

Ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη εντερόκοκκοι (VRE) Ανίχνευση, φορία και μοριακή τυποποίηση σε χρόνια αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς

ΣΚΟΠΟΣ Η συχνότητα των λοιμώξεων και του αποικισμού από εντερόκοκκους ανθεκτικούς στη βανκομυκίνη (vancomycin resistant enterococci, VRE) αυξάνεται συνεχώς και σχετίζεται με παράγοντες που συχνά απαντώνται στους χρόνια αιμοκαθαιρόμενους (ΑΜΚ) ασθενείς. Ο σκοπός της μελέτης ήταν ο έλεγχος αποικισμού από VRE σε ασθενείς 4 μονάδων τεχνητού νεφρού (MTN) της ίδιας γεωγραφικής περιοχής, ο φαινοτυπικός και γονοτυπικός χαρακτηρισμός των στελεχών και η διερεύνηση παραγόντων κινδύνου που σχετίζονται με τον αποικισμό. ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ Κατά το χρονικό διάστημα 4 μηνών (1/9/01-30/12/01), από 334 ΑΜΚ ασθενείς 4 (I-IV) MTN της Δυτικής Αττικής ελήφθησαν, με βαμβακοφόρο στειλέο, δείγματα (από πρόσφατα κόπρανα είτε κατόπιν εισόδου στο ορθό) και καταγράφηκαν τα εξής στοιχεία τους: φύλο, ηλικία, χρόνος αιμοκάθαρσης, τύπος αγγειακής προσπέλασης, χορήγηση αντιβιοτικών και νοσοκομειακή νοσηλεία κατά τους τελευταίους 6 μήνες. Στη συνέχεια, τα δείγματα αυτά ενοφθαλμίστηκαν σε Enterococcosel άγαρ με 6 μg/mL βανκομυκίνης και στις περιπτώσεις ανάπτυξης VRE ακολούθησε η ταυτοποίηση, ο έλεγχος ευαισθησίας σε επτά αντιβιοτικά (βανκομυκίνη, τεϊκοπλανίνη, αμπικιλίνη, ερυθρομυκίνη, σιπροφλοξασίνη, γενταμικίνη και στρεπτομυκίνη) και ο προσδιορισμός του γονότυπου αντοχής στα γλυκοπεπτιδικά, τα οποία έγιναν με τα συστήματα ATB και Vitek, το E-test και την πολυηλεκτρική PCR. Τέλος, το γενετικό αποτύπωμα των στελεχών προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (pulsed field gel electrophoresis, PFGE). ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Απομονώθηκαν 13 στελέχη *Enterococcus faecium*, στα οποία ανιχνεύτηκε το γονίδιο *vanA*. Η συχνότητα αποικισμού με VRE ήταν 3,89%. Όλα τα στελέχη ήταν ανθεκτικά στην αμπικιλίνη, ερυθρομυκίνη, σιπροφλοξασίνη και στρεπτομυκίνη, ενώ 3 παρουσίαζαν αντοχή και στη γενταμικίνη. Η PFGE ταξινόμησε τους 13 VRE σε επτά τύπους: A (2 στελέχη), B (6) και C έως G (από 1). Στη MTN IV απομονώθηκαν 4 στελέχη που ανήκαν στον τύπο B και 2 στελέχη που ανήκαν στον τύπο A. Στελέχη του τύπου B απομονώθηκαν από 3 MTN. Η προηγούμενη εισαγωγή σε νοσοκομείο (P=0,001), η λήψη αντιβιοτικών (P=0,026) κατά τους τελευταίους 6 μήνες και το ανδρικό φύλο (P=0,019) προσδιορίστηκαν ως σημαντικοί παράγοντες κινδύνου. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ Για πρώτη φορά αναφέρεται αποικισμός από VRE σε χρόνια ΑΜΚ ασθενείς στην Ελλάδα. Παρόλο που το ποσοστό αποικισμού ήταν χαμηλό, διαπιστώθηκε διασπορά στελεχών του ίδιου κλώνου ανάμεσα σε ασθενείς διαφορετικών μονάδων και της ίδιας μονάδας. Τα ευρήματα αυτά, σε συνδυασμό με τη συσχέτιση του αποικισμού με προηγούμενη εισαγωγή σε νοσοκομείο, αποτελούν ισχυρές ενδείξεις μετάδοσης στελεχών μέσα σε περιβάλλον νοσηλείας.

Οι εντερόκοκκοι αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου, αλλά ως ευκαιριακά παθογόνοι μικροοργανισμοί προκαλούν το 10-12% των νοσοκομειακών λοιμώξεων, κυρίως ουρολοιμώξεις και μικρο-

βιαμίες. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι εγγενώς ανθεκτικοί σε πολλά ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά και μπορεί να εμφανίσουν και επίκτητη αντοχή στη βανκομυκίνη, προς την οποία οι *Enterococcus faecalis*

Π. Καλοχαιρέτης,¹
Ε. Μπαϊμάκου,²
Ε. Ποϊραζήδης,¹
Ι. Παπαπαρασκευάς,³
Σ. Πάλλια,¹
Π.Θ. Τάσιος,³
Α. Δρούζας,¹
Ε. Κουσκούνη,²
Χ. Ιατρού,¹
Λ. Ζέρβα²

¹Νεφρολογικό Κέντρο «Γ. Παπαδάκης»,
Γενικό Νοσοκομείο Νίκαιας-Πειραιά
²Μικροβιολογικό και Βιοχημικό
Εργαστήριο, «Αρεταίειο» Νοσοκομείο,
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών
³Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική
Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Vancomycin resistant enterococci:
Detection, carriage and molecular
typing in chronic hemodialysis
patients

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Βανκομυκίνη
Εντερόκοκκος
Χρόνια αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς

Υποβλήθηκε 14.3.2003

Εγκρίθηκε 16.7.2003

και *Enterococcus faecium*, τα κύρια παθογόνα είδη, είναι κατά κανόνα ευαίσθητοι.^{1,2}

Από το 1986, που απομονώθηκαν τα πρώτα ανθεκτικά στη βανκομυκίνη στελέχη εντεροκόκκου (vancomycin resistant *Enterococcus*, VRE), η συχνότητα τόσο της φορίας όσο και των λοιμώξεων από VRE συνεχώς αυξάνεται διεθνώς.^{2,3} Στις ΗΠΑ, οι νοσοκομειακές λοιμώξεις από VRE αποτελούν από τη δεκαετία του 1990 σημαντικότατο πρόβλημα, χωρίς να ανιχνεύεται φορία στην κοινότητα.^{1,4} Αντίθετα, στην Ευρώπη, ενώ οι λοιμώξεις αυτές δεν είναι συχνές, ανιχνεύεται φορία από VRE στην κοινότητα, η οποία έχει συνδεθεί με τη χρήση αντιμικροβιακών ουσιών στην κτηνοτροφία.^{2,5-7} Η συχνότητα της φορίας και των λοιμώξεων από VRE καθορίζεται τόσο από γεωγραφικές παραμέτρους όσο και από την υποκείμενη νόσο των ασθενών και το είδος του τμήματος νοσηλείας (Παθολογικές ή Χειρουργικές Κλινικές, Μονάδες Εντατικής Θεραπείας, Τμήματα Μεταμοσχεύσεων και Ογκολογικά Τμήματα). Μεταξύ των παραγόντων κινδύνου για αποικισμό ή λοίμωξη από VRE αναφέρονται η προηγούμενη χρήση βανκομυκίνης και ευρέος φάσματος αντιβιοτικών, η βαρύτητα της νόσου και η προηγηθείσα νοσοκομειακή νοσηλεία.^{2,3}

Οι χρόνια αιμοκαθαίρομενοι (ΑΜΚ) ασθενείς είναι ομάδα ιδιαίτερα εκτεθειμένη στους προαναφερθέντες παράγοντες κινδύνου,^{2,8} ενώ απομόνωση VRE από την ομάδα αυτή έχει αναφερθεί συχνά στη διεθνή βιβλιογραφία.⁹⁻¹⁴ Στην παρούσα μελέτη αναζητήθηκε το ποσοστό της εντερικής φορίας από VRE στους χρόνια ΑΜΚ ασθενείς 4 μονάδων τεχνητού νεφρού (MTN) της ίδιας γεωγραφικής περιοχής και εξετάστηκε η σχέση της με διάφορες κλινικές παραμέτρους που θα μπορούσαν να αποτελούν παράγοντες κινδύνου. Τα απομονωθέντα στελέχη των VRE μελετήθηκαν με φαινοτυπικές και γονοτυπικές μεθόδους, με σκοπό την κατανόηση της επιδημιολογίας τους. Από όσο είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, παρόμοια μελέτη δεν υπάρχει σε πληθυσμό Ελλήνων ΑΜΚ ασθενών.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Κατά τη διάρκεια 4 μηνών (Σεπτέμβριος–Δεκέμβριος 2001) ελήφθησαν 334 δείγματα κοπράνων από αντίστοιχο αριθμό συγκατατεθειμένων χρονίως ΑΜΚ ασθενών. Οι ασθενείς αυτοί αιμοκαθαίρονταν σε 4 MTN (στο εξής αναφέρονται: μονάδες I, II, III και IV) στην ευρύτερη περιοχή της Δυτικής Αττικής. Η MTN I ανήκει στο μεγαλύτερο Νοσοκομείο της περιοχής, στο οποίο συνήθως νοσηλεύονται οι ασθενείς όλων των προαναφερόμενων MTN και στο οποίο έγινε η ένταξη σε χρόνια πρόγραμμα αιμοκάθαρσης των περισσότερων ασθενών των MTN

II, III και IV. Οι μονάδες I, II, III και IV συμμετείχαν στη μελέτη με 60, 67, 60 και 147 ασθενείς, αντίστοιχα, οι οποίοι και αντιπροσώπευαν το 61,2% (εύρος 52,5–100%) του συνολικού αριθμού των ασθενών των μονάδων αυτών. Από τους ασθενείς της μελέτης, 190 ήταν άνδρες και 144 γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας 63±14 έτη και μέσο όρο χρόνου αιμοκάθαρσης 37,8±41,2 μήνες. Κατά τη λήψη των δειγμάτων, 223 ασθενείς (66,8%) χρησιμοποιούσαν ως αγγειακή προσπέλαση αυτόχθονη αρτηριοφλεβική επικοινωνία, 61 (18,3%) αρτηριοφλεβικό μόσχευμα, 33 (9,9%) προσωρινό υποκλείδιο ή σφαγιτιδικό καθετήρα αιμοκάθαρσης και 17 (5,1%) μόνιμο σφαγιτιδικό καθετήρα. Από το ιστορικό καταγράφηκαν επίσης στοιχεία για τυχόν προηγηθείσα αντιβιοτική αγωγή ή νοσοκομειακή νοσηλεία κατά τους προηγούμενους 6 μήνες. Κανένας από τους ασθενείς δεν παρουσίασε κλινικά σημεία λοίμωξης κατά το χρονικό διάστημα της δειγματοληψίας.

Τα δείγματα των κοπράνων ελήφθησαν με βαμβακοφόρο στείλειο, είτε κατόπιν εισόδου του στο ορθό είτε από πρόσφατα κόπρανα, τα οποία συλλέχθηκαν σε αποστειρωμένα δοχεία και ενοφθαλμίστηκαν σε εκλεκτικό θρεπτικό υλικό *Enterococcosel* agar (BBL, Becton Dickinson, Sparks, ΗΠΑ), που περιείχε 6 μg/mL βανκομυκίνης (Elli-Lilly, ΗΠΑ).¹⁵ Τα στελέχη των VRE που αναπτύχθηκαν σε αυτό το υλικό ανακαλλιέργηθηκαν σε τρυβλία με αιματούχο άγαρ (Biorprepare, Γέρακας, Αττική) για ταυτοποίηση του γένους και του είδους και έλεγχο ευαισθησίας, χρησιμοποιώντας τα συστήματα VITEK και ATB (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Γαλλία) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Καταγράφηκε η ευαισθησία στα εξής αντιβιοτικά: αμπικιλίνη (Am), ερυθρομυκίνη (Er), σιπροφλοξασίνη (Ci), βανκομυκίνη (Va), τεϊκοπλανίνη (Te), γενταμικίνη (Gm, σε υψηλή συγκέντρωση, MIC ≥512 mg/L) και στρεπτομυκίνη (St, σε υψηλή συγκέντρωση, MIC ≥1,024 mg/L). Η αντοχή στα γλυκοπεπτιδία επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο E-test (AB Biodisk, Solna, Σουηδία), σύμφωνα με τις οδηγίες του National Committee for Clinical Laboratory Standards.¹⁶

Για την επιβεβαίωση της ταυτοποίησης του είδους των *E. faecalis*, *E. faecium*, *Enterococcus gallinarum* και *Enterococcus casseliflavus/Enterococcus flavescens*, καθώς και για την ανίχνευση των γονιδίων αντοχής στα γλυκοπεπτιδία, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της πολυπλεκτικής (multiplex) PCR, όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.¹⁷ Με τη μέθοδο αυτή πολλαπλασιάζονται αλληλουχίες μεγέθους 941, 550, 732, 635, 822 και 439 bp, οι οποίες αντιστοιχούν στα γονίδια *ddl_{E. faecalis}*, *ddl_{E. faecium}*, *vanA*, *vanB*, *vanC₁* και *vanC_{2,3}*. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα στελέχη *E. faecalis* ATCC 29212 (ευαίσθητο στη βανκομυκίνη), *E. faecalis* V583 (φέροντος το γονίδιο *vanB*) και *E. faecium* BM 4147 (φέροντος το γονίδιο *vanA*). Με τη μέθοδο αυτή δεν διακρίνονται τα είδη *E. casseliflavus* και *E. flavescens* μεταξύ τους, επειδή οι αλληλουχίες του DNA των γονιδίων *vanC* των δύο ειδών (*vanC₂* και *vanC₃*, αντίστοιχα) είναι ταυτόσημες σε ποσοστό 98%.¹⁷ Η διαδικασία περιελάμβανε λύση των κυττάρων με βρασμό, διάρκειας 15 min, σε αποσταγμένο νερό και φυγοκέντρηση σε 12.000 × g για 5 min: 2 μL του υπερκείμενου χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδρα-

ση PCR (τελικός όγκος αντίδρασης 50 µL), που πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Hybaid PCR Sprint (Hybaid Ltd, Ashford, Middlesex, Ηνωμένο Βασίλειο). Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης (2%) που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (5 µg/mL).

Η ηλεκτροφόρηση ολικού DNA σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE) μετά από πέψη με την περιοριστική ενδονουκlease *SmaI* σε συσκευή CHEF DRIII (BioRad, Milan, Ιταλία) έγινε όπως έχει ήδη περιγραφεί.¹⁸ Μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο, η γέλη φωτογραφήθηκε με το σύστημα EASYWin32 (Herolab, Wiesloch, Γερμανία). Η κατάταξη των ηλεκτροφορητικών σχημάτων σε τύπους ακολούθησε τις δημοσιευμένες οδηγίες των Tenover et al¹⁹ με τη διόρθωση του Goering: στελέχη των οποίων τα ηλεκτροφορητικά σχήματα διέφεραν κατά 0-4 τμήματα DNA θεωρήθηκαν ότι ανήκαν στον ίδιο τύπο.²⁰

Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν η μέθοδος χ^2 και η δοκιμασία t-test, με τη χρήση του προγράμματος Epi Info 2000 (CDC, Atlanta, ΗΠΑ).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε 60 από τους 334 ασθενείς (18%) απομονώθηκαν ισάριθμα στελέχη εντεροκόκκων. Σύμφωνα με τη μέθοδο αναφοράς, την πολυπλεκτική PCR, 31 από τα 60 στελέχη ανήκαν στο είδος *E. gallinarum* και 16 στα είδη *E. casseliflavus*/*E. flavescens*, ενώ 13 στελέχη ήταν *E. faecium*. Και τα 13 στελέχη που ταυτοποιήθηκαν ως *E. faecium* περιείχαν το γονίδιο *vanA* και ήταν ανθεκτικά στη βανκομυκίνη και την τεϊκοπλανίνη, σύμφωνα με το E-test.

Επομένως, η συχνότητα αποικισμού με εντεροκόκκους ανθεκτικούς στη βανκομυκίνη στον πληθυσμό που εξετάστηκε ήταν 3,89% (13 από τους 334 ασθενείς). Τα στελέχη αυτά χαρακτηρίστηκαν στη συνέχεια όσον αφορά στην αντοχή τους σε άλλα αντιμικροβιακά φάρμακα, το γενετικό τους αποτύπωμα με τη μέθοδο PFGE και την κατανομή τους στις MTN της μελέτης αυτής (πίν. 1, εικ. 1).

Επτά από τα 13 στελέχη VRE απομονώθηκαν από ασθενείς της μονάδας IV (σε 7 από τους 147 ασθενείς, συχνότητα 4,76%), ενώ τα υπόλοιπα 6 στελέχη κατανομήθηκαν εξίσου στις υπόλοιπες 3 MTN, ως εξής: στη MTN I σε 2 από τους 60 ασθενείς (συχνότητα 3,33%), στη MTN II σε 2 από τους 67 ασθενείς (συχνότητα 2,99%) και στη MTN III σε 2 από τους 60 ασθενείς (συχνότητα 3,33%) (πίν. 1).

Ο έλεγχος ευαισθησίας έδειξε ότι και τα 13 VRE στελέχη ήταν ανθεκτικά στην αμπικιλίνη, ερυθρομυκίνη, σιπροφλοξασίνη και στρεπτομυκίνη (πίν. 1). Τρία (23%) ήταν επίσης ανθεκτικά στη γενταμικίνη. Ως εκ τούτου, ο επικρατέστερος φαινότυπος αντοχής στη μελέτη ήταν ο φαινότυπος AmErCiStVaTe (ευαίσθητος μόνο στη γενταμικίνη), που ανιχνεύθηκε σε 10 από τα 13 στελέχη (77%).

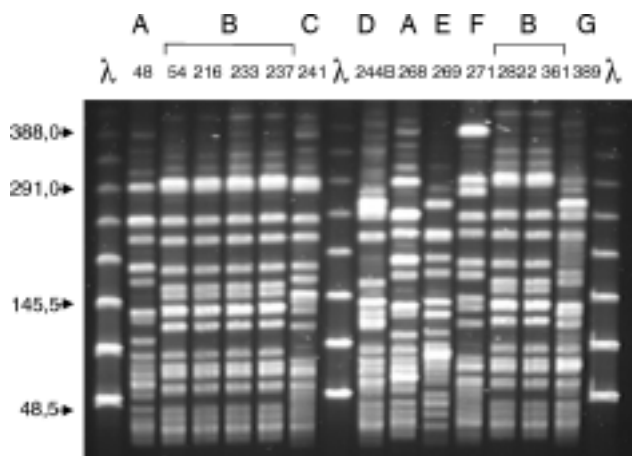
Η ανάλυση των γενετικών αποτυπωμάτων με την PFGE κατένειμε τα 13 στελέχη VRE σε 7 διαφορετικούς τύπους, από Α έως Γ (πίν. 1, εικ. 1). Ο τύπος Α περιελάμβανε 2 στελέχη (15%), ο τύπος Β ήταν ο επικρατέστερος με 6 στελέχη (46%), ενώ στους υπόλοιπους τύπους (C έως G) ανήκε από ένα στέλεχος (8%).

Πίνακας 1. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά 334 χρονίως αιμοκαθαυόμενων ασθενών αποικισμένων ή μη από εντεροκόκκους ανθεκτικούς στη βανκομυκίνη.

Δημογραφικά και κλινικά στοιχεία	VRE-θετικοί (n=13)	VRE-αρνητικοί (n=321)	P	Σχετικός κίνδυνος	95% όρια αξιοπιστίας
Φύλο	A: 12 (92,3%) Γ: 1 (7,7%)	A: 178 (55,5%) Γ: 143 (44,6%)	0,019	9,64	1,284-200,779
Ηλικία (έτη)	60,85±11,92	63,29±14,24	0,485		
Χρόνος ΑΜΚ (μήνες)	23,54±24,60	38,73±42,07	0,053		
Αγγειακή προσέλαση	ΑΦΕ: 6 (46,2%)	ΑΦΕ: 215 (70%)	0,209	0,423	0,122-1,442
	ΑΦΜ: 2 (15,4%)	ΑΦΜ: 57 (17,8%)	1	0,842	0,125-4,188
	ΜΚ: 1 (7,7%)	ΜΚ: 16 (5%)	1	1,589	0,073-13,146
	ΠΚ: 4 (30,8%)	ΠΚ: 33 (10,3%)	0,063	3,879	0,944-14,866
Χορήγηση αντιβιοτικών*	9 (69,2%)	112 (34,9%)	0,026	4,199	1,149-16,602
Χορήγηση αντιβιοτικών εκτός βανκομυκίνης*	4 (30,8%)	52 (16,2%)	0,318	2,299	0,571-8,589
Χορήγηση βανκομυκίνης*	5 (38,5%)	60 (18,7%)	0,159	2,719	0,742-9,591
Νοσηλεία*	8 (61,5%)	58 (18,4%)	0,001	7,255	2,056-26,639

VRE: Εντεροκόκκος ανθεκτικός στη βανκομυκίνη, Α: Άνδρες, Γ: Γυναίκες, ΑΜΚ: Αιμοκάθαρση, ΑΦΕ: Αρτηριοφλεβική επικοινωνία, ΑΦΜ: Αρτηριοφλεβικό μόσχευμα, ΜΚ: Μόνιμος σφαγιτιδικός καθετήρας, ΠΚ: Προσωρινός καθετήρας

* Κατά τους τελευταίους 6 μήνες



Εικόνα 1. Πηκτική αгарόζης PFGE του γονιδιωματικού DNA των στελεχών VRE μετά από επώαση με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Sma*I. Πάνω από τις διαδρομές φαίνονται οι αύξοντες αριθμοί των στελεχών και οι τύποι PFGE που ανιχνεύθηκαν. Αριστερά της πηκτικής αгарόζης έχει σημειωθεί το μέγεθος σε ζεύγη βάσεων των πολυμερών του φάγου λάμδα.

Τέσσερα από τα 6 στελέχη του τύπου B απομονώθηκαν από ασθενείς της MTN IV, ενώ τα άλλα δύο από ασθενείς των μονάδων II και III. Αντίθετα, τα στελέχη τύπου A και C απομονώθηκαν μόνο από ασθενείς της μονάδας IV, τα στελέχη τύπου E και F από τη MTN I και τα στελέχη τύπου D και G από τις MTN II και III, αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, 2 διαφορετικοί τύποι απομονώθηκαν σε καθεμιά από τις MTN I, II και III (E και F, B και D, B και G, αντίστοιχα), ενώ τα 7 στελέχη που απομονώθηκαν σε ασθενείς της MTN IV ανήκαν σε 3 διαφορετικούς τύπους (2 τύπου A, 4 τύπου B και 1 τύπου C).

Τα δημογραφικά και κλινικά στοιχεία των ασθενών της μελέτης και η στατιστική τους ανάλυση παρατίθενται στον πίνακα 2. Οι αποικισμένοι με VRE AMK ασθενείς, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους ασθενείς, ήταν συχνότερα άνδρες (92,3% και 55,5%, αντίστοιχα, $P=0,019$, σχετικός κίνδυνος 9,64), παρουσίαζαν μεγαλύτερη συχνότητα προηγούμενης νοσοκομειακής νοσηλείας (61,5% και 18,4%, αντίστοιχα, $P=0,001$, σχετικός κίνδυνος 7,255) και είχαν λάβει σε υψηλότερο ποσοστό αντιβιοτική αγωγή κατά το προηγούμενο εξάμηνο της μελέτης (69,2% και 34,9%, $P=0,026$, σχετικός κίνδυνος 4,199). Η ξεχωριστή ανάλυση χορήγησης της βανκομυκίνης και άλλων αντιβιοτικών δεν βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά στις δύο ομάδες ασθενών, παρόλο που ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με VRE (38,5% και 30,8%) σε σύγκριση με τους άλλους ασθενείς (18,7% και 16,2%, $P=0,159$ και $P=0,318$).

Ο μέσος χρόνος αιμοκάθαρσης των αποικισμένων ασθενών βρέθηκε μικρότερος από αυτόν των υπολοίπων, ωστόσο η συγκεκριμένη διαφορά ήταν στατιστικά οριακά σημαντική ($23,54\pm 24,60$ και $38,73\pm 42,07$ μήνες, $P=0,053$). Επίσης, οριακά σημαντική βρέθηκε η συχνότερη χρήση προσωρινών φλεβικών καθετήρων αιμοκάθαρσης στους ασθενείς με VRE, σε σύγκριση με τους άλλους ασθενείς (30,8% και 10,3%, $P=0,063$, σχετικός κίνδυνος 3,879).

Για τη διερεύνηση των πιθανών αιτιών, στα οποία θα μπορούσε να αποδοθεί η συσχέτιση μεταξύ αποικισμού με VRE και ανδρικού φύλου, η στατιστική ανάλυση επα-

Πίνακας 2. Φαινοτυπικά και γονοτυπικά χαρακτηριστικά των 13 ανθεκτικών στη βανκομυκίνη στελεχών *E. faecium*.

MTN	Ημερομηνία απομόνωσης	Ταυτοποίηση με PCR	Φαινότυπος αντοχής	Γονίδιο αντοχής στα γλυκοπεπίδια	Τύπος PFGE
IV	20/09	<i>E. faecium</i>	AmErCi__StVaTe	<i>vanA</i>	A
IV	24/09	<i>E. faecium</i>	AmErCiGmStVaTe	<i>vanA</i>	B
IV	23/10	<i>E. faecium</i>	AmErCi__StVaTe	<i>vanA</i>	B
IV	30/10	<i>E. faecium</i>	AmErCi__StVaTe	<i>vanA</i>	B
III	30/10	<i>E. faecium</i>	AmErCi__StVaTe	<i>vanA</i>	B
IV	30/10	<i>E. faecium</i>	AmErCi__StVaTe	<i>vanA</i>	C
II	30/10	<i>E. faecium</i>	AmErCi__StVaTe	<i>vanA</i>	D
IV	01/11	<i>E. faecium</i>	AmErCi__StVaTe	<i>vanA</i>	A
I	01/11	<i>E. faecium</i>	AmErCi__StVaTe	<i>vanA</i>	E
I	01/11	<i>E. faecium</i>	AmErCi__StVaTe	<i>vanA</i>	F
IV	07/11	<i>E. faecium</i>	AmErCi__StVaTe	<i>vanA</i>	B
II	03/12	<i>E. faecium</i>	AmErCiGmStVaTe	<i>vanA</i>	B
III	05/12	<i>E. faecium</i>	AmErCiGmStVaTe	<i>vanA</i>	G

MTN: Μονάδα Τεχνητού Νεφρού, Am: Αμικιλίνη, Er: Ερυθρομυκίνη, Ci: Σιπροφλοξασίνη, Gm: Γενταμικίνη (υψηλού επιπέδου), St: Στρεπτομυκίνη (υψηλού επιπέδου), Va: Βανκομυκίνη, Te: Τεϊκοπλανίνη

ναλήφθηκε συγκρίνοντας άνδρες και γυναίκες ασθενείς. Η μόνη διαφορά που βρέθηκε ήταν ο μικρότερος χρόνος αιμοκάθαρσης των ανδρών έναντι των γυναικών ($33,5 \pm 36,8$ και $43,42 \pm 46$ μήνες, $P < 0,05$).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη μελέτη εξετάστηκαν 334 χρόνια AMK ασθενείς 4 MTN, από τους οποίους 13 (3,89%) ήταν φορείς VRE, χωρίς κάποιος να παρουσιάζει σημεία εντεροκοκκικής λοίμωξης. Πολύ σημαντικό, τόσο από επιδημιολογικής όσο και από κλινικής πλευράς, είναι το γεγονός ότι όλες οι MTN της μελέτης (100%) εμφάνισαν αποικισμένους ασθενείς με συχνότητα αποικισμού που κυμάνθηκε από 2,98–4,76%. Όλα τα στελέχη VRE ανήκαν στο είδος *E. faecium*, περιείχαν το γονίδιο *vanA* και ήταν ανθεκτικά και σε άλλα ευρείας χρήσης αντιβιοτικά. Τα 13 αυτά στελέχη ανήκαν σε 7 διακριτούς χρωμοσωματικούς τύπους. Ωστόσο, 6 στελέχη ανήκαν σε ένα μόνο τύπο, το Β, ο οποίος ανιχνεύτηκε σε 3 MTN. Σημαντικοί παράγοντες κινδύνου για τον αποικισμό με VRE ήταν η νοσοκομειακή νοσηλεία και η χορήγηση αντιβιοτικών κατά τους προηγούμενους 6 μήνες και το ανδρικό φύλο. Ο βραχύτερος χρόνος αιμοκάθαρσης και η χρήση προσωρινών αγγειακών καθετήρων αποτέλεσαν οριακά στατιστικά σημαντικούς παράγοντες κινδύνου.

Παρόλο που το ποσοστό των VRE-θετικών ασθενών της μελέτης είναι χαμηλό σε σύγκριση με άλλες εργασίες,⁹⁻¹³ απ' όσο είναι γνωστό, είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται στην Ελλάδα αποικισμός VRE σε χρόνια AMK ασθενείς. Λίγες, άλλωστε, εργασίες μέχρι τώρα έχουν ασχοληθεί αποκλειστικά με το συγκεκριμένο πληθυσμό και αυτές προέρχονται κυρίως από τις ΗΠΑ. Στη χώρα αυτή, 33% των MTN περιλαμβάνουν τουλάχιστον 1 ασθενή, ο οποίος είτε έχει αποικιστεί είτε έχει εμφανίσει λοίμωξη από VRE.²¹ Φαίνεται ότι ο αποικισμός αυτός σχετίζεται με προηγούμενη νοσηλεία σε νοσοκομεία όπου ενδημούν οι VRE.¹⁴ Στη μελέτη των Tokars et al,⁹ στην οποία εξετάστηκαν 346 ασθενείς 7 ανεξάρτητων MTN από δύο γεωγραφικές περιοχές των ΗΠΑ, 5,8% από αυτούς βρέθηκαν αποικισμένοι, ενώ το εύρος ποσοστού φορίας ανά MTN ήταν 1–7,9%. Άλλες μελέτες από την ίδια χώρα έδειξαν ποσοστά φορίας 9%, 8,1% και 9,5%, εξετάζοντας αντίστοιχα 111, 124 και 168 ασθενείς 3 ανεξάρτητων μονάδων.¹⁰⁻¹²

Μεγάλο όμως ενδιαφέρον παρουσιάζει και η μελέτη που αναφέρεται σε φορία VRE σε AMK ασθενείς από το Βέλγιο, που αποτελεί μια από τις χώρες της Ευρώπης όπου ανιχνεύεται φορία στην κοινότητα.² Στη μελέτη

αυτή εξετάστηκαν 1.318 ασθενείς από 29 MTN. 2/29 μονάδες παρουσίασαν μηδενικό ποσοστό φορίας, ενώ στις υπόλοιπες το ποσοστό κυμάνθηκε μεταξύ 5,6–23,4%, με μέση τιμή το 14%.¹³ Από τους 185 ασθενείς που βρέθηκαν αποικισμένοι, στις 27 MTN, απομονώθηκαν 277 στελέχη VRE και τα αποτελέσματα της μοριακής τυποποίησης ήταν συμβατά με προέλευση των VRE στελεχών από την κοινότητα. Τα πολύ υψηλά αυτά ποσοστά αποικισμού οφείλονται εν μέρει στη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε, δηλαδή στα υγρά καλλιεργητικά υλικά, τον παρατεταμένο χρόνο επώασης και το μεγάλο όγκο κλινικού δείγματος. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η ανωτέρω μεθοδολογία αύξησε το ποσοστό της ανίχνευσης κατά 20%.

Στην παρούσα μελέτη, όλα τα στελέχη VRE που απομονώθηκαν από τους AMK ασθενείς ήταν *E. faecium* και έφεραν το γονίδιο *vanA*. Η μοριακή ανάλυση ανέδειξε τη γενετική πολυμορφία των VRE, δεδομένου ότι ανιχνεύτηκαν 7 διαφορετικοί τύποι PFGE σε 13 στελέχη. Τα αποτελέσματα αυτά είναι συμβατά με προέλευση των στελεχών από την κοινότητα, όπως άλλωστε έχει περιγραφεί προηγουμένως σε άλλες χώρες στην Ευρώπη.^{5-7,13} Σε αυτή την περίπτωση, η συχνή λήψη αντιμικροβιακής θεραπείας ασθενών υπό χρόνια αιμοκάθαρση πιθανότατα να έχει ως αποτέλεσμα την επικράτηση ανθεκτικών στελεχών στη χλωρίδα τους. Επιπλέον, όμως, η μοριακή ανάλυση των στελεχών έδωσε και ενδείξεις πιθανής μετάδοσης των στελεχών μεταξύ των ασθενών. Η μετάδοση αυτή ανιχνεύτηκε τόσο μέσα στην ίδια MTN, όσο και μεταξύ διαφορετικών μονάδων. Η διασπορά ενός τύπου VRE σε 3 MTN μοιάζει να υποδηλώνει κοινή πηγή μετάδοσης, όπως για παράδειγμα ένα νοσηλευτικό ίδρυμα το οποίο εξυπηρετεί όλους τους ασθενείς. Δεδομένου ότι δεν υπήρχαν διαθέσιμα στοιχεία για τον κατά καιρούς τόπο νοσηλείας των ασθενών, η αναδρομική εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για την πηγή μετάδοσης δεν είναι δυνατή.

Στη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε επίσης συσχέτιση του αποικισμού με VRE και της νοσοκομειακής νοσηλείας κατά το προηγούμενο εξάμηνο της μελέτης (61,5% και 18,4%, $P=0,001$, σχετικός κίνδυνος 7,255). Η συσχέτιση αυτή οφείλεται πιθανόν στη μεμονωμένη ή αθροιστική δράση παραγόντων όπως η ενδονοσοκομειακή μετάδοση, η βαρύτητα της νόσου, η χορήγηση αντιμικροβιακής θεραπείας και η τοποθέτηση κεντρικών γραμμών. Προηγηθείσα νοσηλεία τους τελευταίους 12 ή 25 μήνες, αλλά και μεγαλύτερος χρόνος παραμονής στο νοσοκομείο, αναφέρονται ως σημαντικοί παράγοντες κινδύνου για φορία VRE και σε άλλες μελέτες με χρονίως AMK ασθενείς.^{10,11} Σε μελέτη που εξετάσε προηγούμενη

νοσπλεία μόνο κατά τους τελευταίους 3 μήνες, η συσχέτιση βρέθηκε οριακά σημαντική.⁹ Σε αντίθεση με τα ανωτέρω, η νοσπλεία κατά το προηγούμενο έτος δεν συσχετίστηκε με αποικισμό από VRE στη μελέτη των Fishbane et al.¹²

Η σύνδεση της χορήγησης βανκομυκίνης ή και άλλων αντιβιοτικών με την ανάπτυξη φορίας από VRE αποτελεί σχεδόν καθολικό εύρημα στη βιβλιογραφία.^{1,3} Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαίωσαν τη συσχέτιση αυτή με τη λήψη αντιβιοτικών κατά το προηγθέν της λήψης των δειγμάτων εξάμηνο (69,2% έναντι 34,9%, $P=0,026$, σχετικός κίνδυνος 4,199). Ωστόσο, όταν συγκρίθηκε στους αποικισμένους και μη αποικισμένους ασθενείς χωριστά η λήψη βανκομυκίνης και άλλων αντιβιοτικών, παρόλο που παρατηρήθηκε διπλάσια συχνότητα λήψης στους αποικισμένους ασθενείς (πίν. 1), δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Ενδεχομένως, αυτό να οφείλεται στο σχετικά μικρό αριθμό των φορέων στη μελέτη.

Στη βιβλιογραφία υπάρχει ευρεία διακύμανση του ποσοστού των φορέων VRE με προηγθείσα λήψη βανκομυκίνης (17,6–100%) ή άλλων, πλην βανκομυκίνης, αντιβιοτικών (11,2–93,8%).^{9,11,12}

Ο μέσος χρόνος AMK των VRE-θετικών ασθενών της μελέτης ήταν βραχύτερος σε στατιστικά οριακό βαθμό από τον αντίστοιχο των μη αποικισμένων (23,54 ±24,60 έναντι 38,73±42,07 μήνες, $P=0,053$). Η διαφορά αυτή μπορεί να συνδέεται (α) με τη συχνή νοσοκομειακή νοσπλεία των νεο-εντασσομένων σε χρόνιο πρόγραμμα αιμοκάθαρσης ασθενών, είτε για τη διάγνωση και σταδιοποίηση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας είτε για την αντιμετώπιση της ουραιμίας ή τη διενέργεια αγγειακής προσπέλασης, και (β) με την τοποθέτηση κεντρικού φλεβικού καθετήρα λόγω καθυστερημένης προσέλευσης του ασθενούς και διάγνωσης της νόσου, γεγονός που παρατηρείται σε μεγάλο ποσοστό στους νέους AMK ασθενείς. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις αυξάνεται και η συχνότητα χορήγησης αντιμικροβιακής θεραπείας, που αποτελεί επιπρόσθετο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη VRE. Επιπλέον, η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών μπορεί να οφείλεται –εν μέρει τουλάχιστον– και στο γεγονός ότι το ποσοστό των βαρέως πασχόντων είναι μεγαλύτερο στους νεο-εντασσομένους ασθενείς. Η βαρύτητα της νόσου έχει και αυτή αναφερθεί ως παράγοντας κινδύνου για αποικισμό με VRE.⁹ Μόνο σε δύο προηγούμενες μελέτες εξετάστηκε η σχέση του χρόνου αιμοκάθαρσης με τη φορία με VRE. Στη μελέτη των Atta et al¹¹ δεν διέφερε ο χρόνος AMK μεταξύ VRE-θετικών και VRE-αρνητικών ασθενών, ενώ,

αντίθετα, τα αποτελέσματα των Roghmann et al¹⁰ συμφωνούν με αυτά της παρούσας μελέτης.

Η υπεροχή του ανδρικού φύλου στον αποικισμό με VRE στην παρούσα μελέτη (12 έναντι 1, $P=0,019$, σχετικός κίνδυνος 9,64) αποτέλεσε ένα εύρημα το οποίο δεν έχει αναφερθεί προηγουμένως. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στη συγκριτική ανάλυση των χαρακτηριστικών των ανδρών και γυναικών ασθενών και η μόνη σημαντική διαφορά που βρέθηκε αφορούσε στο χρόνο αιμοκάθαρσης, που ήταν μεγαλύτερος στις γυναίκες (43,42±46 και 33,5±36,80 μήνες, $P<0,05$). Επομένως, κατά πάσα πιθανότητα, η συσχέτιση μεταξύ ανδρικού φύλου και αποικισμού με VRE θα πρέπει να αποδοθεί στο γεγονός ότι οι άνδρες ασθενείς στη μελέτη παρουσίαζαν σημαντικά βραχύτερο χρόνο θεραπείας με αιμοκάθαρση.

Τέλος, η μελέτη αυτή έδειξε και συσχέτιση μεταξύ αποικισμού από VRE και τύπου της αγγειακής προσπέλασης, δηλαδή μια οριακή σημαντικότητα αποικισμού με VRE με τη χρήση προσωρινών φλεβικών καθετήρων μόνο (σχετικός κίνδυνος 3,879, $P=0,063$). Και η συσχέτιση αυτή οφείλεται πιθανόν στη συνέργεια διαφόρων παραγόντων, όπως νοσπλεία, χορήγηση αντιμικροβιακής θεραπείας, βαρύτητα νόσου και βραχύ διάστημα αιμοκάθαρσης. Ωστόσο, το εύρημα αυτό χρήζει περαιτέρω μελέτης, δεδομένης της αυξανόμενης χρήσης των φλεβικών καθετήρων (προσωρινών ή μόνιμων) για αιμοκάθαρση.²¹ Παρόμοια συσχέτιση διερευνήθηκε σε μία και μοναδική άλλη μελέτη, χωρίς όμως η συσχέτιση αυτή να βρεθεί στατιστικά σημαντική.⁹

Συμπερασματικά, παρόλο που το ποσοστό της φορίας από VRE στους χρονίως AMK ασθενείς της μελέτης ήταν σχετικά χαμηλό (3,89%), η ανίχνευσή της σε αυτόν τον υποπληθυσμό της χώρας μας είναι ιδιαίτερα ανησυχητική, δεδομένου ότι (α) και οι 4 MTN της μελέτης (100%) είχαν τουλάχιστον ένα φορέα VRE και (β) σχετικά πρόσφατα ανακοινώθηκε και η πρώτη ενδονοσοκομειακή διασπορά διαφόρων κλώνων VRE στην Ελλάδα,²² ενώ προηγουμένως είχαν αναφερθεί οι απομονώσεις των πρώτων κλινικών στελεχών.^{23,24} Τα παθογόνα αυτά χαρακτηρίζονται από μεγάλη ευκολία μετάδοσης μεταξύ των ασθενών μέσω του νοσπλευτικού προσωπικού και από πτωχές δυνατότητες χορήγησης κατάλληλης θεραπείας λόγω της πολυαντοχής τους. Η ανίχνευση του ίδιου στελέχους σε πολλούς ασθενείς και η συσχέτιση της φορίας με προηγθείσα νοσπλεία αποτελούν ιδιαίτερα σημαντικά ευρήματα στην εργασία μας.

Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης, εάν θα επιχειρούσε κάποιος να εισηγηθεί μέτρα για τον περιορισμό της φορίας από VRE, θα έπρεπε κατά βάση να εστιάσει στην ανάγκη έγκαιρης προσέλευσης των νε-

φροπαθών στους ειδικούς νεφρολόγους και της στενής παρακολούθησής τους, έτσι ώστε να αποφεύγονται περιττές νοσηλείες και η χρήση φλεβικών καθετήρων (με την έγκαιρη διενέργεια μόνιμης αρτηριοφλεβικής επικοινωνίας). Επιπρόσθετα, θα πρέπει να τονιστεί η ανάγκη για λελογισμένη χρήση της βανκομυκίνης και των άλλων αντιβιοτικών και να υπογραμμιστεί η τεράστια σημασία της αυστηρής τήρησης των κανόνων ελέγχου των λοιμώξεων τόσο στις μονάδες όσο και γενικότερα στο περιβάλλον του νοσοκομείου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστούμε θερμά την κυρία Γεωργία Διαμαντοπούλου για την εξαιρετική τεχνική υποστήριξη. Η μελέτη αυτή υποστηρίχθηκε εν μέρει από βραβείο της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Κλινικής Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων για το έτος 2000 (ESCMID Research Fellowship 2000) στον Π.Θ. Επίσης, ευχαριστούμε την εταιρεία Elli Lily για την ευγενική παραχώρηση της βανκομυκίνης.

ABSTRACT

Vancomycin resistant enterococci: Detection, carriage and molecular typing in chronic hemodialysis patients

P. KALOCHERETIS,¹ E. BAIMAKOU,² E. POIRAZLAR,¹ I. PAPAPARASKEVAS,³ S. PALLA,¹
P.T. TASSIOS,³ A. DROUZAS,¹ E. KOUSKOUNI,² C. IATROU,¹ L. ZERVA²

¹Center for Nephrology "G. Papadakis", Nikea General Hospital, Pireaus, ²Department of Microbiology and Biochemistry, "Areteion" Hospital, University of Athens, Athens, ³Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Athens, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2004, 21(4):336-343

OBJECTIVE The frequency of colonization and infection with vancomycin resistant enterococci (VRE) is increasing and is associated with factors frequently encountered in chronic hemodialysis (HD) patients. The purpose of this study was to determine the frequency of VRE colonization among a patient population treated at four dialysis units located in the same geographical area, to characterize isolated VRE by phenotypic and genotypic methods and to define risk factors for colonization. **METHOD** During a 4-month period (from 1/9/01 to 30/12/01) 334 fecal or rectal swab specimens were collected from the same number of HD patients, receiving treatment at four units (I-IV) located in the western Attica region. The following patient data were recorded: gender, age, time on hemodialysis, type of dialysis catheter, and hospitalization and administration of antimicrobials during the previous six months. The swab specimens were inoculated into Enterococcosel agar with 6 µg/mL vancomycin. Species identification, susceptibility testing to seven antimicrobials (vancomycin, teicoplanin, ampicillin, erythromycin, ciprofloxacin, streptomycin and gentamicin) and detection of the resistance genotype to glycopeptides were performed by ATB and Vitek systems, E-test and a multiplex PCR. The genomic fingerprint of isolates was obtained by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). **RESULTS** Thirteen *vanA* positive *Enterococcus faecium* strains were isolated. The frequency of colonization was 3.89%. All strains were resistant to ampicillin, erythromycin, ciprofloxacin and streptomycin and 3 strains were also resistant to gentamicin. PFGE separated the 13 strains into 7 types: type A (2 strains), type B (6) and types C to G (1 each). Four type B strains and 2 type A strains originated from patients treated at unit IV. Type B strains were isolated from three units. The following parameters were identified as risk factors: previous hospitalization (P=0.001), administration of antimicrobials during the previous 6 months (P=0.026) and male gender (P=0.019). **CONCLUSIONS** This is the first report of VRE colonization among HD patients in Greece. Despite the low number of VRE isolates, transmission of clones was detected between patients from different units as well as those in the same unit. In combination with the recognition of previous hospitalization as a significant risk factor these findings imply that the VRE strains were transmitted within a health care environment.

Key words: Chronic hemodialysis patients, *Enterococcus*, Vancomycin

Βιβλιογραφία

1. MURRAY BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N Engl J Med* 2000, 342:710–721
2. CETINKAYA Y, FALK P, MAYHALL CG. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev* 2000, 13:686–707
3. HOSPITAL INFECTION CONTROL PRACTICES ADVISORY COMMITTEE. Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995, 16:105–113
4. COQUE TM, TOMAYKO JF, RICKE SC, OKHYUSEN PC, MURRAY BM. Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community and animal sources in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 1996, 40:2605–2609
5. GAMBAROTTO K, PLOY MC, TURLURE P, GRELAUD C, MARTIN C, BORDESSOULE D ET AL. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and non-hospitalized controls in a cattle-rearing area of France. *J Clin Microbiol* 2000, 38:620–624
6. ENDTZ HP, VAN DEN BRAAK N, VAN BELKUM A, KLUYTMANS JA, KOELEMAN JGM, SPANJAARD L ET AL. Fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients and those living in the community in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 1997, 35:3026–3031
7. BATES J, JORDENS ZJ, GRIFFITHS DT. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. *J Antimicrob Chemother* 1994, 34:507–516
8. TOKARS JI. Vancomycin use and antimicrobial resistance in hemodialysis centers. *Am J Kidney Dis* 1998, 32:521–523
9. TOKARS JI, GEHR T, JARVIS WR, ANDERSON J, ARMISTEAD N, MILLER ER ET AL. Vancomycin-resistant enterococcal colonization in patients at seven hemodialysis centers. *Kidney Int* 2001, 60:1511–1516
10. ROGHMANN MC, FINK JC, POLISH L, MAKER T, BREWRINK J, MORRIS JG ET AL. Colonization with vancomycin-resistant enterococci in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1998, 32:254–257
11. ATTA MG, EUSTACE JA, SONG X, PERL T, SCHEEL PJ. Outpatient vancomycin use and vancomycin-resistant enterococcal colonization in maintenance dialysis patients. *Kidney Int* 2001, 59:718–724
12. FISHBANE S, CUNHA BA, MITTAL SK, RUGGIAN J, SHEA K, SCHOCH PE. Vancomycin-resistant enterococci in hemodialysis patients is related to intravenous vancomycin use. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999, 20:460–462
13. DESCHEEMAER P, IEVEN M, CHAPPELLE S, LAMMENS C, HAUCHECORNE M, WIJDOOGHE M ET AL. Prevalence and molecular epidemiology of glycopeptide-resistant enterococci in Belgian renal dialysis units. *J Infect Dis* 2000, 181:235–241
14. D'AGATA EMC, GREEN WK, SCHULMAN G, LI H, TANG YW, SCHAFFNER W. Vancomycin-resistant enterococci among chronic hemodialysis patients: a prospective study of acquisition. *Clin Infect Dis* 2001, 32:23–29
15. SWENSON JM, CLARK NC, FERRARO MJ, SAHM DF, DOERN G, PFALLER MA ET AL. Development of a standardized screening method for detection of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1994, 32:1700–1704
16. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A2. NCCLS, Villanova, PA, 1995
17. DUTKA-MALLEN S, EVERS S, COURVALIN P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 1995, 33:24–27
18. PAPAPARASKEVAS J, VATOPOULOS A, TASSIOS PT, AVLAMI A, LEGAKIS NJ, KALAPOTHAKI V. Diversity among high-level aminoglycoside resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother* 2000, 45:277–283
19. TENOVER F, ARBEIT R, GOERING R, MICKELSEN P, MURRAY B, PERSING D ET AL. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by PFGE: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995, 33:2233–2239
20. GOERING RV. The molecular epidemiology of nosocomial infection: an overview of principles, application and interpretation. In: Specter S, Bedinelli M, Friedman H (eds) *Rapid detection of infectious agents*. Plenum Press, New York, USA, 1998:131–157
21. TOKARS JI, FRANK M, ALTER MJ, ARDUINO MJ. National surveillance of dialysis-associated diseases in the United States. *Semin Dial* 2002, 15:162–171
22. MANIATIS AN, POURNARAS S, KANELLOPOULOU M, KONTOS F, DIMITROULA E, PAPAFRANGAS E ET AL. Dissemination of clonally unrelated erythromycin- and glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolates in a tertiary Greek hospital. *J Clin Microbiol* 2001, 39:4571–4574
23. PAPAPARASKEVAS J, STEFANOPOULOU J, VATOPOULOS A, THOMOPOULOS G, AVLAMI A. The first clinical isolate of *Enterococcus faecium* with the VanB phenotype in a teaching hospital in Greece. *Clin Microbiol Infect* 1999, 5:763–765
24. KOUPPARI G, PAPADAKI H, ARIDA C, SAKELLARIOU J, LEGAKIS NJ, PAPAPARASKEVAS J. First report of ampicillin and glycopeptide resistant *Enterococcus faecium* VanA bacteraemia in Greece. *Int J Antimicrob Agents* 2000, 16:254–256

Corresponding author:

P. Kalocheritis, 19 Vas. Othonos street, GR-153 54 Glyka Nera, Greece