clin Infect Dis, 1997. **24**(4): p. 704-6.
76. Edmond, M.B., et al., *Vancomycin-resistant Enterococcus faecium bacteremia: risk factors for infection*. Clin Infect Dis, 1995. **20**(5): p. 1126-33.
77. Lucas, G.M., et al., *Vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bacteremia: comparison of clinical features and outcomes*. Clin Infect Dis, 1998. **26**(5): p. 1127-33.
78. Handwerker, S., et al., *Nosocomial outbreak due to Enterococcus faecium highly resistant to vancomycin, penicillin, and gentamicin*. Clin Infect Dis, 1993. **16**(6): p. 750-5.
79. Weinstein, J.W., et al., *Resistant enterococci: a prospective study of prevalence, incidence, and factors associated with colonization in a university hospital*. Infect Control Hosp Epidemiol, 1996. **17**(1): p. 36-41.
80. Carmeli, Y., M.H. Samore, and C. Huskins, *The association between antecedent vancomycin treatment and hospital-acquired vancomycin-resistant enterococci: a meta-analysis*. Arch Intern Med, 1999. **159**(20): p. 2461-8.

81. Brandl, K., et al., *Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits*. *Nature*, 2008. **455**(7214): p. 804-7.
82. Kinnebrew, M.A., et al., *Bacterial flagellin stimulates Toll-like receptor 5-dependent defense against vancomycin-resistant Enterococcus infection*. *J Infect Dis*, 2010. **201**(4): p. 534-43.
83. Ubeda, C., et al., *Vancomycin-resistant Enterococcus domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans*. *J Clin Invest*. **120**(12): p. 4332-41.
84. Sava, I.G., E. Heikens, and J. Huebner, *Pathogenesis and immunity in enterococcal infections*. *Clin Microbiol Infect*. **16**(6): p. 533-40.
85. Shankar, N., A.S. Baghdayan, and M.S. Gilmore, *Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant Enterococcus faecalis*. *Nature*, 2002. **417**(6890): p. 746-50.
86. Heikens, E., M.J. Bonten, and R.J. Willems, *Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of Enterococcus faecium E1162*. *J Bacteriol*, 2007. **189**(22): p. 8233-40.
87. Shankar, N., et al., *Role of Enterococcus faecalis surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection*. *Infect Immun*, 2001. **69**(7): p. 4366-72.
88. Leendertse, M., et al., *Enterococcal surface protein transiently aggravates Enterococcus faecium-induced urinary tract infection in mice*. *J Infect Dis*, 2009. **200**(7): p. 1162-5.
89. Nallapareddy, S.R., G.M. Weinstock, and B.E. Murray, *Clinical isolates of Enterococcus faecium exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family*. *Mol Microbiol*, 2003. **47**(6): p. 1733-47.
90. Nallapareddy, S.R., K.V. Singh, and B.E. Murray, *Contribution of the collagen adhesin Acm to pathogenesis of Enterococcus faecium in experimental endocarditis*. *Infect Immun*, 2008. **76**(9): p. 4120-8.
91. Kreft, B., et al., *Aggregation substance of Enterococcus faecalis mediates adhesion to cultured renal tubular cells*. *Infect Immun*, 1992. **60**(1): p. 25-30.
92. Sussmuth, S.D., et al., *Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of Enterococcus faecalis within human macrophages and suppresses respiratory burst*. *Infect Immun*, 2000. **68**(9): p. 4900-6.
93. Rakita, R.M., et al., *Enterococcus faecalis bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation*. *Infect Immun*, 1999. **67**(11): p. 6067-75.
94. Hancock, L.E. and M. Perego, *Systematic inactivation and phenotypic characterization of two-component signal transduction systems of Enterococcus faecalis V583*. *J Bacteriol*, 2004. **186**(23): p. 7951-8.
95. Singh, K.V., et al., *Generation and testing of mutants of Enterococcus faecalis in a mouse peritonitis model*. *J Infect Dis*, 1998. **178**(5): p. 1416-20.
96. Mohamed, J.A., et al., *Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*, 2004. **72**(6): p. 3658-63.
97. Teng, F., et al., *Evidence that the enterococcal polysaccharide antigen gene (epa) cluster is widespread in Enterococcus faecalis and influences resistance to phagocytic killing of E. faecalis*. *Infect Immun*, 2002. **70**(4): p. 2010-5.
98. Singh, K.V., R.J. Lewis, and B.E. Murray, *Importance of the epa locus of Enterococcus faecalis OG1RF in a mouse model of ascending urinary tract infection*. *J Infect Dis*, 2009. **200**(3): p. 417-20.
99. Xu, Y., et al., *Analysis of a gene cluster of Enterococcus faecalis involved in polysaccharide biosynthesis*. *Infect Immun*, 2000. **68**(2): p. 815-23.
100. Thurlow, L.R., et al., *Enterococcus faecalis capsular polysaccharide serotypes C and D and their contributions to host innate immune evasion*. *Infect Immun*, 2009. **77**(12): p. 5551-7.

101. Theilacker, C., et al., *Glycolipids are involved in biofilm accumulation and prolonged bacteraemia in Enterococcus faecalis*. Mol Microbiol, 2009. **71**(4): p. 1055-69.
102. Sava, I.G., et al., *Novel interactions of glycosaminoglycans and bacterial glycolipids mediate binding of enterococci to human cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(27): p. 18194-201.
103. Rice, L.B., et al., *A potential virulence gene, hylEfm, predominates in Enterococcus faecium of clinical origin*. J Infect Dis, 2003. **187**(3): p. 508-12.
104. Patterson, J.E., et al., *An analysis of 110 serious enterococcal infections. Epidemiology, antibiotic susceptibility, and outcome*. Medicine (Baltimore), 1995. **74**(4): p. 191-200.
105. Maki, D.G. and W.A. Agger, *Enterococcal bacteremia: clinical features, the risk of endocarditis, and management*. Medicine (Baltimore), 1988. **67**(4): p. 248-69.
106. Gullberg, R.M., S.R. Homann, and J.P. Phair, *Enterococcal bacteremia: analysis of 75 episodes*. Rev Infect Dis, 1989. **11**(1): p. 74-85.
107. Linden, P.K., et al., *Differences in outcomes for patients with bacteremia due to vancomycin-resistant Enterococcus faecium or vancomycin-susceptible E. faecium*. Clin Infect Dis, 1996. **22**(4): p. 663-70.
108. Hoge, C.W., et al., *Enterococcal bacteremia: to treat or not to treat, a reappraisal*. Rev Infect Dis, 1991. **13**(4): p. 600-5.
109. Megran, D.W., *Enterococcal endocarditis*. Clin Infect Dis, 1992. **15**(1): p. 63-71.
110. Hill, E.E., et al., *Infective endocarditis: changing epidemiology and predictors of 6-month mortality: a prospective cohort study*. Eur Heart J, 2007. **28**(2): p. 196-203.
111. Moellering, R.C., Jr., B.K. Watson, and L.J. Kunz, *Endocarditis due to group D streptococci. Comparison of disease caused by streptococcus bovis with that produced by the enterococci*. Am J Med, 1974. **57**(2): p. 239-50.
112. Nichols, R.L. and A.C. Muzik, *Enterococcal infections in surgical patients: the mystery continues*. Clin Infect Dis, 1992. **15**(1): p. 72-6.
113. Dougherty, S.H., *Role of enterococcus in intraabdominal sepsis*. Am J Surg, 1984. **148**(3): p. 308-12.
114. Pintado, V., et al., *Enterococcal meningitis: a clinical study of 39 cases and review of the literature*. Medicine (Baltimore), 2003. **82**(5): p. 346-64.
115. Bayer, A.S., et al., *Group D enterococcal meningitis. Clinical and therapeutic considerations with report of three cases and review of the literature*. Arch Intern Med, 1976. **136**(8): p. 883-6.
116. Facklam, R., et al., *Evaluation of three disk tests for identification of enterococci, leuconostocs, and pediococci*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(4): p. 885-7.
117. Collins, M.D., et al., *Enterococcus avium nom. rev., comb. nov.; E. casseliflavus nom. rev., comb. nov.; E. durans nom. rev., comb. nov.; E. gallinarum comb. nov.; and E. malodoratus sp. nov.* . Int J Syst Bacteriol., 1984 **34**: p. 220-223.
118. Colman, G. and L.C. Ball, *Identification of streptococci in a medical laboratory*. J Appl Bacteriol, 1984. **57**(1): p. 1-14.
119. Duh, R.W., et al., *In vitro activity of 19 antimicrobial agents against enterococci from healthy subjects and hospitalized patients and use of an ace gene probe from Enterococcus faecalis for species identification*. Microb Drug Resist, 2001. **7**(1): p. 39-46.
120. Dutka-Malen, S., S. Evers, and P. Courvalin, *Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(1): p. 24-7.
121. NCCLS, *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 18th informational supplement. Document M100-S18*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. 2008.

122. al-Obeid, S., L. Gutmann, and R. Williamson, *Modification of penicillin-binding proteins of penicillin-resistant mutants of different species of enterococci*. J Antimicrob Chemother, 1990. **26**(5): p. 613-8.
123. Ligozzi, M., F. Pittaluga, and R. Fontana, *Modification of penicillin-binding protein 5 associated with high-level ampicillin resistance in Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(2): p. 354-7.
124. Murray, B.E., et al., *In vitro studies of plasmid-mediated penicillinase from Streptococcus faecalis suggest a staphylococcal origin*. J Clin Invest, 1986. **77**(1): p. 289-93.
125. Moellering, R.C., Jr., *The Garrod Lecture. The enterococcus: a classic example of the impact of antimicrobial resistance on therapeutic options*. J Antimicrob Chemother, 1991. **28**(1): p. 1-12.
126. Chow, J.W., *Aminoglycoside resistance in enterococci*. Clin Infect Dis, 2000. **31**(2): p. 586-9.
127. NCCLS, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 13th informational Supplement. MIC Testing Supplemental Tables. NCCLS Document M100-S13 (M7)*. Wayne, PA: NCCLS. 2003.
128. Stamper, P.D., et al., *Comparison of the BD GeneOhm VanR assay to culture for identification of vancomycin-resistant enterococci in rectal and stool specimens*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(10): p. 3360-5.
129. Fontana, R., et al., *Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(9): p. 1980-3.
130. Klare, I., et al., *Overproduction of a penicillin-binding protein is not the only mechanism of penicillin resistance in Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother, 1992. **36**(4): p. 783-7.
131. Tomayko, J.F., et al., *Comparison of the beta-lactamase gene cluster in clonally distinct strains of Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(5): p. 1170-4.
132. Reynolds, P.E., *Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1989. **8**(11): p. 943-50.
133. Leclercq, R. and P. Courvalin, *Resistance to glycopeptides in enterococci*. Clin Infect Dis, 1997. **24**(4): p. 545-54; quiz 555-6.
134. Arthur, M., et al., *Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in Enterococcus faecium BM4147*. J Bacteriol, 1993. **175**(1): p. 117-27.
135. Arthur, M., P. Reynolds, and P. Courvalin, *Glycopeptide resistance in enterococci*. Trends Microbiol, 1996. **4**(10): p. 401-7.
136. Bugg, T.D., et al., *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**(43): p. 10408-15.
137. Arthur, M., et al., *Quantitative analysis of the metabolism of soluble cytoplasmic peptidoglycan precursors of glycopeptide-resistant enterococci*. Mol Microbiol, 1996. **21**(1): p. 33-44.
138. Reynolds, P.E., *Control of peptidoglycan synthesis in vancomycin-resistant enterococci: D,D-peptidases and D,D-carboxypeptidases*. Cell Mol Life Sci, 1998. **54**(4): p. 325-31.
139. Reynolds, P.E., et al., *Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon Tn1546 requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine*. Mol Microbiol, 1994. **13**(6): p. 1065-70.
140. Arthur, M., et al., *Requirement of the VanY and VanX D,D-peptidases for glycopeptide resistance in enterococci*. Mol Microbiol, 1998. **30**(4): p. 819-30.

141. Quintiliani, R., Jr. and P. Courvalin, *Characterization of Tn1547, a composite transposon flanked by the IS16 and IS256-like elements, that confers vancomycin resistance in Enterococcus faecalis BM4281*. *Gene*, 1996. **172**(1): p. 1-8.
142. Carias, L.L., et al., *Genetic linkage and cotransfer of a novel, vanB-containing transposon (Tn5382) and a low-affinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical vancomycin-resistant Enterococcus faecium isolate*. *J Bacteriol*, 1998. **180**(17): p. 4426-34.
143. Murray, B.E., *Vancomycin-resistant enterococcal infections*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(10): p. 710-21.
144. Navarro, F. and P. Courvalin, *Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in Enterococcus casseliflavus and Enterococcus flavescens*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994. **38**(8): p. 1788-93.
145. Arias, C.A., P. Courvalin, and P.E. Reynolds, *vanC cluster of vancomycin-resistant Enterococcus gallinarum BM4174*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. **44**(6): p. 1660-6.
146. Krogstad, D.J. and A.R. Pargwette, *Defective killing of enterococci: a common property of antimicrobial agents acting on the cell wall*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1980. **17**(6): p. 965-8.
147. Cetinkaya, Y., P. Falk, and C.G. Mayhall, *Vancomycin-resistant enterococci*. *Clin Microbiol Rev*, 2000. **13**(4): p. 686-707.
148. Meka, V.G. and H.S. Gold, *Antimicrobial resistance to linezolid*. *Clin Infect Dis*, 2004. **39**(7): p. 1010-5.
149. Zimmer, S.M., et al., *Failure of linezolid treatment for enterococcal endocarditis*. *Clin Infect Dis*, 2003. **37**(3): p. e29-30.
150. Schwartz, B.S., P.D. Ngo, and B.J. Guglielmo, *Daptomycin treatment failure for vancomycin-resistant Enterococcus faecium infective endocarditis: impact of protein binding?* *Ann Pharmacother*, 2008. **42**(2): p. 289-90.
151. Murray, B.E., *Vancomycin-resistant enterococci*. *Am J Med*, 1997. **102**(3): p. 284-93.
152. Gavaldà, J., et al., *Brief communication: treatment of Enterococcus faecalis endocarditis with ampicillin plus ceftriaxone*. *Ann Intern Med*, 2007. **146**(8): p. 574-9.
153. Arias, C.A., et al., *Time-kill and synergism studies of ceftobiprole against Enterococcus faecalis, including beta-lactamase-producing and vancomycin-resistant isolates*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. **51**(6): p. 2043-7.
154. Mushtaq, S., et al., *In vitro activity of ceftaroline (PPI-0903M, T-91825) against bacteria with defined resistance mechanisms and phenotypes*. *J Antimicrob Chemother*, 2007. **60**(2): p. 300-11.
155. Moellering, R.C., Jr., C. Wennersten, and A.N. Weinberg, *Studies on antibiotic synergism against enterococci. I. Bacteriologic studies*. *J Lab Clin Med*, 1971. **77**(5): p. 821-8.
156. Zimmermann, R.A., R.C. Moellering, Jr., and A.N. Weinberg, *Mechanism of resistance to antibiotic synergism in enterococci*. *J Bacteriol*, 1971. **105**(3): p. 873-9.
157. Moellering, R.C., Jr. and A.N. Weinberg, *Studies on antibiotic synergism against enterococci. II. Effect of various antibiotics on the uptake of 14 C-labeled streptomycin by enterococci*. *J Clin Invest*, 1971. **50**(12): p. 2580-4.
158. Mainardi, J.L., et al., *Synergistic effect of amoxicillin and cefotaxime against Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995. **39**(9): p. 1984-7.
159. Fernandez-Hidalgo, N., et al., *Ampicillin Plus Ceftriaxone Is as Effective as Ampicillin Plus Gentamicin for Treating Enterococcus faecalis Infective Endocarditis*. *Clin Infect Dis*, 2013. **56**(9): p. 1261-8.

160. Kak, V., et al., *Efficacy of ampicillin plus arbekacin in experimental rabbit endocarditis caused by an Enterococcus faecalis strain with high-level gentamicin resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(9): p. 2545-6.
161. Antony, S.J., et al., *High-level aminoglycoside-resistant enterococcus causing endocarditis successfully treated with a combination of ampicillin, imipenem and vancomycin*. Scand J Infect Dis, 1997. **29**(6): p. 628-30.
162. Brandt, C.M., et al., *Effective treatment of multidrug-resistant enterococcal experimental endocarditis with combinations of cell wall-active agents*. J Infect Dis, 1996. **173**(4): p. 909-13.
163. Herzstein, J., et al., *Optimal therapy for enterococcal endocarditis*. Am J Med, 1984. **76**(2): p. 186-91.
164. Robbins, W.C. and R. Tompsett, *Treatment of enterococcal endocarditis and bacteremia; results of combined therapy with penicillin and streptomycin*. Am J Med, 1951. **10**(3): p. 278-99.
165. Murray, B.E., *Beta-lactamase-producing enterococci*. Antimicrob Agents Chemother, 1992. **36**(11): p. 2355-9.
166. Courvalin, P., *Vancomycin resistance in gram-positive cocci*. Clin Infect Dis, 2006. **42 Suppl 1**: p. S25-34.
167. Leach, K.L., et al., *The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria*. Mol Cell, 2007. **26**(3): p. 393-402.
168. Falagas, M.E., Siempos, II, and K.Z. Vardakas, *Linezolid versus glycopeptide or beta-lactam for treatment of Gram-positive bacterial infections: meta-analysis of randomised controlled trials*. Lancet Infect Dis, 2008. **8**(1): p. 53-66.
169. Dowzicky, M., et al., *Evaluation of in vitro activity of quinupristin/dalfopristin and comparator antimicrobial agents against worldwide clinical trial and other laboratory isolates*. Am J Med, 1998. **104**(5A): p. 34S-42S.
170. Harms, J.M., et al., *Alterations at the peptidyl transferase centre of the ribosome induced by the synergistic action of the streptogramins dalfopristin and quinupristin*. BMC Biol, 2004. **2**: p. 4.
171. Moellering, R.C., et al., *The efficacy and safety of quinupristin/dalfopristin for the treatment of infections caused by vancomycin-resistant Enterococcus faecium. Synercid Emergency-Use Study Group*. J Antimicrob Chemother, 1999. **44**(2): p. 251-61.
172. Linden, P.K., et al., *Treatment of vancomycin-resistant Enterococcus faecium infections with quinupristin/dalfopristin*. Clin Infect Dis, 2001. **33**(11): p. 1816-23.
173. Dandekar, P.K., et al., *Pharmacodynamic profile of daptomycin against Enterococcus species and methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a murine thigh infection model*. J Antimicrob Chemother, 2003. **52**(3): p. 405-11.
174. Enoch, D.A., et al., *Daptomycin*. J Infect, 2007. **55**(3): p. 205-13.
175. Carpenter, C.F. and H.F. Chambers, *Daptomycin: another novel agent for treating infections due to drug-resistant gram-positive pathogens*. Clin Infect Dis, 2004. **38**(7): p. 994-1000.
176. Stein, G.E. and W.A. Craig, *Tigecycline: a critical analysis*. Clin Infect Dis, 2006. **43**(4): p. 518-24.
177. Baltch, A.L., et al., *Comparison of inhibitory and bactericidal activities and postantibiotic effects of LY333328 and ampicillin used singly and in combination against vancomycin-resistant Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(10): p. 2564-8.
178. Allen, N.E. and T.I. Nicas, *Mechanism of action of oritavancin and related glycopeptide antibiotics*. FEMS Microbiol Rev, 2003. **26**(5): p. 511-32.
179. Streit, J.M., et al., *Dalbavancin activity against selected populations of antimicrobial-resistant Gram-positive pathogens*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2005. **53**(4): p. 307-10.
180. Gales, A.C., H.S. Sader, and R.N. Jones, *Antimicrobial activity of dalbavancin tested against Gram-positive clinical isolates from Latin American medical centres*. Clin Microbiol Infect, 2005. **11**(2): p. 95-100.

181. Draghi, D.C., et al., *In vitro* activity of telavancin against recent Gram-positive clinical isolates: results of the 2004-05 Prospective European Surveillance Initiative. *J Antimicrob Chemother*, 2008. **62**(1): p. 116-21.
182. Landry, S.L., D.L. Kaiser, and R.P. Wenzel, *Hospital stay and mortality attributed to nosocomial enterococcal bacteremia: a controlled study*. *Am J Infect Control*, 1989. **17**(6): p. 323-9.
183. Calderwood, M.S., et al., *Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci among patients on an adult stem cell transplant unit: observations from an active surveillance program*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008. **29**(11): p. 1019-25.
184. Hachem, R., et al., *Impact of surveillance for vancomycin-resistant enterococci on controlling a bloodstream outbreak among patients with hematologic malignancy*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2004. **25**(5): p. 391-4.
185. Suntharam, N., et al., *Risk factors for acquisition of vancomycin-resistant enterococci among hematology-oncology patients*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2002. **43**(3): p. 183-8.
186. Weinstock, D.M., et al., *Colonization, bloodstream infection, and mortality caused by vancomycin-resistant enterococcus early after allogeneic hematopoietic stem cell transplant*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2007. **13**(5): p. 615-21.
187. Chang, N. and L. Chui, *A standardized protocol for the rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1998. **31**(1): p. 275-9.
188. Carle, G.F., M. Frank, and M.V. Olson, *Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field*. *Science*, 1986. **232**(4746): p. 65-8.
189. Schwartz, D.C. and C.R. Cantor, *Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis*. *Cell*, 1984. **37**(1): p. 67-75.
190. Schwartz, D.C., et al., *New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1983. **47 Pt 1**: p. 189-95.
191. McClelland, M., et al., *Restriction endonucleases for pulsed field mapping of bacterial genomes*. *Nucleic Acids Res*, 1987. **15**(15): p. 5985-6005.
192. Murray, B.E., et al., *Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites*. *J Clin Microbiol*, 1990. **28**(9): p. 2059-63.
193. Kreiswirth, B., et al., *Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in Staphylococcus aureus*. *Science*, 1993. **259**(5092): p. 227-30.
194. Chu, G., D. Vollrath, and R.W. Davis, *Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields*. *Science*, 1986. **234**(4783): p. 1582-5.
195. Tenover, F.C., et al., *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing*. *J Clin Microbiol*, 1995. **33**(9): p. 2233-9.
196. Struelens, M.J., *Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems*. *Clin Microbiol Infect*, 1996. **2**(1): p. 2-11.
197. Tenover, F.C., R.D. Arbeit, and R.V. Goering, *How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists*. *Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1997. **18**(6): p. 426-39.
198. Hall, L.M., *Are point mutations or DNA rearrangements responsible for the restriction fragment length polymorphisms that are used to type bacteria?* *Microbiology*, 1994. **140 (Pt 1)**: p. 197-204.
199. Quintiliani, R., Jr. and P. Courvalin, *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**(3): p. 359-63.

200. Thal, L.A., et al., *The effect of Tn916 insertions on contour-clamped homogeneous electrophoresis patterns of Enterococcus faecalis*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(4): p. 969-72.
201. Rementeria, A., et al., *Comparative evaluation of three commercial software packages for analysis of DNA polymorphism patterns*. Clin Microbiol Infect, 2001. **7**(6): p. 331-6.
202. Fitch, W.M. and E. Margoliash, *Construction of phylogenetic trees*. Science, 1967. **155**(3760): p. 279-84.
203. Prevost, G., et al., *Pulsed field gel electrophoresis as a new epidemiological tool for monitoring methicillin-resistant Staphylococcus aureus in an intensive care unit*. J Hosp Infect, 1991. **17**(4): p. 255-69.
204. McDougal, L.K., et al., *Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from the United States: establishing a national database*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(11): p. 5113-20.
205. Price, C.S., et al., *Active surveillance reduces the incidence of vancomycin-resistant enterococcal bacteremia*. Clin Infect Dis, 2003. **37**(7): p. 921-8.
206. Bischoff, W.E., et al., *Molecular epidemiology of vancomycin-resistant Enterococcus faecium in a large urban hospital over a 5-year period*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(12): p. 3912-6.
207. Bonten, M.J., et al., *Epidemiology of colonisation of patients and environment with vancomycin-resistant enterococci*. Lancet, 1996. **348**(9042): p. 1615-9.
208. Yoo, S.J., et al., *Role of horizontal transfer of the transposon Tn1546 in the nosocomial spread of vanA vancomycin-resistant enterococci at a tertiary care hospital in Korea*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2006. **27**(10): p. 1081-7.
209. Descheemaeker, P., et al., *Prevalence and molecular epidemiology of glycopeptide-resistant enterococci in Belgian renal dialysis units*. J Infect Dis, 2000. **181**(1): p. 235-41.
210. van Schaik, W., et al., *Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen Enterococcus faecium and identification of a large transferable pathogenicity island*. BMC Genomics, 2010. **11**: p. 239.
211. Sorek, R., V. Kunin, and P. Hugenholtz, *CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(3): p. 181-6.
212. Palmer, K.L. and M.S. Gilmore, *Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas*. MBio, 2010. **1**(4).
213. Segal, B.H., et al., *Prevention and treatment of cancer-related infections*. J Natl Compr Canc Netw, 2008. **6**(2): p. 122-74.
214. Winston, L.G., et al., *Impact of a formulary switch from ticarcillin-clavulanate to piperacillin-tazobactam on colonization with vancomycin-resistant enterococci*. Am J Infect Control, 2004. **32**(8): p. 462-9.
215. Bradley, S.J., *Control of glycopeptide-resistant enterococci in an oncology unit*. Pharmacotherapy, 2000. **20**(9 Pt 2): p. 203S-212S; discussion 224S-228S.
216. Smith, D.W., *Decreased antimicrobial resistance after changes in antibiotic use*. Pharmacotherapy, 1999. **19**(8 Pt 2): p. 129S-132S; discussion 133S-137S.
217. Knaus, W.A., et al., *The APACHE III prognostic system. Risk prediction of hospital mortality for critically ill hospitalized adults*. Chest, 1991. **100**(6): p. 1619-36.
218. Nourse, C., et al., *Control of a nosocomial outbreak of vancomycin resistant Enterococcus faecium in a paediatric oncology unit: risk factors for colonisation*. Eur J Pediatr, 1998. **157**(1): p. 20-7.
219. Harris, A.D., et al., *Methodological principles of case-control studies that analyzed risk factors for antibiotic resistance: a systematic review*. Clin Infect Dis, 2001. **32**(7): p. 1055-61.
220. Song, X., et al., *Effect of nosocomial vancomycin-resistant enterococcal bacteremia on mortality, length of stay, and costs*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2003. **24**(4): p. 251-6.

221. Tornieporth, N.G., et al., *Risk factors associated with vancomycin-resistant Enterococcus faecium infection or colonization in 145 matched case patients and control patients*. Clin Infect Dis, 1996. **23**(4): p. 767-72.
222. Dahms, R.A., et al., *Third-generation cephalosporins and vancomycin as risk factors for postoperative vancomycin-resistant enterococcus infection*. Arch Surg, 1998. **133**(12): p. 1343-6.
223. Fridkin, S.K., et al., *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**(3): p. 175-83.
224. Quale, J., et al., *Experience with a hospital-wide outbreak of vancomycin-resistant enterococci*. Am J Infect Control, 1996. **24**(5): p. 372-9.
225. Rice, L.B., et al., *Beta-lactam antibiotics and gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci*. J Infect Dis, 2004. **189**(6): p. 1113-8.
226. Bodey, G.P., et al., *Effect of broad-spectrum cephalosporins on the microbial flora of recipients*. J Infect Dis, 1983. **148**(5): p. 892-7.
227. Suppola, J.P., et al., *Overgrowth of Enterococcus faecium in the feces of patients with hematologic malignancies*. Clin Infect Dis, 1996. **23**(4): p. 694-7.
228. Quale, J., et al., *Manipulation of a hospital antimicrobial formulary to control an outbreak of vancomycin-resistant enterococci*. Clin Infect Dis, 1996. **23**(5): p. 1020-5.
229. May, A.K., et al., *Reduction of vancomycin-resistant enterococcal infections by limitation of broad-spectrum cephalosporin use in a trauma and burn intensive care unit*. Shock, 2000. **14**(3): p. 259-64.
230. Stiefel, U., et al., *Effect of the increasing use of piperacillin/tazobactam on the incidence of vancomycin-resistant enterococci in four academic medical centers*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2004. **25**(5): p. 380-3.
231. Mendez, M.N., et al., *Impact of a piperacillin-tazobactam shortage on antimicrobial prescribing and the rate of vancomycin-resistant enterococci and Clostridium difficile infections*. Pharmacotherapy, 2006. **26**(1): p. 61-7.
232. Taylor, E.W., et al., *Biliary excretion of piperacillin*. J Int Med Res, 1983. **11**(1): p. 28-31.
233. Donskey, C.J., et al., *Effect of parenteral antibiotic administration on the establishment of colonization with vancomycin-resistant Enterococcus faecium in the mouse gastrointestinal tract*. J Infect Dis, 2000. **181**(5): p. 1830-3.
234. Boyle, J.F., et al., *Epidemiologic analysis and genotypic characterization of a nosocomial outbreak of vancomycin-resistant enterococci*. J Clin Microbiol, 1993. **31**(5): p. 1280-5.
235. Rubin, L.G., et al., *Vancomycin-resistant Enterococcus faecium in hospitalized children*. Infect Control Hosp Epidemiol, 1992. **13**(12): p. 700-5.
236. Shay, D.K., et al., *Epidemiology and mortality risk of vancomycin-resistant enterococcal bloodstream infections*. J Infect Dis, 1995. **172**(4): p. 993-1000.
237. Stosor, V., et al., *Enterococcus faecium bacteremia: does vancomycin resistance make a difference?* Arch Intern Med, 1998. **158**(5): p. 522-7.
238. Carmeli, Y., G.M. Eliopoulos, and M.H. Samore, *Antecedent treatment with different antibiotic agents as a risk factor for vancomycin-resistant Enterococcus*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(8): p. 802-7.
239. Falk, P.G., et al., *Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(4): p. 1157-70.
240. Farthing, M.J., *Bugs and the gut: an unstable marriage*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2004. **18**(2): p. 233-9.

241. Almyroudis, N.G., et al., *Molecular epidemiology and risk factors for colonization by vancomycin-resistant Enterococcus in patients with hematologic malignancies*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2011. **32**(5): p. 490-6.
242. Bucaneve, G., et al., *Levofloxacin to prevent bacterial infection in patients with cancer and neutropenia*. N Engl J Med, 2005. **353**(10): p. 977-87.
243. Facklam, R.R. and M.D. Collins, *Identification of Enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme*. J Clin Microbiol, 1989. **27**(4): p. 731-4.
244. Smith, D.W., *Decreased antimicrobial resistance following changes in antibiotic use*. Surg Infect (Larchmt), 2000. **1**(1): p. 73-8.
245. Paterson, D.L., et al., *Acquisition of rectal colonization by vancomycin-resistant Enterococcus among intensive care unit patients treated with piperacillin-tazobactam versus those receiving cefepime-containing antibiotic regimens*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(2): p. 465-9.

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ

A		Ενδοκοιλιακές λοιμώξεις	33
Αβοπαρσίνη	27	Ενδονουκλεάση <i>Sma</i> I	52, 61, 102
Άγαρ έγχυσης εγκεφάλου-καρδιάς	60	Εξομάλυνση ηλεκτροφορητικών ζωνών	57
Αδενίνη	52	Εξωτοξίνες	33
Αιματούχο άγαρ	22, 34	Επιλεκτικό άγαρ βανκομυκίνης	60, 78
Αιμόλυση	22, 35	Z	
Αλληλουχία πολυγενετικού τύπου	24	Ζελατινάση	31
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	27, 74	H	
Αμινοακυλο-tRNA	46	Ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο	50, 52, 60, 61, 73
Αμινογλυκοσιδίνη	28, 37, 38, 42, 43, 44, 46	Ηλεκτροφορητική ζώνη	50, 57
Αμινοπενικιλίνες	42, 43	Ηπατικό απόστημα	33
Αμπικιλίνη	23, 24, 36, 38, 42, 43, 44, 45, 46, 100	Θ	
Αμπικιλίνη-σουλμπακτάμη	45, 79	Θεραπευτικό εύρος αντιβιοτικών	42
Ανασυνδιασμός γονιδίων	56	Θραυσμάτων DNA	50, 53, 55, 58
Ανοχή	42	Θυμίνη	52
Απόστημα	33	I	
Αφυδρογονάση (<i>VanH</i>)	40	Ιμipενέμη	42, 44, 77, 79, 91
B		K	
Βανκομυκίνη	19, 20, 23, 24, 27, 28, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 60, 77, 78, 80, 86, 87, 91, 100, 103	Κεφαλοσπορίνη	19, 28, 36, 42, 43, 85, 99
β-λακταμάσες	38, 43	Κεφοταξίμη	44
Γ		Κεφταρολίνη	43
Γενετικό αποτύπωμα	50	Κεφτομπιπρόλη	43
Γλυκοπεπτιδία	20, 27, 39, 40, 44, 47	Κεφτριαξόνη	43, 44
Γουανίνη	52	Κινοπριστίνη-δαλφοπριστίνη	27, 46, 47
Δ		Κλινδαμυκίνη	19, 42, 79
Δαπτομυκίνη	42, 46	Κοινές ενδονουκλεάσες	50
Δεξαμενή αποικισμού	23, 30, 71	Κυστίτιδα	33
Διαγραφή γονιδίων	56	Κυτοσίνη	52
Διαχειριστικά γονίδια	24	Κύτταρα Paneth	29, 86, 100
Δοκιμή chi-squared	79, 92	Λ	
Ε		Λεκτίνη	29, 86, 100
Εθνικό Δίκτυο Ασφάλειας της Υγείας των ΗΠΑ	23	Λευκίνη αμινοπεπτιδάση	21, 35
Ενδοκαρδίτιδα	19, 20, 31, 33, 36, 44, 46	Λινεζολίδη	42, 46, 47

Λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων
4, 46, 77
Λοιμώξεις χοληφόρων 33

M

Μέθοδος αραιώσεων αντιβιοτικών σε άγαρ
37
Μέθοδος ανάλυσης της διακύμανσης 79
Μονο-νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις 56
Μέθοδος Ομαδοποίησης Αστάθμιτων
Ζευγών με Αριθμητικούς Μέσους Όρους 61
Μηνιγγίτιδα 19, 34, 36

N

Νουκλεοτιδυλοτρανσφεράση *ant(3'')-Ia* 38
Νουκλεοτιδυλοτρανσφεράση *ant(6')-Ia* 38

O

Οξακιλλίνη 42
Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των
ΗΠΑ 46, 47
Ουροδεοξυπενικιλίνες 42

Π

Παραμετρικός συντελεστής συσχέτισης
Pearson 92, 103
Πενικιλίνη 36, 37, 38, 42, 43, 44, 45, 100
Πενικιλίνη G 42
Πεπτιδίο RegIIIγ 29, 86, 100, 101
Πεπτιδογλυκάνες 39, 40, 45, 47
Περινεφρικό απόστημα 33
Περιοριστικές ενδονουκλεάσες 50, 51, 57
Περιτονίτιδα 31, 33, 34
Πιπερακιλλίνη 42
Πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη 77, 79, 80,
86, 87, 88, 89, 90, 91, 93, 98, 99, 100, 101,
103

Πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων εκ
περιορισμού 50, 74
Πολυσακχαριδικό αντιγόνο *Era* 31
Προσθήκη γονιδίων 56
Προστατίτιδα 33
Πρωτεΐνη δέσμησης της πενικιλίνης 38, 42
Πυελονεφρίτιδα 33
Πυροαλληλούχηση 74
Πυρρολινοδάση 22, 35

Σ

Στρεπτογραμίνη 27, 46
Στρεπτόκοκκος των κοπράνων 20
Συμπλέγματα γονιδίων (VanA, B, C, D, E, G
και L) 39
Συνέργεια αντιβιοτικών 37, 43, 44
Συντελεστής Dice 62
Συσκευή ομοιογενούς περιμετρικού
ηλεκτρικού πεδίου CHEF 55, 61
Σφάλμα επιλεκτικής δημοσίευσης 87, 99

T

Ταξινόμηση κατά Lancefield 22
Τείκοπλανίνη 20, 41
Τιγκεκυκλίνη 47
Τμήματα περιορισμού 50, 56
Τρανσγλυκοζυλίωση 39, 45
Τρανσποζόνιο Tn 1546 40, 74
Τρανσποζόνιο Tn 1547 40
Τρανσποζόνιο Tn5382 40

Φ

Φλατζελλίνη 29, 86, 100

X

Χρόνος εναλλαγής πεδίου 53, 56

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΩΝ ΟΡΩΝ

A		D	
<i>Aac</i> (6')-Ie- <i>Aph</i> (2'')-Ia	38, 44	D-alanyl-D-alanine (D-Ala-D- Ala)	39
<i>aac</i> (6'')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia	38	D-alanyl-D-lactate (D-Ala-D-Lac)	39
<i>Acm</i>	31	Dalbavancin	47
Adenine	52	Daptomycin	46
aminoacyl-tRNA	46	Deletions	56
Analysis of variant	79	Dice coefficient	62
ANOVA	79	Difco™	36
<i>ant</i> (3'')-Ia	38	DNA fragments	50
<i>ant</i> (6')-Ia	38	D-serine	39
Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009, ECDC	24	E	
APACHE II	79, 80, 83	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	35, 36, 41
API 20 Strep	36	<i>Enterococcus gallinarum</i>	25, 35, 36, 41
Arbekacin	44	<i>Escherichia coli</i>	92, 93
Asa I, Asp I, Asc 10	31	<i>esp</i>	24, 31
Avoparcin	20, 27	E-test	36
B		F	
<i>Bacteriodes</i>	88	Flagellin	29, 86, 100
Bands	50	Food and Drug Administration, FDA	46
<i>Bifidobacterium</i>	88	G	
Biofilms	31	Gelatinase	31
BioNumerics	57, 61	Genetic fingerprint	50
Brain Heart Infusion άγαρ	34, 37, 38, 60	Guanine	52
C		H	
CC17	24	Housekeeping genes	24
CHEF Mapper	55, 61	<i>hyl</i> _{Efm}	24, 31
<i>Clostridium spp.</i>	88	I	
<i>Clostridium difficile</i>	20, 80	Insertions	56
Contour-clamped homogeneous electric field apparatus	55, 61	K	
C-type lectin	29	Kirby Bauer	36, 37
Cubicin®	46		
Cytosine	52		

L		Q	
<i>Lactobaccillus</i>	88	Quinupristin-dalfopristin	27, 46
<i>Lactococcus</i>	35	R	
Lancefield ταξινόμηση	22	Ramping	53
LAP	35	Rearrangements	56
<i>Leuconostoc</i>	35	RegIIIγ λεκτίνη	29, 86, 100, 101
Linezolid	46	Reorientation Angle	53, 56
Long-range PCR	74	Reservoir	23, 30, 71
L-pyrrolidonyl-β-naphthylamide	22, 35	Restriction Fragment-length Polymorphism	50, 74
M		Restriction fragments	50
MicroScan Pos Combo Type 12	36	RFLP	50, 74
Microscan®	36	S	
MLST	24	SCOPE project	23
Multilocus Sequence Typing	24	Shock	33
N		Single-base substitutions	56
National Healthcare Safety Network	23	<i>Smal</i>	52
Nitrocefin (Difco™)	36	ST17 (sequence type 17)	24
Normalization	57	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325	61
O		<i>Streptococcus faecalis</i>	20
Oritavancin	47	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	31, 35
P		<i>Streptococcus pyogenes</i>	31, 35
PBP	36, 38, 39, 42, 44	<i>Streptococcus viridans</i>	72, 92, 93
PEA	34, 59, 77	Superantigens	33
Pearson coefficient	93, 98	Switch Interval	53, 56
<i>Pearson</i> correlation coefficient	92	Synercid®	27, 46
<i>Pediococcus</i>	35	T	
Penicillin-binding protein 5 (PBP-5)	38	Target modification	36
PFGE	50, 52, 60, 61, 73	Telavancin	47
Phenylethyl alcohol (PEA)	34, 59, 77	Thymine	52
<i>Pseudomonas</i>	92, 93	Tigecycline	47
Publication bias	87, 99	TLR-4	29
Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)	50, 60	TLR-5	29, 86, 101
Pulse Time	53, 56	Tn 1546 (transposon)	40, 74
PYR	22, 35, 59, 78	Tolerance	42
Pyrosequencing	74	Toll-like receptor 4	29
Pyrrolidonylarylamidase	59, 78	Toll-like receptor 5	29, 86, 101
		Tygacil®	47

U

Unweighted Pair Group Method using	
Arithmetic Averages	61
UPGMA	61

V

VanA	24, 38, 39, 40, 41, 47, 74
VanB	38, 40, 41, 47
VanC	39, 41, 47
Vancomycin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	19
Vancomycin screen agar	60, 78
VanX D,D-dipeptidase	40

VanY D,D-carboxypeptidase	40
Virginiamycin	27
Vitek	36, 60, 78
VRSA	19

Z

Zyvox®	46
--------	----

**ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ
ΝΙΚΟΛΑΟΥ Γ. ΑΛΜΥΡΟΥΔΗ**

Πρωτοβάθμια και δευτεροβάθμια εκπαίδευση:

- Πειραματικό Σχολείο Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τριτοβάθμια Εκπαίδευση: Φοίτηση στην Ιατρική Σχολή

- 1 Νοεμβρίου 1985 - 25 Μαρτίου 1992 : Φοίτηση στην Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Κλινική Εμπειρία

- 1 Μαΐου 1993 - 30 Ιουνίου 1993: Θέση ειδίκευσης στην Παθολογία στο Ναυτικό Νοσοκομείο Σαλαμίνας.
- Οκτώβριος 1993 - Νοέμβριος 1994: Υπηρεσία Υπαίθρου στον Υγειονομικό Σταθμό Τρικόρφου Μεσσηνίας που υπάγεται στην αρμοδιότητα του Κέντρου Υγείας Μεσσήνης.
- Δεκέμβριος 1994 - Ιούλιος 1995: Άσκηση ιατρικού επαγγέλματος σε ιδιωτικό ιατρείο στην Αθήνα.
- 10 Αυγούστου 1995 - 27 Ιουνίου 1997: Έμμισθη θέση ειδίκευσης στην Παθολογία στο Β΄ Παθολογικό τμήμα του Περιφερειακού Αντικαρκινικού - Ογκολογικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ο Άγιος Σάββας».
- 1 Ιουλίου 1997 - 30 Ιουνίου 2000: Έμμισθη θέση ειδίκευσης στην Παθολογία f στο Ιατρικό Κέντρο του Πανεπιστημίου του Pittsburgh-Νοσοκομείο Mckeesport, Mckeesport, Pennsylvania, ΗΠΑ.
- 1 Ιουλίου 2000 - 30 Ιουνίου 2002: Έμμισθη θέση εξειδίκευσης στη Λοιμωξιολογία και Τροπική Ιατρική στο Πανεπιστήμιο Νότιας Florida, Tampa, FL, ΗΠΑ
- 3 Μαΐου 2003 - 6 Μαΐου 2003: Εκπαίδευση στη Νοσοκομειακή Επιδημιολογία και Έλεγχο Λοιμώξεων - SHEA/CDC, Ατλάντα, Γεωργία, ΗΠΑ.
- 16 Αυγούστου 2002 - 15 Αυγούστου 2003: Εργασία ως έμμισθος ιατρός και περαιτέρω εξειδίκευση στην Παθολογία-Λοιμωξιολογία στο νοσοκομείο Memorial Sloan-Kettering Cancer Center στη Νέα Υόρκη, ΗΠΑ.
- 1 Ιουλίου 2004 - έως σήμερα: Επιμελητής στον τομέα Παθολογίας στο Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, Πολιτεία Νέας Υόρκης, ΗΠΑ.

Ακαδημαϊκοί τίτλοι

- 15 Σεπτεμβρίου 2004 – Απρίλιο 2012: Επίκουρος καθηγητής Παθολογίας, Ιατρική Σχολή του Πολιτειακού Πανεπιστημίου της Νέας Υόρκης, ΗΠΑ (State University of New York at Buffalo, NY).
- Μάιος 2012 – σήμερα: Αναπληρωτής καθηγητής Παθολογίας, Ιατρική Σχολή του Πολιτειακού Πανεπιστημίου της Νέας Υόρκης, ΗΠΑ (State University of New York at Buffalo, NY).

Διπλώματα

Certified by the Educational Committee for Foreign Medical Graduates.

USMLE step I: Sept 1994, step II: Aug 1994, step III: Dec 1998

American Board of Internal Medicine, Board certified in Internal Medicine, Αύγουστος 2000

American Board of Internal Medicine, Board Certified in Infectious Diseases, Νοέμβριος 2002

American Board of Internal Medicine, Recertification in Infectious Diseases, Φεβρουάριος 2013

Διακρίσεις

- “Fellow of Infectious Diseases Society of America”, IDSA, July 1st, 2010
- “Fellow of American College of Physicians”, ACP, July 1st, 2008
- Awarded “Resident of the Year” in June 1999 at UPMC-McKeesport for outstanding achievement in medical education.

Άδειες ασκήσεως επαγγέλματος

- Άδεια ασκήσεως επαγγέλματος (Αρ. 12852) και εγγραφή στον Ιατρικό Σύλλογο Αθηνών.
- Άδεια ασκήσεως επαγγέλματος (Full Licensure), Πολιτεία της Florida, ΗΠΑ (Απρίλιος 2002, Αριθμός Αδείας ME-84758).
- Άδεια ασκήσεως επαγγέλματος (Medical License), Πολιτεία της Νέας Υόρκης, ΗΠΑ (Μάιος 2004, Αριθμός Αδείας 002128).

Συμμετοχή σε Ιατρικές Επιστημονικές Εταιρίες

- Ιατρικός Σύλλογος Αθηνών (Αριθμός μητρώου 038935).
- Ιατρική Εταιρεία Παθολογίας ΗΠΑ (American College of Physicians – American Board of Internal Medicine – Αριθμός μέλους 01108263).
- Αμερικάνικη Εταιρεία Λοιμώξεων (Infectious Diseases Society of America, IDSA-011139).
- HIV Medicine Association of Infectious Disease Society of America.
- Αμερικάνικη Εταιρεία Μικροβιολογίας (American Society of Microbiology, ASM-55893523).
- Διεθνής Εταιρεία Ανοσοκατεσταλμένου Ξενιστή (International Immunocompromised Host Society, Αριθμός Μέλους: 2692322).

 Συμμετοχή στη συγγραφή Ιατρικών συγγραμμάτων/βιβλίων

1. **Almyroudis NG**. "Hairy Cell Leukemia", In Infections in Cancer Patients, 1st edition. Editor: JN Greene, Marcel Dekker Inc. 2004.
2. **Almyroudis NG**, Battiwalla M, Segal BH. "Modulation of Immune Function" in Managing Infections in Patients with Hematological Malignancies, 1st edition. Editor: ME Kleinberg, Humana Press Inc. New York, NY. 2009.

 Δημοσιεύσεις

1. Koumakis G, Vassilomanolakis M, Barbounis V, Hatzichristou H, Tsoussis S, Psaras E, **Almyroudis N**, Efremidis A.
"High dose cyclophosphamide as a salvage treatment in advanced cancer"
Journal of BUON 4:157-160, 1999.
2. **Almyroudis NG**, Fuller A, Jakubowski A, Sepkowitz K, Jaffe D, Small TN, Kiehn TE, Pamer E, Papanicolaou GA.
"Pre- and post-engraftment bloodstream infection rates and associated mortality in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients"
Transpl Infect Dis. 2005 Mar;7(1):11-7.
3. **Almyroudis NG**, Holland SM, Segal BH.
"Invasive aspergillosis in primary immunodeficiencies"
Med Mycol. 2005 May;43 Suppl 1:S247-59.
4. Segal BH, Kwon-Chung J, Walsh TJ, Klein BS, Battiwalla M, **Almyroudis NG**, Holland SM, Romani L.
"Immunotherapy for fungal infections"
Clin Infect Dis. 2006 Feb 15;42(4):507-15. Epub 2006 Jan 13.
5. Dunford LM, Roy DM, Hahn TE, Padmanabhan S, Segal BH, **Almyroudis N**, McCarthy PL Jr, Battiwalla M.
"Dapsone-induced methemoglobinemia after hematopoietic stem cell transplantation"
Biol Blood Marrow Transplant. 2006 Feb;12(2):241-2.
6. Bhatti Z, Shaukat A, **Almyroudis NG**, Segal BH.
"Review of epidemiology, diagnosis, and treatment of invasive mould infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients"
Mycopathologia. 2006 Jul;162(1):1-15.
7. Tuma R, **Almyroudis N**, Sohn S, Panageas K, Rice R, Galinkin D, Blain M, Montefusco M, Pamer E, Nimer S, Kewalramani T.
"The serum IL-12:IL-6 ratio reliably distinguishes infectious from non-infectious causes of fever during autologous stem cell transplantation"
Cytotherapy. 2006;8(4):327-34.
8. **Almyroudis NG**, Sutton DA, Linden P, Rinaldi MG, Fung J, Kusne S.
"Zygomycosis in solid organ transplant recipients in a tertiary transplant center and review of the literature"
Am J Transplant. 2006 Oct;6(10):2365-74. Epub 2006 Aug 21.
9. Anaissie EJ, Segal BH, Graybill JR, Arndt C, Perfect JR, Kleinberg M, Pappas P, Benjamin D, Rubin R, Aberg JA, Adderson EE, Adler-Shohet FC, Akan H, Akova M, **Almyroudis NG**

- et al. "Clinical research in the lay press: irresponsible journalism raises a huge dose of doubt" *Clin Infect Dis*. 2006 Oct 15;43(8):1031-9. Epub 2006 Sep 13.
10. **Almyroudis NG**, Kontoyiannis DP, Sepkowitz KA, DePauw BE, Walsh TJ, Segal BH. "Issues related to the design and interpretation of clinical trials of salvage therapy for invasive mold infection" *Clin Infect Dis*. 2006 Dec 1;43(11):1449-55. Epub 2006 Oct 20.
 11. Segal BH, **Almyroudis NG**, Battiwalla M, Herbrecht R, Perfect JR, Walsh TJ, Wingard JR. antifungal agents and diagnostic adjuncts" *Clin Infect Dis*. 2007 Feb 1;44(3):402-9. Epub 2007 Jan 2.
 12. Battiwalla M, Paplham P, **Almyroudis NG**, McCarthy A, Abdelhalim A, Elefante A, Smith P, Becker J, McCarthy PL, Segal BH. "Leflunomide failure to control recurrent cytomegalovirus infection in the setting of renal failure after allogeneic stem-cell transplantation" *Transpl Infect Dis*. 2007 Mar;9(1):28-32.
 13. **Almyroudis NG**, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Kusne S. "In vitro Susceptibilities of 217 Clinical Isolates of Zygomycetes to Conventional and New Antifungal Agents". *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Apr 23; [Epub ahead of print]
 14. Gupta S, **Almyroudis NG**, Battiwala M, Bambac BJ, McCarthy PL, Proefrock AD, Ball D, Paplham P, Kwon-Chung J, Segal BH. "Successful treatment of disseminated fusariosis with posaconazole during neutropenia and subsequent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation" *Transpl Infect Dis*. 2007 Jun;9(2):156-60.
 15. Padmanabhan S, Battiwalla M, Hahn T, Ball D, Paplham P, Brown K, Segal BH, McCarthy P, **Almyroudis NG**. "Two cases of hepatic zygomycosis in allogeneic stem cell transplant recipients and review of literature" *Transpl Infect Dis*. 2007 Jun;9(2):148-52. Epub 2007 Jan 30.
 16. **Almyroudis NG**, Jakubowski A, Jaffe D, Sepkowitz K, Pamer E, O'Reilly RJ, Papanicolaou GA. "Predictors for persistent CMV-reactivation after T-cell depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT)" *Transpl Infect Dis*. 2007 Dec;9(4):286-94. Epub 2007 May 19.
 17. Battiwalla M, Wu Y, Bajwa RPS, Radovic M, **Almyroudis NG**, Segal BH, Wallace PK, Nakamura R., Padmanabhan S., Hahn T., McCarthy PL. "Ganciclovir Inhibits Lymphocyte Proliferation by Impairing DNA Synthesis" *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Jul;13(7):765-70. Epub 2007 May 7.
 18. AV Gonzalez, AJ Ullmann, **NG Almyroudis**, BH Segal. "Broad spectrum antifungal prophylaxis in patients with cancer at high risk for invasive mould infections: Point" *J Natl Compr Canc Netw*. 2008 Feb;6(2):175-82. Invited article.
 19. BH Segal, R Herbrecht, DA Stevens, L Ostrosky-Zeichner, J Sobel, C Viscoli, TJ Walsh, J Maertens, TF Patterson, JR Perfect, B Dupont, JR Wingard, T Calandra, CA Kauffman, JR Graybill, LR Baden, PG Pappas, JE Bennett, DP Kontoyiannis, C Cordonnier, MA Viviani, J Bille, **NG Almyroudis**, LJ Wheat, W Graninger, EJ Bow, SM Holland, BJ Kullberg, and WE Dismukes.

- Defining Responses to Therapy and Study Outcomes in Clinical Trials of Invasive Fungal Infections: Mycoses Study Group (MSG) and European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Consensus Criteria.
Clin Infect Dis. 2008 Sep 1;47(5):674-83. Epub ahead of print 2008 Jul 18.
20. Parameswaran IG, Segal BH, **Almyroudis NG**.
Antifungal agents in hematopoietic stem cell transplantation.
Curr Pharm Des. 2008;14(20):2011-21. Invited Review.
 21. **Almyroudis NG**, Segal BH.
Prevention and Treatment of Invasive Fungal Disease in Neutropenic Patients.
Current Opinion in Infectious Diseases. 2009 Aug;22(4):385-93. [Epub ahead of print].
Invited Review.
 22. **Almyroudis NG**, Fabian J, Hahn T, Segal BH, Wetzler M, McCarthy PL Jr.
Late infectious complications after cord blood stem cell transplantation.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009 Nov;28(11):1405-8. Epub 2009 Aug 12.
 23. Partridge-Hinckley K, Liddell GM, **Almyroudis NG**, Segal BH.
Infection Control Measures to Prevent Invasive Mould Diseases in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients.
Mycopathologia. 2009 Dec;168(6):329-37. [Epub ahead of print 2009 Oct 27].
 24. **Almyroudis NG**, Segal BH.
"The 2008 EORTC-MSG Consensus Definitions: What's New? What's Next?"
Current Fungal Infection Reports. 2009 Dec 1;3(4):195-200.
 25. Grimm MJ, Vethanayagam RR, **Almyroudis NG**, Lewandowski D, Rall N, Blackwell TS, Segal BH.
"Role of NADPH oxidase in host defense against aspergillosis".
Med Mycol. 2010 Jun 21. [Epub ahead of print]
 26. **Almyroudis NG**, Segal BH.
Antifungal prophylaxis and therapy in patients with hematological malignancies and hematopoietic stem cell transplant recipients.
Invited Review, Expert Rev Anti Infect Ther. 2010 Dec;8(12):1451-66.
 27. **Almyroudis NG**, Lesse A, Hahn T, Samonis G, Hazamy PA, Wang E, McCarthy Jr. PL, Wetzler M, Segal BH.
"Molecular epidemiology and risk factors for colonization by vancomycin resistant *Enterococcus* among patients with hematologic malignancies"
Infect Control Hosp Epidemiol. 2011 May;32(5):490-6.
 28. Jarkowski A 3rd, Forrest A, Sweeney RP, Tan W, Segal BH, **Almyroudis N**, Wang ES, Wetzler M.
Characterization of vancomycin pharmacokinetics in the adult acute myeloid leukemia population.
J Oncol Pharm Pract. 2012 Mar;18(1):91-6. Epub 2011 Apr 26.
 29. Vethanayagam RR, **Almyroudis NG**, Grimm MJ, Lewandowski DC, Pham CT, Blackwell TS, Petraitiene R, Petraitis V, Walsh TJ, Urban CF, Segal BH.
Role of NADPH Oxidase versus Neutrophil Proteases in Antimicrobial Host Defense.
PLoS One. 2011;6(12):e28149. Epub 2011 Dec 7.
 30. Swaika A, Paulus A, Miller KC, Sher T, **Almyroudis NG**, Ball D, Wood M, Masood A, Lee K, Chanan-Khan AA.
Acyclovir Prophylaxis against Varicella Zoster Virus Reactivation in Multiple Myeloma

Patients Treated with Bortezomib-Based Therapies: A Retrospective Analysis of 100 Patients.

J Support Oncol. 2012 Jul-Aug;10(4):155-9. Epub 2012 Jan 4.

31. **Almyroudis N**, Grimm M, Davidson B, Rohm M, Urban C and Segal B (2013). NETosis and NADPH oxidase: at the intersection of host defense, inflammation, and injury. *Front. Immun.* 4:45. doi: 10.3389/fimmu.2013.00045

Σχόλια σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά

1. **Almyroudis NG**, Segal BH.
"Antibacterial prophylaxis in patients with cancer and neutropenia"
N Engl J Med. 2006 Jan 5;354(1):90-4; author reply 90-4. Letter.
2. **Almyroudis NG**, Segal BH.
Editorial: Special Issue, "Invasive Fungal Diseases in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients".
Mycopathologia. 2009 Dec;168(6):269-70. [Epub ahead of print 2009 Nov 24].
3. **Almyroudis NG**, Segal BH.
Transmission of resistant bacteria in intensive care.
N Engl J Med. 2011 Aug 25;365(8):762-3. Letter.

Άλλες Δημοσιεύσεις

1. Nadler JP, **Almyroudis N**.
"The Big Picture on Resistance"
Medscape Electronic Publication, Sept 2000. <http://www.medscape.com/viewarticle/424188>
2. Smiley S, **Almyroudis N**, Segal BH.
"Epidemiology and management of opportunistic infections in immunocompromised patients with cancer"
Published in "Abstracts in Hematology & Oncology", 2005 Summer;8(3):20-30

Προφορικές Ανακοινώσεις σε Διεθνή Συνέδρια:

- **NG Almyroudis**, RR Vethanayagam, DC Lewandowski, N. Rall, MJ Grimm, TJ Walsh, R Petraitiene, V Petraitis, CT N Pham, JJ Bushey, CG Dennis, BH Segal. Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY, State Univ. of New York, Buffalo, NY.
"Innate Host Defense against Pulmonary Aspergillosis"
Προφορική παρουσίαση (M-1820), 50th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Boston, MA, Sept 12-15, 2010

Ανακοινώσεις σε Διεθνή Συνέδρια:

1. G. Koumakis, J. Fylis, K. Papanastasiou, M. Moraki, **N. Almyroudis**, M. Stamatellou, A. Efremidis. Saint Savvas Cancer Hospital, Athens, Greece.
"High dose sequential chemotherapy with peripheral blood stem cells transplantation in poor prognosis Hodgkin's Disease and Non-Hodgkin's Lymphoma patients".
Poster presentation, Hematology congress, Ioannina, Greece, 1996

2. Koumakis G, Vassilomanolakis M, Barbounis V, Hatzichristou H, Tsoussis S, Psaras E, **Almyroudis N**, Efremidis A. Saint Savvas Cancer Hospital, Athens, Greece.
"High dose cyclophosphamide as a salvage treatment in advanced cancer"
Poster presentation, 21st European Society of Medical Oncology Congress. Vienna, Austria 1996
3. **N. Almyroudis**, J. Sheaffer, P. Linden, J. Fung, S. Kusne. University of Pittsburgh Medical Center, and Thomas E. Starzl Transplantation Institute, Pittsburgh, PA.
"Zygomycosis in Solid Organ transplant recipients in a tertiary care transplant Center"
Poster presentation (# 285), 38th Infectious Disease Society of America Annual meeting. New Orleans, LA 2000
4. **N. Almyroudis**, V. Sastry. University of South Florida, Tampa, FL.
"Cryptococcal Meningitis: A presenting manifestation of Idiopathic CD4+ Lymphocytopenia"
Poster presentation (# 004), 11th Focus on Fungal Infections. Washington, D.C. March 14-16, 2001
5. J.P. Nadler, T.S. Wills, C. Somboonwit, A. Vincent, G. Leitz, K. Marino, E. Naik, S. Powers, N. Khan, **N. Almyroudis**, B. Laartz. University of South Florida, Tampa, FL.
"Anemia Prevalence Among HIV Patients: Antiretroviral Therapy and Other Risk Factors"
Poster Presentation (#1151), *2nd International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis and Treatment*. Paris, France, July 13-16, 2003.
6. **N. Almyroudis**, N. Symeonidis, K.A. Sepkowitz, E. Pamer, E. Papadopoulos, T. N. Small, G. A. Papanicolaou. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY.
"Mortality of disseminated adenovirus (ADV) infection after allogeneic HSCT in the era of Cidofovir."
Poster presentation (# K-1375), 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) Annual meeting. Chicago, IL, Sept. 14-17, 2003
7. **N. Almyroudis**, D. Jaffe, K. A. Sepkowitz, E. G. Pamer, E. Meier, E. Papadopoulos, T. N. Small, G. A. Papanicolaou. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY.
"Risk factors for late invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation"
Poster presentation (# M-1006), 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) Annual meeting. Chicago, IL, Sept. 14-17, 2003
8. EN Meier, **N. Almyroudis**, DC Jaffe, T Small, KA. Sepkowitz, GA. Papanicolaou. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY.
"Fever after allogeneic HSCT: Correlation with Infection, Engraftment and Outcome"
Poster presentation (# 362), 41st Infectious Disease Society of America Annual meeting. San Diego, CA, Oct. 9-12, 2003.
9. **N. Almyroudis**, S. Djurkovic, D. Jaffe, KA. Sepkowitz, GA. Papanicolaou. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY.
"Predictors for outcome of Cytomegalovirus reactivation after T-cell depleted (TCD) allogeneic hematopoietic stem cell transplantation"
Poster presentation (# 380), 41st Infectious Disease Society of America Annual meeting. San Diego, CA, Oct. 9-12, 2003.
10. T Kewalramani, RA Tuma, **N. Almyroudis**, S Sohn, RD Rice, D Galinkin, M Blain, J Qin, EG Pamer, SD Nimer. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY.
"Serum IL-12:IL-6 Ratio Reliably Distinguishes Infectious from Non-Infectious Causes of Fever during Autologous Stem Cell Transplantation (ASCT)"
Oral Session (#721), 46th Annual Meeting of the American Society of Hematology (ASH), San Diego, CA, Dec. 4-7, 2004.

11. GC Riebandt, BH Segal, DM Ball, PA Hazamy, P Smith, JF Gibbs, **NG Almyroudis**. Roswell Park Cancer Institute, State Univ. of New York, Buffalo, NY.
“The Epidemiology of Candidemia in a Tertiary Care Cancer Center”
Poster presentation (#193), 59th Annual Cancer Symposium of the Society of Surgical Oncology (SSO), San Diego, CA, March 23-26, 2006.
12. Z Bhatti, CG Dennis, J Feminella, YF Brun, **NG Almyroudis**, R Lewis, SM Holland, R Petraitiene, TJ Walsh, BH Segal. Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY.
“Host defense against aspergillosis in the p47^{phox}^{-/-} mouse model of chronic granulomatous disease”
Slide presentation (M-1683), 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) annual meeting. San Francisco, CA, Sept 27-30, 2006
13. C. Arana Yi, M. Battiwalla, SL Smiley, K Brown, L Charles-Steele, BH Segal, PL McCarthy Jr, **NG Almyroudis**. Roswell Park Cancer Institute, State Univ. of New York, Buffalo, NY.
“Disseminated cutaneous alternariosis in an allogeneic stem cell transplant recipient successfully treated with voriconazole”
Poster presentation, 4th Annual Research Poster Symposium, AMA-RFS Meeting, Honolulu, Hawaii, November 8-10 2007.
14. RR Vethanayagam, **N Almyroudis**, DC Lewandowski, N. Rall, MJ Grimm, TJ Walsh, R Petraitiene, CT N Pham, JJ Bushey, CG Dennis, BH Segal. Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY.
“Innate Host Defense Against Aspergillosis”
Poster presentation Roswell Park Immunology Program Retreat, Feb 8-9 2010, Holiday Valley, NY.
15. Davidson BA, Vethanayagam RR, Grimm MJ, Mullan B, **Almyroudis NG**, Osimiri L, Blackwell TS, Han W, Knight PK, and Segal BH.
“NADPH oxidase limits inflammation and injury in aspiration-induced acute lung injury”
Oral presentation at 2011 American Thoracic Society International Conference, Denver CO, May 13-18, 2011.
16. Davidson BA, Vethanayagam RR, Grimm MJ, Mullan B, **Almyroudis NG**, Vigil C, Blackwell TS, Han W, Freeman ML, Sporn MB, Itagaki K, Hauser CJ, Knight PK, and Segal BH.
“Nrf2 is Protective in Neutrophil-mediated Acute Lung Injury”
Oral presentation at 2011 American Thoracic Society International Conference, Denver CO, May 13-18, 2011.
17. A.N.H. Khan, K.L. Singel, M.J. Grimm, **N.G. Almyroudis**, D.S. Franklin, H.E. Godoy, S. Akers, S. Lele, S.I. Abrams, K. Odunsi, B.H. Segal.
“Role of peritoneal macrophages in immune regulation in epithelial ovarian cancer”
Poster presentation (#013), 12th Annual Buffalo Immunology Conference, Ellicottville, NY, Sept 10-11, 2012
18. M. Rahman, A.N.H. Khan, **N.G. Almyroudis**, M.J. Grimm, B.H. Segal.
“Role of Dectin-1 in modulating dendritic cell activation by soluble B-glucan”
Poster presentation (#028), 12th Annual Buffalo Immunology Conference, Ellicottville, NY, Sept 10-11, 2012
19. Neofytos D, Mullane K, Fredricks D, Granwehr B, Marr K, **Almyroudis N**, Kontoyiannis D, Maertens J, Fox R, Douglas C, Iannone R, Kauh A, Railkar R, Shire N. “Correlation Between Circulating Fungal Biomarkers and Clinical Outcome in Invasive Aspergillosis”
Poster Presentation (M-1676), 52nd Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) Annual meeting, San Fransisco, CA, Sept 9-12, 2012

20. Francis S, Hahn T, Zhang Y, **Almyroudis N**, Chen GL, Liu H, Ross M, Segal B, McCarthy P. “Short course of levofloxacin during neutropenia prevents early and late bacteremia episodes after allogeneic blood and marrow transplantation (alloBMT)”
Poster presentation (Abstract #49032), 54th Annual Meeting and Exposition of the American Society of Hematology (ASH), Atlanta GA, Dec. 8-11, 2012.

Ανακοινώσεις σε Ελληνικά Συνέδρια

Γ. Κουμάκης, Ι. Φύλης, Κ Παπαναστασίου, Μ. Μοράκη, **Ν. Αλμυρούδης**, Μ. Σταματέλλου, Α. Εφραιμίδου;
«Υψηλή δόση χημειοθεραπείας και μεταμόσχευση αρχέγονων περιφερικών κυττάρων του μυελού των οστών σε ασθενείς με υψηλή κακοήθεια Hodgkin και Non-Hodgkin λεμφώματα», Παρουσίαση (Poster), Αιματολογικό Συνέδριο, Ιωάννινα, Ελλάδα, 1996.

Συμμετοχή σε κλινικές μελέτες ως ερευνητής

1. “SENTRY Antimicrobial Surveillance Program” JMI Laboratories, North Liberty, Iowa, ΗΠΑ, Active.
2. “A Prospective, Non-Intervention, Observational Assessment of the Correlation Between Circulating Biomarkers of Fungal Bioburden and Clinical Outcome in the Setting of Invasive Aspergillosis” (Merck. Protocol 089-01), Closed.
3. “Phase IV open-label non-comparative trial of intravenous Anidulafungin followed by oral azole therapy for the treatment of candidemia and invasive candidiasis”. Pfizer Inc. Protocol number: A8851011, Closed.
4. “ARTEMIS Global Antifungal Surveillance Program”, Closed.
5. “A Multi-National, Multi-Center, Double-Blind, Randomized, Parallel Group Study to Compare the Safety and Efficacy of 200 mg PAR-101 taken q12h with 125 mg Vancomycin taken q6h for Ten Days in Subjects with *Clostridium Difficile*-associated Diarrhea” Optimer Pharmaceuticals Inc., Protocol 101.1.C.003;
6. “A Randomized, double-blind, placebo-controlled study to assess the efficacy of prophylactic use of maribavir for the prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem cell transplants”. Viropharma Inc. Protocol 1263-300.
7. “Randomized, Multi-Center, Comparative Trial of Short-Course Empiric Antibiotic Therapy versus Standard Antibiotic Therapy for Subjects with Pulmonary Infiltrates in the Intensive Care Unit (ICU)”. BAMSG Protocol Number: 4-02.
8. “A double blind, randomized, placebo controlled, multi-center trial of oseltamivir for the seasonal prophylaxis of influenza in immunocompromised patients” Protocol # NV20235, (OSELTAMIVIR, RO 64-0796).
9. “P02095 – Open Label, Limited Access Protocol of Posaconazole in Invasive Fungal Infections (PH 09203- Posaconazole)” Sponsor: Schering-Plough
10. “Characterization of Vancomycin Pharmacokinetics in the Acute Myelogenous Leukemia Population”, Sponsored by Roswell Park Cancer Institute.

11. "A Randomized Double-blind Trial of Fluconazole Versus Voriconazole for the Prevention of Invasive Fungal Infections in Allogeneic Blood and Marrow Transplant Patients (CTN 0101)." (NCG 52505), Sponsor: BMT CTN
12. "Safety and Efficacy of Varicella Zoster Immune Globulin (Human) (VariZIG™) in Patients At-Risk of Varicella Infection" Sponsored by Cangene Corporation, Protocol Number: VZ-009.
13. "A Phase 2 Clinical Trial to Evaluate the Safety, Immunogenicity, and Clinical Benefit of a CMV Immunotherapeutic Vaccine in Donors and CMV-Seropositive Recipients Undergoing Allogeneic, Matched Hematopoietic Cell Transplant (HCT)", Vical Inc. Closed.

Επιμέλεια ειδικής έκδοσης

- Επιμέλεια ειδικής έκδοσης για το περιοδικό Mycopathologia με θέμα "Invasive Fungal Diseases in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients", Mycopathologia; 2009 Dec;168(6)

Editorial Activities

- Ad hoc reviewer for "Mycopathologia"
- Ad hoc reviewer for "Expert review of anti-infective therapy"
- Ad hoc reviewer for "Clinical Infectious Diseases"
- Ad hoc reviewer for "Journal of Infectious Diseases"
- Ad hoc reviewer for "Transplant Infectious Disease" Journal
- Ad hoc reviewer for "Clinical Microbiology and Infection"
- Ad hoc reviewer for "Pediatric Infectious Disease Journal"
- Ad hoc reviewer for "Medical Mycology"
- Ad hoc reviewer for "Epidemiology and Infection"

Grant Reviews

- Health Services Research grant, Ministry of Health, Singapore, 2010.

Συμμετοχή σε Συμβουλευτικές Επιτροπές (Advisory Activities)

- *Consensus Panel Member*, MSG/EORTC, "Defining responses to therapy and study outcomes in clinical trials of invasive fungal infections", 2005

Παρακολούθηση Συνεδρίων στην Ελλάδα:

1. «17^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο», Αθήνα, 7-11 Μαΐου 1991
2. «20^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο», Αθήνα, 17-21 Μαΐου 1994
3. «21^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο», Αθήνα, 9-13 Μαΐου 1995
4. «22^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο», Αθήνα, 7-11 Μαΐου 1996
5. «23^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο», Αθήνα, 13-17 Μαΐου 1997
6. «6^η Επιστημονική Ημερίδα Λοιμώξεων», Ελληνική Εταιρεία Λοιμώξεων, Αθήνα, 31 Ιανουαρίου 2004.

Παρακολούθηση Διεθνών Συνεδρίων/Σεμιναρίων:

- "Adult Infectious Diseases Seminar"
Hilton Head Island, June 14-19, 1999.
- "12th Annual Intensive Review of Internal Medicine"
The Cleveland Clinic Foundation, Cleveland OH, June 19-24, 2000.
- "38th Infectious Diseases Society of America Annual Meeting"
New Orleans, LA, September 7-10, 2000.
- "11th Focus on Fungal Infections"
Washington, D.C. March 14-16, 2001.
- "39th Infectious Diseases Society of America Annual Meeting"
San Francisco, CA, October 25-28, 2001.
- "The Einstein/Montefiore Board Review and Update Course in Infectious Diseases" *New York, NY, October 7-10, 2002.*
- "5th Annual Controversies in the Management of the HIV-Infected Patient"
Weill Medical College of Cornell University, New York, NY, November 8, 2002.
- "43rd Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy"
Chicago, IL, September 14-17, 2003.
- "41st Infectious Diseases Society of America Annual Meeting"
San Diego, CA, October 9-12, 2003.
- "6th Annual Controversies in the Management of the HIV-Infected Patient"
Weill Medical College of Cornell University, New York, NY, November 7, 2003.
- "6th Annual Meeting of Infectious Disease Society of Greece"
Infectious Disease Society of Greece, Athens, Greece, January 30-31, 2004.
- "1st Advances Against Aspergillosis"
Stanford School of Medicine, San Fransisco, CA, Sept. 9-11, 2004.
- "42nd Infectious Diseases Society of America Annual Meeting"
Boston, MA, Sept. 30 – Oct. 3, 2004.
- "Infections in Cancer Annual Symposium"
Houston, TX, November 10-11, 2005.
- "45th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy"
Washington DC, December 16-19, 2005.
- "2nd Advances Against Aspergillosis"
Athens, Greece, February 22-25, 2006.
- "44th Infectious Diseases Society of America Annual Meeting"
Toronto, Canada, Oct. 12-15, 2006.
- "9th Annual Controversies in the Management of the HIV-Infected Patient" Weill Medical College of Cornell University, *New York, NY, November 3, 2006.*
- "4th International Symposium on Resistant Gram-positive Infections" Buffalo, NY, July 9-11, 2008
- "48th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy/46th Infectious Diseases Society of America Annual Meeting" Washington DC, October 25-28, 2008
- "Mycoses Study Group (MSG) 2009 Annual Meeting" Philadelphia, PA, April 2-3, 2009
- "American College of Physicians, Internal Medicine 2009" Philadelphia, PA, April 23-25, 2009

- “Hematologic Oncology Review 2010”, Buffalo, NY, January 16, 2010
- “Roswell Park Immunology Program Retreat”, Holiday Valley, NY, Feb 8-9 2010.
- “Immunity, Inflammation, and Cancer Conference” National Cancer Institute, Bethesda, MD, Sept 23-24, 2010
- “50th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy Annual Meeting” Boston MA, Sept 12-15, 2010
- “Hematologic Oncology Review 2011”, Buffalo, NY, January 15, 2011
- “2011 Infectious Disease Board Review Course” The George Washington University, Tysons Corner, VA, August 27-31, 2011
- “2013 Roswell Park Cancer Institute Tumor Immunology Retreat”, Holiday Valley, NY, Jan 17-18, 2013

Απόκτηση τίτλων Ειδικότητας και Εξειδίκευσης

- 27 Μαΐου 2002: Απόκτηση τίτλου ειδικότητας Παθολογίας στην Ελλάδα μετά από επιτυχή συμμετοχή στις εξετάσεις (αριθμός απόφασης 8721).
- 27 Φεβρουαρίου 2004: Απόκτηση τίτλου εξειδίκευσης στη Λοιμωξιολογία στην Ελλάδα μετά από επιτυχή συμμετοχή στις εξετάσεις (αριθμός πρωτ. 24509).
- Επιτυχής συμμετοχή στις εξετάσεις για απόκτηση άδειας άσκησης ιατρικού επαγγέλματος στις ΗΠΑ (Certified by the Educational Committee for Foreign Medical Graduates – ECFMG). USMLE step I: Σεπτέμβριος 1994, step II: Αύγουστος 1994, step III: Δεκέμβριος 1994.
- 22 Αυγούστου 2000: Επιτυχής συμμετοχή στις εξετάσεις της Αμερικάνικης Επιτροπής Παθολογίας (American Board of Internal Medicine) και απόκτηση τίτλου ειδικότητας Παθολόγου.
- 4 Νοεμβρίου 2002: Απόκτηση τίτλου ειδικότητας Λοιμωξιολόγου στις ΗΠΑ μετά από επιτυχή συμμετοχή στις εξετάσεις της Αμερικάνικης Επιτροπής Παθολογίας (American Board of Internal Medicine).

Βιβλιογραφική αναφορά που προέκυψε κατά τη διενέργεια της διδακτορικής διατριβής:

Almyroudis NG, Lesse AJ, Hahn T, Samonis G, Hazamy PA, Wongkittiroch K, Wang ES, McCarthy PL Jr, Wetzler M, Segal BH. Molecular epidemiology and risk factors for colonization by vancomycin-resistant Enterococcus in patients with hematologic malignancies. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2011 May;32(5):490-6.

