

Maciej Przybylski

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Akademia Medyczna w Warszawie
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa, e-mail: maciej@conexion.pl

Wpłynęło w maju 2007 r.

1. Wstęp. 2. Typy oporności enterokoków na glikopeptydy. 2.1. Typ VanA. 2.2. Typ VanB (VanB1, VanB2 i VanB3). 2.3. Typ VanC (VanC1, VanC2 i VanC3). 2.4. Typ VanD. 2.5. Typ VanE. 2.6. Typ VanG. 3. Enterokoki zależne od wankomycyny. 4. Pochodzenie genów oporności na antybiotyki glikopeptydowe u *Enterococcus* spp. 5. Mechanizm transferu genów. 6. Rozprzestrzenianie szczepów VRE w oddziałach szpitalnych

Vancomycin-resistant enterococci. II. Mechanisms of resistance, epidemiology

Abstract: Antibiotic pressure resulting from the intense use of antibiotics during the last 60 years has led to the emerging problem of antibiotic resistance in bacterial strains. Enterococci (especially *Enterococcus faecium*) possess a number of intrinsic and acquired mechanisms of resistance. In clinical practice, resistance of Gram-positive cocci (mostly enterococci) to glycopeptide antibiotics is an important problem. During the past 15 years our knowledge about genetic background and molecular mechanisms responsible for glycopeptide resistance has been increasing. At present, there are six known types of enterococcal resistance to glycopeptides (VanA, VanB, VanC, VanD, VanE and VanG). VanA and VanB types are of major importance because of the highly efficient mechanism of horizontal gene transfer. The main reservoir of *vanA* and *vanB* genes are *E. faecium* and *E. faecalis*. VanC, VanD, VanE and VanG types are rarely found in bacteria isolated from human clinical specimens but, when present, are also a matter of concern. The common source of enterococcal *van* genes is also an important and interesting problem. Despite extensive search, this question still needs to be answered.

1. Introduction. 2. Types of glycopeptide resistance in enterococci. 2.1. VanA. 2.2. VanB (VanB1, VanB2 and VanB3). 2.3. VanC (VanC1, VanC2 and VanC3). 2.4. VanD. 2.5. VanE. 2.6. VanG. 3. Vancomycin-dependent enterococci. 4. Source of glycopeptide resistance genes existing in *Enterococcus* spp. 5. Mechanism of gene transfer. 6. Spreading of VRE strains in hospital wards

Słowa kluczowe: geny *van*, typy oporności Van, ruchome elementy genetyczne, enterokoki odporne na wankomycynę, VRE

Keywords: *van* genes, Van resistance types, mobile genetic elements, vancomycin-resistant enterococci, VRE

1. Wstęp

Intensywne stosowanie antybiotyków glikopeptydowych, a zwłaszcza doustnej ich postaci, doprowadziło w ciągu ostatnich dwudziestu lat do pojawienia się szczepów enterokoków opornych na leki przeciwbakteryjne z tej grupy.

Pojawienie się pierwszych szczepów enterokoków opornych na wankomycynę (VRE) miało miejsce w roku 1986, a informacja o pojawieniu się szczepów nowego typu została opublikowana w 1988 [15, 36, 55]. Pierwsze szczepy VRE izolowane były we Francji i Wielkiej Brytanii. Niedługo potem, w roku 1987, dokonano izolacji pierwszego szczepu VRE w Stanach Zjednoczonych [73]. W ciągu następnych lat, szczepy VRE izolowano w wielu krajach europejskich (Belgia, Dania, Niemcy, Włochy, Holandia, Hiszpania, Szwecja) oraz w innych częściach świata (Kanada, Australia, Malezja, Argentyna, Kolumbia, Nowa Zelandia, Brazylia, Korea Północna) [10, 15, 21, 81]. W Polsce, pierwszy szczep VRE (*Enterococcus faecium*, MIC wankomycyny >256 mg/L) wyizolowano w grudniu 1996, od pacjentki hospitalizowanej w dużym szpitalu onkologicznym w Gdańsku [74].

U enterokoków wrażliwych na wankomycynę dipeptyd D-Ala-D-Ala syntetyzowany przez ligazy D-alanylowo-D-alaninowe (*ddl*) zostaje dołączony do prekursora tripeptydowego tworząc pentapeptyd. Wankomycyna ma zdolność łączenia się wyłącznie z kompleksem mureina-pentapeptyd po jego przeniesieniu na zewnątrz błony komórkowej bakterii. Po związaniu się wankomycyny z jej miejscem docelowym, pentapeptyd nie może brać dalej udziału w syntezie ściany komórkowej [55]. U podstaw oporności enterokoków na antybiotyki glikopeptydowe leży zjawisko obniżenia siły wiązania antybiotyku glikopeptydowego z jego strukturą docelową [51]. Zamiana końcowego aminokwasu wchodzącego w skład prekursora peptydoglikanu, polegająca na dołączeniu D-seryny lub D-mleczanu w miejsce terminalnej D-alaniny powoduje, że wiązanie między terminalnym dipeptydem a heptapeptydem antybiotyku słabnie do tego stopnia, że antybiotyk nie jest w stanie skutecznie związać zmienionego substratu, który może zostać włączony do powstającego peptydoglikanu [22]. W przypadku podstawienia D-mleczanu w miejsce końcowej D-alaniny, nie dochodzi do wytworzenia wiązania o podstawowym znaczeniu dla skutecznego połączenia między

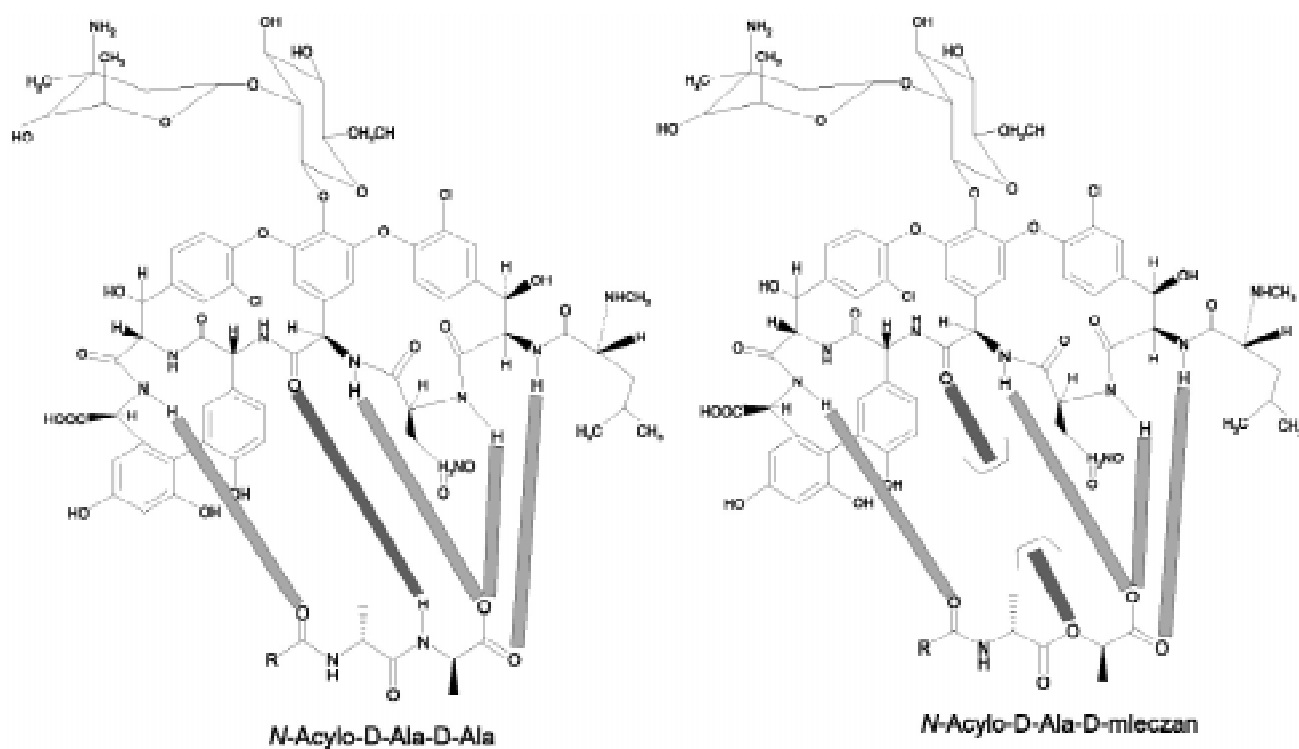
heptapeptydem glikopeptydu a końcowym dipeptydem prekursora peptydoglikanu (rys. 1) [36]. Dla odmiany, zamiana kluczowej D-alaniny na D-serynę nie prowadzi do zmniejszenia liczby wiązań wodorowych między antybiotykiem a dipeptydem – w tym wypadku dochodzi do zmiany konformacji przestrzennej wiązania, prowadzącej do jego osłabienia [36]. Fenotypowo, szczepy wytwarzające prekursor peptydoglikanu kończące się dipeptydem D-Ala-D-Lac prezentują oporność na wysokie lub średnie stężenia glikopeptydów (MIC wankomycyny 8–1000 mg/L, teikoplaniny 0,5–512 mg/L), natomiast szczepy, których prekursor peptydoglikanu kończy się dipeptydem D-Ala-D-Ser są odporne tylko na niskie stężenia wankomycyny oraz wrażliwe na teikoplaninę (MIC wankomycyny 2–32 mg/L, teikoplaniny 0,5–1 mg/L) [15, 22].

Wankomycyna jest w użyciu klinicznym od 45 lat, przy czym przez pierwsze 30 lat jej stosowania nie obserwowano zjawiska pojawiania się oporności na ten antybiotyk u szczepów enterokoków wywołujących zakażenia u ludzi. Znaczne opóźnienie w pojawieniu się oporności na wankomycynę tłumaczy się dużą złożonością kompleksu genów niezbędnych dla prawidłowego jej wyrażenia się [58]. Występujący u enterokoków operon oporności na wysokie stężenia wankomycyny musi zawierać geny kodujące zespół białek, które:

- syntetyzują D-mleczan z pirogronianu (D-mleczan nie występuje zazwyczaj w komórce enterokoków),
- rozcinając dipeptydy D-Ala-D-Ala, tworzą miejsce dla dołączenia D-mleczanu i jednocześnie likwidują strukturę docelową dla wankomycyny,
- dołączają D-mleczan do D-alaniny, umożliwiając w ten sposób powstanie prekursorów peptydoglikanu kończących się dipeptydem D-Ala-D-Lac,
- są odpowiedzialne za regulację działania powyższych białek,
- reagują na obecność wankomycyny (lub innych glikopeptydów) w środowisku [1, 12, 22].

Wiele wskazuje na to, że nabywanie przez enterokoki oporności na antybiotyki glikopeptydowe jest procesem złożonym, w który zaangażowane są geny „importowane” od różnych gatunków bakterii [66].

Do tej pory u enterokoków opisano sześć różnych fenotypów – lub typów – oporności na antybiotyki glikopeptydowe, w zależności od poziomu oporności na wankomycynę i teikoplaninę oraz stopnia indukcji oporności przez te antybiotyki. Poznane dotychczas typy oporności to VanA, VanB, VanC, VanD, VanE i VanG. W obrębie fenotypów VanB i VanC wyróżnia się po trzy subtypy, odpowiednio: VanB1, VanB2 i VanB3 oraz VanC1, VanC2 i VanC3 [22]. Podsumo-



Rys. 1. Schemat zaburzenia wiązania wankomycyny z docelowym dipeptydem w wyniku zamiany końcowej D-alaniny na D-mleczan. Pojawienie się prekursorów peptydoglikanu kończących się D-alanylo-D-mleczanem prowadzi do zerwania wiązania kluczowego dla inhibicji syntezy peptydoglikanu przez wankomycynę

Tabela I

Typy oporności enterokoków na antybiotyki glikopeptydowe. Dane zaczerpnięte z [14, 15, 22, 28, 55 i 62]

Oporność	Nabyta					Wrodzona niskiego poziomu
	wysokiego poziomu	zmiennego poziomu	średniego poziomu		niskiego poziomu	
Typ	VanA	VanB1/B2/B3	VanD	VanG	VanE	VanC1/C2/C3
MIC wankomycyny	64–1000 mg/L	4–1000 mg/L	64–256 mg/L	16 mg/L	8–32 mg/L	2–32 mg/L
MIC teikoplaniny	16–1000 mg/L	0,5–1 mg/L	2–256 mg/L	0,5 mg/L	0,5 mg/L	0,5–1 mg/L
Koniugacja	+	+	–	+	–	–
Przenoszenie oporności	<i>Tn1546</i>	<i>Tn1547 Tn1549 Tn5382</i>	nieznane	nieznane	nieznane	nie dotyczy
Gatunki	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. avium</i> <i>E. durans</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. raffinosus</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. faecalis</i>
Ekspresja	indukowana		konstytutywna lub indukowana	indukowana		konstytutywna
Lokalizacja	plazmid lub chromosom		chromosom	chromosom		chromosom
Modyfikacja struktury docelowej	D-Ala-D-Lac			D-Ala-D-Ser		

wanie informacji dotyczących różnych typów oporności enterokoków na antybiotyki glikopeptydowe zamieszczono w tabeli I.

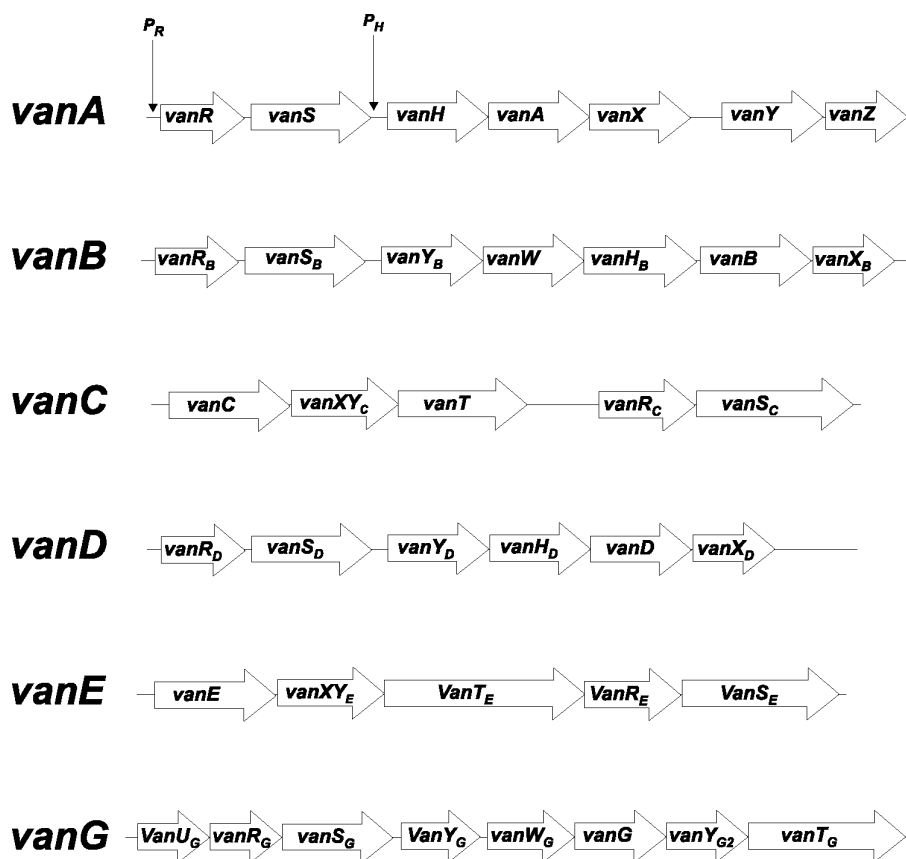
2. Typy oporności enterokoków na glikopeptydy

2.1. VanA jest typem nabytej oporności na wysokie stężenia wankomycyny oraz teikoplaniny, przy czym u szczepów enterokoków izolowanych od człowieka ten typ oporności spotyka się najczęściej [22]. Oporność na glikopeptydy w typie VanA jest indukowana przez wankomycynę i przez teikoplaninę. Znane są także antybiotyki nie należące do grupy glikopeptydów (bacytracyna, moenomycyna) mogące indukować ekspresję oporności na glikopeptydy u szczepów posiadających typ oporności VanA lub VanB [7]. Spośród enterokoków, fenotyp VanA obserwowany jest u *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. raffinosus*, *E. hirae*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii* oraz *E. gallinarum* [22, 55]. Podłoże molekularne oporności typu VanA należy do najlepiej poznanych. Transpozon *Tn1546*, prototypowy element genetyczny o długości 10,5–10,8 tysięcy par zasad, zawierający geny warunkujące typ oporności VanA, został wykryty w szczepie klinicznym *E. faecium* w roku 1993 [21, 36]. Transpozony typu *Tn1546*, należące do rodziny transpozonów Tn3, mogą występować pod postacią plazmidów (najczęściej niekoniugacyjnych) lub fragmentów chromosomu [6]. Opiswane są także szczepy

kliniczne *E. faecium* VanA posiadające plazmidy koniugacyjne zależne od gatunkowo swoistych feromonów płciowych [49]. W obrębie niektórych plazmidów tego typu, wspólnie z genami oporności na glikopeptydy, przenoszone są także geny warunkujące zjadliwość enterokoków [32].

W skład transpozonu wchodzi siedem genów związanych z opornością na glikopeptydy (*vanA*, *vanH*, *vanX*, *vanY*, *vanZ*, *vanS* i *vanR*), dwa promotory (P_H i P_R), oraz dwie oraz dwie ramki odczytu (ORF1 i ORF2) odpowiedzialne za transpozycję replikatywną całego elementu *Tn1546* (rys. 2) [22, 36, 55]. Jakkolwiek występujące u enterokoków geny oporności wchodzące w skład operonu VanA należą do konserwatywnych elementów genetycznych, w obrębie transpozonów typu *Tn1546* stwierdza się zróżnicowanie genetyczne wynikające z obecności sekwencji insercyjnych (*IS1251*, *IS1542*, *IS1216*, *IS1476* oraz sekwencji typu *IS3*), delecji i mutacji punktowych [24, 81].

Geny *vanS* i *vanR* kodują dwuskładnikowy układ regulatorowy, który bierze udział w procesie indukcji oporności fenotypu VanA w odpowiedzi na obecność glikopeptydów w środowisku. Białko VanS, sensor związany z błoną komórkową bakterii, w swojej domenie cytoplazmatycznej zawiera resztę histydynową, która ulega fosforylacji w obecności glikopeptydów. VanR pełni funkcję aktywatora transkrypcyjnego uruchamianego po wychwyceniu grupy fosforylowej z aktywowanego białka VanS. Ufosforylowana forma VanR uruchamia wspólną transkrypcję genów *vanH*, *vanA*,

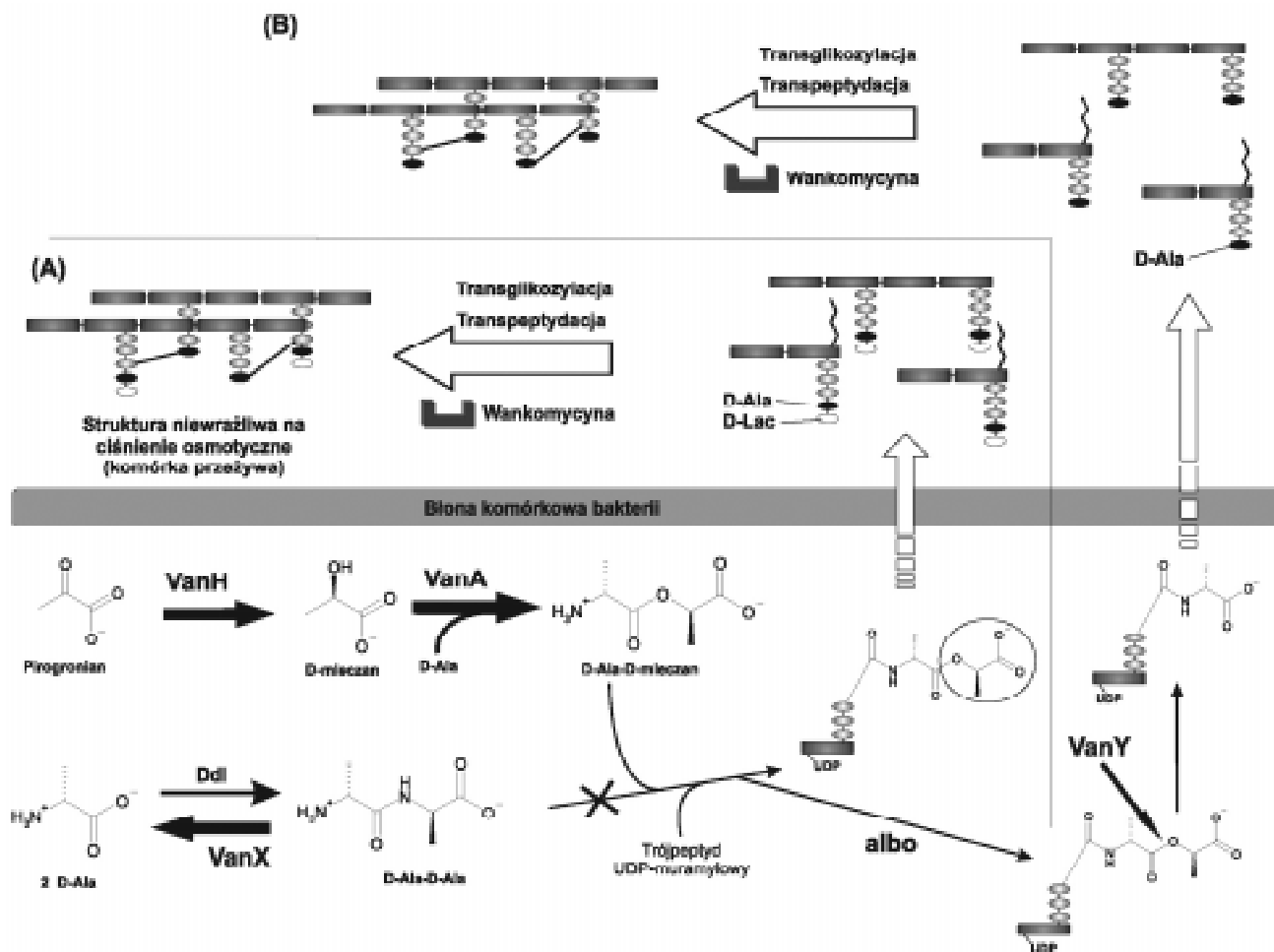


Rys. 2. Schemat organizacji klastrow genów oporności na antybiotyki glikopeptydowe. Objaśnienia w tekście

vanX, *vanY* i *vanZ* (po dołączeniu do promotora P_H) oraz *vanS* i *vanR* (po dołączeniu do promotora P_R) [15, 36]. Gen *vanH* koduje dehydrogenazę kwasu D-hydroksylowego (VanH) redukującą pirogronian do D-mleczanu [5], natomiast gen *vanA* koduje ligazę VanA dołączającą D-Lac do D-Ala. Układ *vanA/vanH* jest zatem bezpośrednio odpowiedzialny za syntezę terminalnych dipeptydów D-Ala-D-Lac w prekursorach peptydoglikanu enterokoków opornych na glikopeptydy. Geny *vanX* i *vanY* kodują, odpowiednio, DD-dipeptydazę oraz DD-karboksypeptydazę. DD-dipeptydaza VanX hydrolizuje dipeptydy D-Ala-D-Ala, likwidując składnik niezbędny dla powstania prawidłowych prekursorów peptydoglikanu [12], a DD-karboksypeptydaza VanY, enzym zależny od jonów Zn^{2+} , usuwa cząsteczki końcowej D-alaniny niezhydrolizowane przez VanX [55].

Otrzymane sztucznie szczepy enterokoków pozbawione genu *vanY* cechują się większą wrażliwością na wankomycynę w porównaniu do szczepów posiadających ten gen [58]. Badania prowadzone przez De Jonge'a i wsp. [26], polegające na analizie składu prekursorów peptydoglikanu oraz dojrzałego peptydoglikanu szczepów VR i VS enterokoków, wykazały istnienie pewnego paradoksu. W pracy tej użyto dwóch szczepów *E. faecalis* – rodzicielskiego, wrażliwego na wankomycynę, oraz opornego na wankomycynę, otrzy-

manego w wyniku włączenia plazmidu zawierającego operon Tn1546 do wrażliwego szczepu rodzicielskiego. Tak jak się spodziewano, cząsteczki prekursorów peptydoglikanu szczepów wrażliwych kończyły się dipeptydami D-Ala-D-Ala, a prekursorów szczepów opornych – dipeptydami D-Ala-D-Lac. Jednak w dojrzałym ścianie komórkowej szczepów opornych na wankomycynę nie wykrywano D-mleczanu; innymi słowy, w skład ściany komórkowej szczepów wrażliwych i opornych wchodziły te same aminokwasy. Różnica występowała natomiast w strukturze: mureinopeptydy szczepów wrażliwych na wankomycynę zawierały pentapeptydy kończące się D-alanylo-D-alaniną, natomiast w ścianie komórkowej szczepów opornych występowały tetrapeptydy kończące się D-alaniną. Autorzy zasugerowali, że cząsteczki D-mleczanu są albo usuwane z peptydów w procesie sieciowania peptydoglikanu, albo w ogóle nie dochodzi do włączenia mleczanu w strukturę syntetyzowanego peptydoglikanu (rys. 3B). Istnieją dwie hipotezy tłumaczące to zjawisko: (i) cząsteczki D-mleczanu odcinane są przez rodzimy, kodowany chromosomalnie enzym o aktywności karboksypeptydazy lub (ii) VanY jest enzymem zdolnym do usuwania zarówno terminalnych reszt D-Ala jak i D-Lac [26, 55, 58]. Jednak dokładny mechanizm usuwania D-mleczanu ze struktury dojrza-



Rys. 3. Mechanizm oporności na glikopeptydy charakterystyczny dla typu VanA (objaśnienia w tekście)

łego peptydoglikanu szczepów opornych na wankomycynę pozostaje niejasny.

Operon VanA zawiera jeszcze jedną otwartą ramkę odczytu, *vanZ*, kodującą białko związane z opornością niskiego stopnia na teikoplaninę, lecz o nieznanym mechanizmie działania [22].

Produkcja ligazy VanA kojarzona jest z opornością zarówno na wysokie stężenia wankomycyny, jak i teikoplaniny. Opisywane są jednak szczepy oporne na wankomycynę i wrażliwe na teikoplaninę (co jest raczej kojarzone z fenotypem VanB) posiadające gen *vanA*. Lee i wsp. [45] przedstawili wyniki badań dowodzących, że delecja genów *vanZ* i *vanY*, jak również samego genu *vanZ* prowadzą do utraty oporności szczepów VanA na teikoplaninę, przy równoczesnym zachowaniu oporności na wankomycynę.

2.2. Typ VanB (VanB1, VanB2 i VanB3)

Cechą charakterystyczną typu VanB jest oporność na różne stężenia wankomycyny i wrażliwość na teikoplaninę; oporność tego typu jest indukowana przez wankomycynę, lecz nie przez teikoplaninę. Fenotyp

VanB (opisany po raz pierwszy w roku 1989 [140]) jest charakterystyczny przede wszystkim dla *E. faecalis* i *E. faecium*. Można znaleźć także doniesienia opisujące występowanie fenotypu VanB u *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* i *E. raffinosus* [22, 51, 55]. Na podstawie różnic w sekwencjach DNA, wyróżniono trzy podtypy genów kodujących ligazę D-Ala-D-Ala charakterystyczną dla typu VanB: *vanB1*, *vanB2* oraz *vanB3* [15]. Różnice w sekwencjach nukleotydów między *vanB1* a *vanB2* wynoszą 3,6%, natomiast między *vanB1* a *vanB3* – 5%. Nie wykazano jednak wyraźnej korelacji między występowaniem konkretnego podtypu ligazy VanB a poziomem oporności na wankomycynę i teikoplaninę [48]. Z drugiej strony, niektóre szczepy *E. faecium* VanB izolowane w tajwańskich szpitalach, gdzie obserwuje się przewagę genu oporności *vanB2*, posiadały podwyższony stopień oporności na teikoplaninę (MIC = 32 mg/L), co było skorelowane z występowaniem punktowej mutacji Leu → Met w pozycji 308 genu *vanB* [48].

W porównaniu do VanA, typ VanB oporności występuje znacznie rzadziej. Pośród szczepów izolowanych w Europie, typ VanB można określić jako

zjawisko marginalne. Inaczej sprawa wygląda w Stanach Zjednoczonych – tam częstość występowania szczepów posiadających typ VanB jest znacznie większa, opisywane są epidemie zakażeń szpitalnych wywołanych wyłącznie przez szczepy VanB [17].

Struktura i organizacja genów oporności na glikopeptydy występująca w typie VanB jest zbliżona do tej obserwowanej w VanA (rys. 2). Kodowana przez gen *vanB* ligaza VanB wykazuje 76% podobieństwa sekwencji aminokwasów z VanA. Występujące w obrębie operonu VanB geny, analogiczne do VanA, noszą oznaczenia *vanH_B*, *vanX_B*, *vanY_B*, *vanS_B* oraz *vanR_B* [36]. Występuje duży stopień podobieństwa sekwencji DNA między homologicznymi zespołami genów *vanHAX* oraz *vanH_BBY_B* (średnio 70% podobieństwa), natomiast podobieństwo między odpowiednimi genami *R*, *S* i *Y* VanA i VanB jest znacząco niższe (25 do 35% podobieństwa). W zgrupowaniu genów *vanB* nie występuje homolog genu *vanZ* wykrywanego u VanA, ale operon *vanB* zawiera ORF *vanW*, przy czym funkcja białka kodowanego przez ten gen jest nieznana [55, 76].

System regulatorowy występujący u szczepów należących do typu VanB nie ulega indukcji pod wpływem teikoplaniny. Z drugiej strony, obecność wankomycyny w środowisku może doprowadzić do wyindukowania oporności zarówno na wankomycynę, jak i teikoplaninę. Oprócz tego, możliwe jest otrzymanie mutantów opornych na teikoplaninę z wrażliwych szczepów VanB, hodowanych w podłożach zawierających niskie stężenia tego antybiotyku. Tego typu mutanty mogą powstawać także podczas kuracji teikoplaniną w doświadczeniach prowadzonych *in vivo* [15]. Podłożem tego typu konstytutywnej oporności na teikoplaninę może być (i) delecja części zgrupowania genów *vanB*, zawierającej układ regulatorowy *vanR_B/vanS_B*, lub (ii) mutacje punktowe prowadzące do utraty funkcji regulatorowej przez *VanS_B*, co prowadzi do permanentnej fosforylacji *VanR_B*. Zmutowane szczepy *E. faecium*, z zahamowaną ekspresją *VanS_B*, podlegają niekiedy heterogennej indukcji oporności na teikoplaninę, najprawdopodobniej w wyniku przejęcia funkcji *VanS_B* przez natywną kinazę szczepu [40].

Zgrupowanie genów *vanB* często zlokalizowane jest na chromosomie bakteryjnym. Początkowo uważano, że geny te nie są przenoszone między szczepami enterokoków [15]. Obecnie wiadomo, że w odróżnieniu od typu VanA, zespoły genów *vanB* (i podobnych) przenoszone są w obrębie dużych (90 do 250 tysięcy par zasad) koniugacyjnych elementów genetycznych [22]. Skupienie genów *vanB1* może wchodzić w skład transpozonu Tn1549 (34 tys. pz), a przede wszystkim Tn1547 (64 tys. pz), będącego elementem większego elementu transpozycyjnego (90 tys. pz), który może być przenoszony między chromosomami w wyniku koniugacji [36]. Skupienie genów *vanB2* może ulegać prze-

noszeniu jako zawartość jednego z dwóch blisko spokrewnionych transpozonów, Tn5382 (27 tys. pz) albo Tn1549, stanowiących element plazmidów koniugacyjnych [25, 79]. Dowiedziono możliwości przenoszenia genów *vanB* w obrębie Tn1549 włączonego do plazmidu odpowiedzialnego za reakcję *E. faecium* na feromony płciowe (pAD-1) [35]. Wykryto także szczepy *E. faecium* należące do typu VanB, posiadające jednocześnie więcej niż jeden typ plazmidów zawierających geny oporności na wankomycynę *vanB2* [40]. Zidentyfikowano także szczepy VanB, u których transpozon Tn5382 wchodził w skład większego elementu chromosomalnego, zawierającego także geny kodujące białko PBP5, odpowiedzialne za oporność szczepu na ampicylinę [25].

2.3. Typ VanC (VanC1, VanC2 i VanC3)

Fenotyp VanC charakteryzuje się opornością na niskie stężenia wankomycyny (MIC 4–32 mg/L) oraz wrażliwością na teikoplaninę (MIC poniżej 1 mg/L) i jest właściwością niektórych szczepów *E. gallinarum* oraz *E. casseliflavus* [51, 55]. Typ oporności VanC jest kodowany chromosomalnie i nie ulega transferowi horyzontalnemu. W przeważającej większości wypadków VanC ma charakter oporności konstytutywnej, chociaż opisywano rzadkie przypadki indukcji tego typu oporności przez antybiotyki glikopeptydowe [30, 31, 36, 73]. Opisano trzy blisko spokrewnione typy genów kodujących ligazę D-alanylowo-D-serynową: *vanC1* u *Enterococcus gallinarum* oraz *vanC2* i *vanC3* u *E. casseliflavus* [22]. Dostępne są kompletne sekwencje genów oporności wchodzących w skład skupienia genów *vanC1*, *vanC2* i *vanC3* [3, 30, 31]. Podobieństwo sekwencji aminokwasów między białkami VanC2 i VanC3 wynosi 98%, a między VanC2 a VanC1 – 76%. Z drugiej strony, znacznie większe różnice obserwuje się między VanC1 a VanA (podobieństwo 37%) oraz VanB (podobieństwo 39%) [51]. Prócz szczepów zawierających jeden typ oporności na wankomycynę opisano występowanie szczepów *E. gallinarum* noszących jednocześnie geny *vanA* i *vanC1* [15]. Gen *vanC* wykrywano także u pojedynczych szczepów *E. faecalis* oraz *E. faecium* [62].

Typ oporności VanC do swojego funkcjonowania wymaga trzech białek funkcjonalnych: VanC, VanXY_C i VanT, oraz dwóch białek regulatorowych: VanR_C i VanS_C (rys. 2).

Funkcją VanC jest synteza dipeptydów D-alanylo-D-serynowych, które zostają włączone w skład prekursorów peptydoglikanu na późnym etapie ich syntezy [36]. Doświadczalna inaktywacja genu *vanC1* *E. gallinarum* (za pomocą insercji krótkiego fragmentu DNA) powoduje zahamowanie ekspresji genów *vanXY_C* oraz *vanT*, co prowadzi do utraty oporności

szczepu na wankomycynę. Prekursory peptydoglikanu szczepu, u którego zastosowano insercję fragmentu DNA kończyły się dipeptydem D-Ala-D-Ala [55]. Jako że u szczepów enterokoków posiadających typ oporności na wankomycynę VanC występuje także „zwyčajna” ligaza syntetyzująca dipeptydy D-Ala-D-Ala, obserwowane różnice w wartościach MIC wankomycyny tłumaczy się osiągniętym stosunkiem stężenia prawidłowych dipeptydów D-Ala-D-Ala do stężenia dipeptydów D-Ala-D-Ser. To znaczy, że niższe wartości MIC mogą być objaśnione przez obecność większych ilości D-ala-D-Ala, natomiast wyższe wartości MIC wynikają z większej proporcjonalnej zawartości dipeptydów D-alanylowo-D-serynowych [15].

Białko VanXY_C wykazuje podwójną aktywność dipeptydazy i karboksypeptydazy, a funkcją tego białka jest hydroliza dipeptydów D-Ala-D-Ala i usuwanie alaniny z C-końca oligopeptydu wchodzącego w skład prekursorów peptydoglikanu [5]. Podobieństwo VanXY_C i VanY obejmuje 158 aminokwasów identycznych w obu białkach. Zgodne sekwencje aminokwasów występują w regionach odpowiedzialnych za wiązanie cynku, stabilizację substratu oraz katalizację hydrolizy [30]. Regiony te występują zarówno w VanX (VanX_B) jak i w VanY (VanY_B). W porównaniu do VanX i VanY, VanXY_C wykazuje niższą aktywność wobec swego substratu, czyli dipeptydów D-Ala-D-Ala wchodzących w skład prekursorów peptydoglikanu.

Związane z błoną komórkową białko VanT jest racemazą przekształcającą syntetyzowaną przez natywne enzymy enterokoków L-serynę w D-enancjomer, który stanowi substrat dla enzymu VanC [4]. Zakotwiczone w błonie komórkowej białko VanT składa się z dwóch domen: (i) zewnętrznej, posiadającej aktywność racemazy serynowej, oraz (ii) transbłonowej, której obecność nie jest konieczna dla tworzenia D-enancjomerów seryny. Mimo to, szczepy sztucznie pozbawione domeny przezbłonowej VanT nie były w stanie osiągnąć wykładniczej fazy wzrostu w obecności niskich stężeń wankomycyny, co wskazuje na rolę rzeczony domeny w wychwytywaniu i transporcie L-seryny przez błonę komórkową [4].

Enterococcus casseliflavus ATCC 25788 (VanC2) wykazuje indukowalną oporność na wankomycynę, co jest zjawiskiem charakterystycznym raczej dla typów VanA i VanB [30]. Szczepy VanA i VanB wymagają okresu indukcji (30–60 minut od dodania wankomycyny) zanim dojdzie do ekspresji genów oporności i pojawienia się prekursorów peptydoglikanu kończących się D-mleczanem [68]. W porównaniu do typów VanA/VanB, *E. casseliflavus* ATCC 25788 wykazuje znacznie dłuższy okres (225 minut) potrzebny na indukcję oporności, wyrażające się syntezą dipeptydów D-Ala-D-Ser oraz powrotem hodowli szczepu do fazy eksponencjalnej wzrostu [30]. Wydłużony okres in-

dukcyj obserwowano także u innych szczepów enterokoków wykazujących typ oporności VanC [73]. Tak duża różnica w czasie potrzebnym na indukcję oporności może wynikać z różnych mechanizmów syntezy terminalnych podstawników prekursorów peptydoglikanu. Substratem dla VanH, czyli występującego w typie oporności VanA enzymu odpowiedzialnego za syntezę D-mleczanu, jest pirogronian, związek występujący powszechnie w komórkach enterokoków. Z drugiej strony, substratem dla występującej w VanC racemazy serynowej VanT jest L-seryna, związek niezbędny dla wielu procesów komórkowych, takich jak synteza białek oraz metabolizm związków monokarboksylowych. W komórce enterokoków, L-seryna jest zużywana bardzo szybko, a jej dostępność – w porównaniu z pirogronianem – jest znikoma [30].

Ekspresja genów oporności występujących w typie VanC regulowana jest przez (analogiczny jak w VanA/VanB) dwuskładnikowy układ regulatorowy. W jego skład wchodzi dwa białka: regulator odpowiedzi VanR_C oraz kinaza histydynowa VanS_C [31]. W odróżnieniu jednak od *vanA/vanB*, w obrębie *vanC* geny te leżą od strony końca 3' nici DNA (rys. 2) [36].

2.4. Typ VanD

Pierwszym szczepem, u którego opisano fenotyp VanD, był *E. faecium* BM4339, izolowany w New York Hospital w roku 1991. Szczep ten, wyodrębniony z moczu pacjentki cierpiącej na zakażenie układu moczowego, był oporny na wankomycynę (MIC 64 mg/L) oraz wrażliwy na teikoplaninę (MIC 4 mg/L) [67]. Szczep BM4339 wykazywał także oporność na penicylinę G, wysokie stężenia aminoglikozydów, tetracyklinę oraz makrolidy, linkozamidy i streptograminy B [67]. Do 1999 roku, BM4339 był jedynym opisanym szczepem o fenotypie oporności VanD, mimo iż trzy spokrewnione ze sobą szczepy A803, A804 i A902 noszące geny oporności typu *vanD* wyizolowano w szpitalu Beth Israel Medical Center w Bostonie już w 1993 roku [10, 61]. Szczepy enterokoków o typie oporności na glikopeptydy VanD izolowane są rzadko, i jak do tej pory opisano tylko kilka szczepów *E. faecium* i *E. faecalis* posiadających ten typ oporności [28]. Interesujące jest, że szczepy izolowane w różnych regionach świata (USA, Australia, Kanada, Brazylia) wykazują zróżnicowanie genetyczne w budowie genów wchodzących w skład zgrupowania genów *vanD* [10, 13, 61, 67].

Typ oporności VanD (podobnie jak VanA i VanB) opiera się na syntezie prekursorów peptydoglikanu kończących się dipeptydami D-Ala-D-Lac i charakteryzuje się średnim lub wysokim stopniem oporności na wankomycynę oraz wrażliwością lub średnim stopniem oporności na teikoplaninę (MIC wankomycyny 64–256 mg/L, MIC teikoplaniny 2–64 mg/L) [14, 15,

22, 28, 55, 62]. U *E. faecium* BM4339 obserwowano konstytutywną ekspresję fenotypu VanD, podczas gdy u szczepów A803, A804 i A902 oporność była indukowana niskimi stężeniami wankomycyny w środowisku [14, 61, 67]. Geny determinujące fenotyp VanD znajdują się na chromosomie i nic nie wskazuje na to, aby występowało zjawisko ich przenoszenia między szczepami enterokoków [22]. Prowadzone *in vitro* próby transferu genów oporności ze szczepów VanD do wrażliwych na glikopeptydy szczepów *E. faecium* i *E. faecium* nie doprowadziły do transferu genów oporności na wankomycynę, ale – jak się spodziewano – ruchome elementy genetyczne zawierające geny oporności na aminoglikozydy oraz erytromycynę uległy transferowi [61, 67]. Lokalizacja genów związanych z opornością VanD na chromosomie oraz niemożność (przynajmniej do tej pory) identyfikacji elementów, które mogłyby być odpowiedzialne za horyzontalne przenoszenie skupiska genów *vanD* może być wyjaśnieniem rzadkiego występowania typu VanD w populacji enterokoków [28].

Organizacja genów zgrupowanych w *vanD*, odpowiedzialnych za oporność na glikopeptydy, u poznanych dotychczas szczepów, została dokładnie poznana i dostępne są kompletne sekwencje zgrupowania genów oporności szczepów BM4339 (USA, 1991), A902 (USA, 1993), 10/96A (Brazylia, 1996) oraz BM4416 (Kanada, 2000) [10, 13, 27 61]. Operon *vanD* zawiera sześć genów: *vanR_D*, *vanS_D*, *vanY_D*, *vanH_D*, *vanD* oraz *vanX_D* (ryc. 2). Geny zgrupowania *vanD* wykazują homologię do odpowiednich genów występujących w typach VanA i VanB, przy czym w skupieniu *vanD* nie występują homologi genu *vanZ* występującego w typie VanA, ani *vanW* obecnego w typie VanB. Podobieństwo strukturalne zgrupowań *vanA*, *vanB* i *vanD* znajduje także wyraz w funkcji odpowiednich genów homologicznych.

Synteza D-alanylo-D-mleczanu wymaga obecności ligazy VanD (odpowiednik ligaz VanA i VanB) oraz dehydrogenazy VanH_D (odpowiednio VanH lub VanH_B) katalizującej przemianę pirogronianu w D-mleczan [28]. Odcięcie terminalnych D-alanin zapobiega wiązaniu glikopeptydów z docelowym dipeptydem D-Ala-D-Ala; za tę reakcję odpowiadają dwa enzymy: związana z błoną komórkową D,D-dipeptydaza VanX_D (VanX, VanX_B) oraz D,D-karboksypeptydaza VanY_D (VanY, VanY_B) [68]. Białko VanY_D należy do rodziny białek wiążących penicyliny (PBP), a jego aktywność hamowana jest przez obecność penicylin w środowisku [13]. Dla odmiany, VanY i VanY_B należą do klasy D,D-karboksypeptydaz zależnych od Zn²⁺, są one niewrażliwe na penicyliny oraz wykazują wyższą aktywność katalityczną w porównaniu z VanY_D [68].

Podobnie jak w przypadku VanA i VanB, ekspresja typu oporności VanD podlega regulacji dwuskładni-

kowego układu złożonego z białka związanego z błoną komórkową, posiadającego aktywność kinazy histydynowej w obecności glikopeptydów lub fosfatazy, gdy antybiotyki glikopeptydowe nie występują w środowisku (VanS_D) oraz cytoplazmatycznego aktywatora transkrypcyjnego (VanR_D) [14].

Struktura zgrupowania genów *vanD* oraz funkcjonalna aktywność białek kodowanych przez odpowiednie geny wchodzące w jego skład pozwalają mniemać, że ekspresja genów oporności typu VanD oraz regulacja tej ekspresji w odpowiedzi na obecność glikopeptydów w środowisku powinna być zbliżona do obserwowanej w typach VanA i VanB. Jednak typ VanD posiada kilka cech charakterystycznych, odróżniających go od VanA i VanB. Depardieu i wsp. [28] przeprowadzili serię eksperymentów w których zbadane mechanizmy ekspresji i regulacji genów wchodzących w skład zgrupowania genów *vanD*. Wśród najważniejszych wyników ich pracy można wymienić następujące:

- wszystkie opisane dotychczas szczepy VanD wykazywały zaburzoną syntezę prawidłowych dipeptydów D-Ala-D-Ala, w wyniku rozmaicie zlokalizowanych mutacji punktowych w obrębie genów *ddl*, co prowadziło do braku substratu niezbędnego do syntezy prawidłowych prekursorów peptydoglikanu;
- u wielu szczepów obserwowano zaburzenia lub całkowity brak aktywności białek VanX_D oraz VanY_D, odpowiedzialnych, odpowiednio, za usuwanie końcowej D-alaniny z prekursorów peptydoglikanu oraz hydrolizę dipeptydów D-Ala-D-Ala;
- szczepy produkujące prawie wyłącznie prekursor peptydoglikanu kończące się D-mleczanem oraz zawierające geny oporności na glikopeptydy powinny wymagać tych antybiotyków do wzrostu, gdyż do syntezy prekursorów peptydoglikanu zawierających terminalny D-mleczan niezbędna jest aktywacja układu regulatorowego VanS_D/VanR_D. Jednak u badanych szczepów *E. faecium* obserwowano mutacje punktowe prowadzące do utraty funkcji fosfatazy białka VanS_D co sprawia, że sensor VanS_D nabiera konstytutywnej aktywności kinazy, prowadząc do fosforylacji receptorowej domeny VanR_D, niezależnie od faktycznego występowania glikopeptydów w środowisku. Białko VanR_D, odpowiedzialne za aktywację promotora transkrypcji genów *vanH_DDX_DY_D*, składa się z dwóch domen: receptorowej (N-koniec peptydu), odbierającej sygnał od VanS_D, oraz efektorowej (C-koniec peptydu), blokującej swoisty region DNA, gdy domena receptorowa jest w stanie nieufosforylowanym. Fosforylacja N-końca VanR_D prowadzi do uwolnienia DNA i uruchomienia procesu transkrypcji *vanH_DDX_DY_D*.

Oprócz powyższego mechanizmu, w którym aktywność VanR_D zależy od sygnału przekazanego przez VanS_D, u szczepów *E. faecalis* BM4538 i BM4540 wykryto mutacje w obrębie samego genu VanR_D, prowadzące do stałej, konstytutywnej aktywacji domeny efektorowej;

- obserwowana u szczepów VanD zwiększona wrażliwość na teikoplaninę pozostaje niewyjaśniona w świetle obserwowanej konstytutywnej ekspresji genów oporności na antybiotyki glikopeptydowe.

W podsumowaniu można podkreślić, że opisane dotychczas szczepy posiadające typ oporności VanD należą do trzech gatunków: *E. faecium* (7 szczepów), *E. faecalis* (2 szczepy) i *E. gallinarum* (1 szczep). Wszystkie szczepy izolowane były od ludzi długotrwale przebywających w oddziałach szpitalnych, a oprócz oporności na glikopeptydy, wykazywały równocześnie oporność na wiele antybiotyków należących do innych grup. Wszystkie opisywane szczepy były odporne przynajmniej na β-laktamy oraz wysokie stężenia aminoglikozydów, niektóre dodatkowo wykazywały oporność na inne leki przeciwbakteryjne (tetracykliny, makrolidy, linkozamidy, streptograminy, chloramfenikol).

Interesujący jest fakt zwiększonej wrażliwości na teikoplaninę, notowany u opisywanych szczepów. Nie znaleziono niestety doniesień na temat aktywności oritawancyny wobec szczepów VanD – prace dotyczące aktywności antybiotyku zdolnego do tworzenia dimerów oraz zdolnego do kotwiczenia w błonie komórkowej enterokoków mogłyby dopomóc w wyjaśnieniu podwyższonej wrażliwości szczepów VanD na teikoplaninę.

2.5. Typ VanE

Oporność typu VanE została opisana u pojedynczych szczepów *E. faecalis*. Pierwszym opisanym szczepem VanE był *E. faecalis* BM4405, wykazujący oporność na niskie stężenia wankomycyny (MIC 16 mg/L), wrażliwy przy tym na teikoplaninę (MIC 0,5 mg/L) [65]. Oporność występująca u BM4405 jest indukowana przez obecność wankomycyny w środowisku, szczep produkuje prekursor peptydoglikanu kończący się dipeptydem D-Ala-D-Ser. U opisanego szczepu wykryto zgrupowanie genów o organizacji zbliżonej do *vanC*. Zgrupowanie to, nazwane później *vanE* jest zlokalizowane na chromosomie i nie ulega przeniesieniu horyzontalnemu [65].

Zgrupowanie *vanE* obejmuje pięć genów kodujących białka homologiczne do występujących w typie oporności VanC (rys. 2): ligazę D-alanylowo-D-serynową VanE, D,D-dipeptydazę/D,D-karboksypeptydazę VanXY_E, racemazę serynową VanT_E oraz dwuskład-

nikowy układ regulatorowy obejmujący białko sensoryczne VanS_E oraz regulator VanR_E [65]. Należy zaznaczyć, że białko VanS_E u BM4405 jest nieaktywne w wyniku mutacji polegającej na insercji prowadzącej do pojawienia się kodonu stop w 78 aminokwasie tego białka, a regulację indukcyjną przejął najprawdopodobniej natywny układ regulatorowy szczepu [69].

Możliwe jest, że typ oporności VanE został nabyty od szczepów posiadających typ VanC. Do wyjaśnienia pozostaje relatywnie niewielkie podobieństwo sekwencji aminokwasów między homologicznymi genami klastrow *vanC* i *vanE* [69].

W bezpośredniej bliskości operonu *vanE* innego szczepu posiadającego typ VanE oporności na wankomycynę (*E. faecalis* N00-410, izolowany w Kanadzie w 2000 roku) wykryto otwartą ramkę odczytu kodującą białko homologiczne do niektórych integraz, co sugeruje sposób nabycia skupienia genów *vanE* [11].

2.6. VanG jest kolejnym typem oporności, w którym dochodzi do syntezy prekursorów peptydoglikanu kończących się D-alanylo-D-mleczanem [69]. W 1997 roku w Brisbane, Australia, od hospitalizowanych pacjentów wyizolowano w krótkich odstępach czasu cztery szczepy *E. faecalis* o podobnej charakterystyce fenotypowej: oporności na niskie stężenia wankomycyny (MIC 12–16 mg/L) oraz wrażliwości na teikoplaninę (MIC 0,5 mg/L). Jeden z tych szczepów (WCH9) został poddany dokładnym badaniom genetycznym. Wykryto u niego nowego typu zespół genów oporności na glikopeptydy, oznaczony jako *vanG* [54]. Zgrupowanie genów *vanG* składa się z ośmiu genów, z których jedne wykazują homologię do występujących w typach VanC/E, inne natomiast do VanA/B, przy czym geny te nabyte zostały przynajmniej od trzech różnych typów operonów *van* [69] (rys. 2). Geny układu regulatorowego (*vanS_G*, *vanR_G*) kodują białka, które pod względem podobieństwa sekwencji aminokwasów są najbardziej zbliżone do homologicznych białek występujących w typie VanD. Geny te w stosunku do genów odpowiedzialnych za oporność, położone są w kierunku końca 5' nici DNA, co odpowiada organizacji zgrupowań genów oporności obserwowanej w typach VanA, VanB i VanD, a odróżnia zgrupowania *vanG* od *vanC* i *vanE* [54, 69]. Skrajnie w kierunku końca 5' zgrupowania *vanG* leży jeszcze jedna otwarta ramka odczytu, *vanU*, nie znajdująca odpowiednika w żadnym innym operonie kodującym oporność enterokoków na glikopeptydy. Białko VanU wykazuje homologię do niektórych bakteryjnych aktywatorów transkrypcji [27]. Trójgenowy komponent regulacyjny *vanUS_GR_G* ulega wspólnej konstytutywnej transkrypcji od promotora *P_{UG}*, natomiast pozostałe geny ulegają transkrypcji indukowanej, znajdującej się pod kontrolą promotora *P_{YG}* leżącego między genami *vanS_G* i *vanY_G* (podobnie jak

w typie VanB) [69]. Pozostała część operonu zawiera mozaikę genów, które prawdopodobnie pochodzą od typów VanB, VanC i VanE. Licząc od końca 5' operonu geny te kodują kolejno:

- VanY_G (D,D-dipeptydaza D-Ala-D-Ala),
- VanW_G (homolog VanW występującego wyłącznie w typie VanB),
- VanG (ligaza D-alanylowo-D-serynowa),
- VanXY_G (białko homologiczne do występujących w typach VanC i VanE),
- VanT_G (racemaza L:D-serynowa, homolog VanT i VanT_E) [54, 69].

W odróżnieniu od typu vanD, szczepy posiadające typ VanG posiadają aktywną chromosomalną ligazę D-Ala-D-Ala. U szczepów indukowanych wankomycyną prekursorzy peptydoglikanu mają strukturę penta-peptydów kończących się D-alaniną (30 do 50% wszystkich prekursorów) lub D-seryną (pozostałe prekursorzy). Wykrywano tylko śladowe ilości prekursorów kończących się tetrapeptydami [69]. Co prawda, białko VanY_G nie wykazuje aktywności w wyniku mutacji punktowej w obrębie genu *vanY_G*, ale u szczepu WCH9 wykrywano aktywność związanej z błoną komórkową D,D-karboksypeptydazy (prawdopodobnie *vanXY_G*). Aktywność racemazy serynowej VanT_G jest niewielka w porównaniu do racemaz występujących u VanC i VanE.

Zdolność *E. faecium* do uzyskania tak skomplikowanego układu genów składających się na funkcjonalny operon jest zadziwiająca, ale oporność na wankomycynę związana z typem VanG pozostawia bez odpowiedzi kluczowe pytanie: w jaki sposób szczepy VanG uzyskują stopień oporności na wankomycynę porównywalny z VanC i VanE nie posiadając wydajnej racemazy serynowej, a mając znaczny procent prekursorów peptydoglikanu potencjalnie wrażliwych na wankomycynę? Odpowiedź na to pytanie może dać dopiero analiza struktury dojrzałego peptydoglikanu szczepów VanG, jak również odpowiedź na pytanie, czy istnieją białka odpowiedzialne za transglukozylację i transpeptydację prekursorów peptydoglikanu swoiste dla szczepów *E. faecalis* VanG.

Próby transferu operonu VanG do wrażliwych szczepów *E. faecalis* zaowocowały przeniesieniem dużego (240 kbp) elementu genetycznego, zawierającego, oprócz zgrupowania *vanG*, także gen oporności na erytromycynę *ermB* [22].

3. Enterokoki zależne od wankomycyny

W 1993 roku zaprezentowano pierwszą pracę opisującą szczepy kliniczne enterokoków niezdolne do wzrostu w środowisku nie zawierającym wankomycyny [80]. Od tego czasu pojawiają się sporadyczne do-

niesienia opisujące izolowane od pacjentów poddanych przewlekłej kuracji antybiotykami glikopeptydowymi szczepy *E. faecium* lub *E. faecalis*, zdolne do wzrostu tylko w postaci pierwotnej hodowli i tracące zdolność wzrostu po przesianiu na kolejne podłoża [51]. Szczepy te rosną natomiast na podłożach zawierających wankomycynę bądź teikoplaninę, a także na podłożach używanych do oznaczania oporności na antybiotyki metodą dyfuzyjno-krażkową – w tym wypadku wokół krażków zawierających wankomycynę lub teikoplaninę [51]. Szczepy te otrzymały nazwę VDE (vancomycin-dependent enterococci, czyli enterokokoki zależne od wankomycyny). Wankomycynozależne szczepy *E. faecium* i *E. faecalis* izolowano z próbek krwi, moczu oraz kału pobranych od pacjentów poddanych długotrwałej terapii wankomycyną lub teikoplaniną, jak również antybiotykami o szerokim spektrum działania [36]. Od pacjentów tych najczęściej izolowano uprzednio szczepy enterokoków odporne na wysokie stężenia glikopeptydów, wykazujące ten sam wzór PFGE co szczepy VDE, co sugeruje, że szczepy zależne od wankomycyny ewoluowały z występujących u tych samych pacjentów szczepów opornych na wankomycynę, lecz nie wykazujących zależności od glikopeptydów. W doświadczeniach laboratoryjnych, metodą selekcji *in vitro* uzyskano zależne od wankomycyny mutanty szczepów VRE [51]. Wszystkie opisane do tej pory szczepy VDE łączą pewne cechy charakterystyczne: są to szczepy posiadające geny oporności na glikopeptydy typu VanA lub VanB, przy czym naturalna ligaza D-alanylo-D-alaninowa tych szczepów jest nieaktywna w wyniku mutacji prowadzących do niemożności wiązania substratu, co jest przyczyną niezdolności szczepów VDE do wzrostu w środowisku nie zawierającym antybiotyków glikopeptydowych [15].

Znaczenie kliniczne szczepów enterokoków zależnych od wankomycyny jest przedmiotem debaty. Część specjalistów wyraża przekonanie, że szczepy VDE stanowią niedoceniane niebezpieczeństwo ze względu na potencjalną możliwość powrotu do formy niezależnej od wankomycyny – w tym wypadku będą to szczepy odporne na wysokie stężenia glikopeptydów. Inną budzącą niepokój cechą szczepów VDE jest ogromna trudność (a w wielu wypadkach niemożność) izolacji tych szczepów przy użyciu standardowych metod bakteriologicznych, co wymaga wprowadzenia zmian w standardowych procedurach diagnostycznych [33]. Według Wilksa i wsp. [80] laboratorium jest w stanie wykryć szczep VDE tylko w wypadku, gdy specjalnie go szuka. Z drugiej strony, wielu specjalistów określa szczepy VDE jako „defektywne szczepy VRE”, a samo zjawisko zależności od glikopeptydów jako ślepa uliczka ewolucji, gdyż jedyną rzeczą, jaką należy zrobić w celu eliminacji szczepu VDE jest wycofanie glikopeptydu z terapii konkretnego pacjenta [15]. Według

Farrag i wsp. [33], problemy związane z trudnością w izolacji szczepów VRE można rozwiązać włączając podłoże zawierające wankomycynę do toku badania bakteriologicznego materiałów pobranych od pacjentów, którzy nie odpowiadają na terapię wankomycyną lub teikoplaniną, mieli powtarzające się ujemne hodowle lub o których wiadomo, że są nosicielami VRE.

4. Pochodzenie genów oporności na antybiotyki glikopeptydowe u *Enterococcus* spp.

Jak przedstawiono wcześniej, operony oporności enterokoków na glikopeptydy kodują ligazy D-alanylo-D-mleczanowe (VanA, VanB i VanD) lub D-alanylo-D-serynowe (VanC, VanE, VanG). Geny tych białek mogą ulegać transferowi horyzontalnemu (VanA, VanB, VanG) lub stanowić wrodzoną cechę szczepów (VanD, VanC, VanE). Mogą także ulegać indukowanej ekspresji pod wpływem obecności glikopeptydów w środowisku (VanA, VanB, VanD, VanE, VanG) lub być syntetyzowane konstytutywnie (VanC, VanD). Mamy zatem do czynienia z trzema układami wchodzącymi w skład prawidłowo wyrażonej, przenoszonej między różnymi szczepami, oporności na antybiotyki glikopeptydowe: (i) odpowiedzialnym za indukcję, (ii) odpowiedzialnym za oporność i (iii) odpowiedzialnym za transfer horyzontalny. Wymienione trzy układy znajdują pełne odzwierciedlenie tylko w genach występujących u VanA i VanB (pozostałe zgrupowania genów *van* cierpią na różnego typu niedostatki). Posługując się przykładem tych zgrupowań, są to: (i) układ VanR/VanS (VanR_B/VanS_B), (ii) układ VanHAX/VanY (VanH_BBX_B/VanY_B) i (iii) różnego typu układy odpowiedzialne za transfer transpozonów zawierających geny (i) i (iii) między szczepami. W chwili obecnej, wiadomo, że geny kodujące wymienione trzy układy pochodzą prawdopodobnie z trzech różnych niezidentyfikowanych źródeł.

Mimo prowadzonych w ostatnich latach intensywnych badań nad pochodzeniem genów oporności na antybiotyki glikopeptydowe u enterokoków, źródło tych genów pozostaje nieznane [51]. Przeciwno najprostszej hipotezie, mówiącej, że geny te wyewoluowały u samych enterokoków, świadczy brak homologii między ligazami Van a natywnymi ligazami Ddl enterokoków oraz różnice w zawartości procentowej G+C między DNA genów *vanA/vanB* (odpowiednio 43% i 48%) i genomowym DNA enterokoków (39%) [22, 36]. Obserwuje się także duże różnice w zawartości G+C w obrębie samych zgrupowań genów *vanA/vanB* enterokoków opornych na glikopeptydy (od 29 do 45% G+C), co może świadczyć o niezależnym pochodzeniu różnych elementów wchodzących w skład skupiska genów oporności [22].

Najwcześniejsze hipotezy dotyczące źródła genów *van* obecnych u szczepów VRE mówiły, że pochodzą one od bakterii Gram-dodatnich cechujących się wrodzoną opornością na glikopeptydy, należących do rodzajów *Leuconostoc*, *Pediococcus* oraz *Lactobacillus* [22]. Obserwowana u bakterii kwasu mlekowego oporność na glikopeptydy wyraża się jako konstytutywna produkcja prekursorów peptydoglikanu kończących się D-alanylo-D-mleczanem [63]. Geny oporności na glikopeptydy są u tych gatunków kodowane chromosomalnie i w doświadczeniach *in vitro* nie udało się doprowadzić do przeniesienia ich do enterokoków [37]. Porównanie sekwencji aminokwasów białek odpowiedzialnych za oporność na glikopeptydy występujących u bakterii rodzajów *Leuconostoc* i *Lactobacillus* z białkami występującymi u typów VanA i VanB VRE wykazało brak pełnej homologii oraz podobieństwo sekwencji rzędu 26–35% [51, 63].

Kolejna hipoteza mówi, że enterokoki mogły nabyć geny oporności na glikopeptydy od bakterii produkujących te antybiotyki. Znanych jest wiele gatunków bakterii produkujących glikopeptydy i zawierających w swym genomie geny homologiczne do układu *vanHAX* szczepów VRE VanA. Należą tu gatunki *Amycolatopsis orientalis* (producent wankomycyny), *Actinomyces teichomyceticus* (producent teikoplaniny), *Amycolatopsis coroladensis*, *Streptomyces coelicolor* oraz *S. toyocanensis* [36, 53, 75]. Podobieństwo sekwencji aminokwasów między białkami produkowanymi przez gatunki wytwarzające glikopeptydy a homologicznymi białkami VRE typu VanA wynosi 54–61% dla VanH, 59–63% dla VanA oraz 61–64% dla VanX. Dodatkowo, orientacja genów układu *vanHAX* u producentów glikopeptydów i szczepów VanA jest ta sama [51]. Przeciwno hipotezie mówiącej, że bakterie produkujące glikopeptydy są bezpośrednim źródłem występujących u enterokoków genów oporności *van* świadczy brak homologów układu regulatorowego *vanS/vanR* u *Amycolatopsis orientalis* i *Actinomyces teichomyceticus* (oporność wrodzona) oraz odmienna ich organizacja u *Streptomyces toyocanensis* [70, 75]. Za innym pochodzeniem genów *van* enterokoków przemawiają także różnice w zawartości procentowej guaniny i cytozyny w DNA homologicznych genów układów *van* obu grup bakterii. Zawartość G+C w układzie *vanHAX* VRE wynosi 43–48%, a u bakterii produkujących glikopeptydy 63%–65% [51]. Rice i wsp. [70], wyrażają przypuszczenie, że gatunki mogące być źródłem genów *van* mogą pochodzić z naturalnych nisz ekologicznych zasiedlanych przez bakterie produkujące glikopeptydy, i w związku z tym byłyby wyeksponowane na długotrwałe (lecz nie ciągle) działanie glikopeptydów, co mogłoby doprowadzić do nabycia genów oporności, a zarazem wykształcenia skutecznych mechanizmów indukcji/regulacji oporności

na te antybiotyki. Jednak analiza znanych naturalnych miejsc występowania oraz odnalezienie nowych w celu identyfikacji potencjalnych źródeł genów oporności VRE byłoby zadaniem długotrwałym i kosztownym, przy czym nie rokującym dużych szans na sukces [70]. Lu oraz współautorzy [48] zidentyfikowali jedno z takich źródeł: antybiotyk glikopeptydowy. Izolując DNA z wodnej zawiesiny awoparcyny, wykryli tam zarówno sekwencje 16S rRNA charakterystyczne dla *Amycolatopsis coloradensis* (mikroorganizm produkujący awoparcynę), jak i geny homologiczne do *vanA*, *vanH* i *vanX*, o strukturze zgrupowania charakterystycznej dla *A. coloradensis*.

Interesującym gatunkiem bakterii odpornej na wankomycynę, u której występuje układ homologiczny do *vanHAX/vanYZ* jest *Paenibacillus popillae*, którego spory używane są w Stanach Zjednoczonych jako biopestycyd od lat 30-tych XX wieku [22]. Najwcześniejsze odporne na wankomycynę szczepy *P. popillae* pochodzą z 1945 roku [72]. Patel [63] prowadził badania szczepu wzorcowego *P. popillae* (ATCC 14706, MIC wankomycyny 800 mg/L). Bakteria ta produkuje prekursor peptydoglikanu kończące się dipeptydem D-Ala-D-Lac, a organizacja zgrupowania genów oporności na glikopeptydy (nazwanego *vanF*) najbardziej przypomina *vanB*. Podobieństwo sekwencji aminokwasów między homologicznymi białkami VanA i VanF wynosi 74% (VanH/VanHF), 77% (VanA/VanF), 79% (VanX/VanXF), 61% (VanY/VanYF) oraz 21% (VanZ/VanZF), co oznacza, że dla kompleksu VanYHAX jest większe niż podobieństwo między odpowiednimi białkami typów VanA i VanB. Analiza zawartości G+C wykazała bardzo duże podobieństwo między kompleksem genów *vanY_FH_FFX_F* a kompleksami *vanYHAX* i *vanY_BH_BBX_B* (różnice nie przekraczają 2% dla *vanA* i 3% dla *vanB*). Jednak mimo powtarzanych prób nie doprowadzono do przeniesienia *in vitro* genów oporności z *P. popillae* ATCC 14706 do szczepów enterokoków wrażliwych na wankomycynę. Opisany jest także pojedynczy szczep *Bacillus circulans* posiadający zgrupowanie genów o wysokim stopniu podobieństwa do *vanA* (podobieństwo sekwencji nukleotydów między homologicznymi genami wynosi 87–95%). Geny oporności na glikopeptydy *B. circulans* kodowane są chromosomalnie, nie wykryto u tego szczepu żadnych elementów genetycznych, które mogłyby być związane z transferem horyzontalnym zgrupowania genów oporności [51]. Mimo iż odporne na wankomycynę szczepy *P. popillae* oraz *B. circulans* nie są najprawdopodobniej bezpośrednim źródłem genów oporności *vanA* i *vanB* enterokoków, wysunięto hipotezę, że mógł nastąpić transfer genów do hipotetycznej bakterii pośredniej, spokrewnionej z rodzajem *Enterococcus* w większym stopniu i posiadającej możliwość włączenia genów oporności do

ruchomych elementów genetycznych, które następnie mogły zostać zaakceptowane przez szczepy enterokoków [22, 51, 63].

Komentarzem do powyższych rozważań mogą być wyniki analizy kompletnej sekwencji genomowego DNA *E. faecalis* V853 noszącego typ oporności na glikopeptydy VanB (patrz rys. 4). Ponad 25% genomu szczepu V853 stanowią ruchome elementy genetyczne lub geny nabyte od innych gatunków bakterii, co pod tym względem czyni z *E. faecalis* V853 rekordzistę wśród bakterii o poznanym genomie [66]. Opisane w pracy Paulsena i wsp. [66] występujące u szczepu V853 ruchome elementy genetyczne obejmują siedem zintegrowanych fagów, 38 elementów insercyjnych, dużą liczbę transpozonów i zintegrowanych genów przenoszonych plazmidowo oraz jedną wyspę patogenności. Wiele z tych elementów genetycznych wykazuje przy tym strukturę mozaikową zawierając elementy różnego pochodzenia włączone do pojedynczej struktury występującej w chromosomie. Nie należy się spodziewać, aby *E. faecalis* V853 był pod względem organizacji genomu wyjątkiem wśród szczepów enterokoków (w tym wielolekoopornych szczepów klinicznych). Tak znacząca zdolność do nabywania nowych genów, ich reasortacji oraz włączania do chromosomu sugeruje, że proces nabywania genów oporności na antybiotyki glikopeptydowe przez enterokoki może być bardzo złożony.

5. Mechanizm transferu genów

Bakterie Gram-dodatnie mogą przekazywać międzykomórkowo geny korzystając z mechanizmów transdukcji i koniugacji. Transdukcja jest jednak mechanizmem o ograniczonym znaczeniu ze względu na zakres wymiany dotyczący tylko określonych grup fagowych bakterii. Mechanizm koniugacji umożliwia wymianę genów między bakteriami należącymi do różnych gatunków, a nawet rodzajów. W odróżnieniu od bakterii Gram-ujemnych, koniugacja u bakterii Gram-dodatnich nie jest związana z wytwarzaniem pili płciowych. Przekazywanie genów między komórkami bakterii Gram-dodatnich, oparte na mechanizmie koniugacyjnym, jest warunkowane przez czynniki powodujące agregację komórek, przy wysokiej gęstości mieszaniny dawcy i biorcy [57].

Podstawowe mechanizmy przenoszenia genów oporności typu *vanA* i *vanB* zostały ostatnio zebrane i przedstawione przez Courvalin [22]: Transpozon Tn1546, klasyczny element mobilny, w skład którego wchodzi zgrupowanie genów oporności *vanA*, zawiera dwie ramki odczytu: ORF1 i ORF2, odpowiedzialne za transpozycję replikatywną tego elementu, przebiegającą zgodnie z proponowanym modelem: replikon-

dawca zawiera kopię elementu transpozycyjnego. Replikacja selektywna elementu transpozycyjnego połączona z fuzją replikonów dawcy i biorcy prowadzi do powstania bireplikonu zawierającego dwie kopie elementu transpozycyjnego, jednakowo zorientowane. Następnie dochodzi do rekombinacji między dwiema kopiami elementu; w momencie, gdy transpozycja dobiegnie końca, każdy replikon zawiera jedną kopię elementu transpozycyjnego i może służyć jako jego dawca. Jako, że przeniesienie elementów typu *Tn1546* wykorzystujące mechanizm transpozycji replikatywnej jest związane z ich duplikacją, ten typ migracji transpozonu skutkuje skokowym zwiększeniem liczby genów kodujących oporność na glikopeptydy.

Transpozony *Tn1546* są najczęściej zlokalizowane na samoprzenoszących się plazmidach, w szczególnych przypadkach mogą też występować w obrębie chromosomu, jako składnik większego elementu koniugacyjnego [77].

Transpozon *Tn1547*, zawierający zgrupowanie genów *vanB*, jest ograniczony sekwencjami insercyjnymi (najczęściej *IS16* i *IS256*) i wchodzi w skład dużego elementu koniugacyjnego zwanego *Tn5382*. *Tn5382* może ulegać cyrkularyzacji, tworząc połączenia między wolnymi końcami nici DNA, podobnie jak ma to miejsce w innych transpozonach koniugacyjnych. U bakterii szczepu *E. faecium* C68 (i kilku innych), *Tn5382* występuje w postaci zintegrowanej z chromosomem, zlokalizowany jest w bezpośrednim sąsiedztwie genu *pbp5*, odpowiedzialnego za oporność wysokiego stopnia na ampicylinę. Transfer genów oporności na wankomycynę ze szczepu C68 do szczepu-biorcy jest praktycznie zawsze połączony z transferem genów oporności na ampicylinę w obrębie większego niekoniugacyjnego elementu transpozycyjnego, o wielkości co najmniej 120 kpz. Jest to przykład mechanizmu przenoszenia elementów genetycznych opartego na zasadzie „transpozon w transpozonie” [71].

Transpozon *Tn1547* zlokalizowany jest w chromosomie bakterii i w związku z tym jest w sposób naturalny dziedziczony przez komórki potomne. Oprócz tego, transpozon ten przenoszony może być między- lub wewnątrzkomórkowo za pośrednictwem, odpowiednio, jednego z dwóch mechanizmów [22]:

- (i) przenoszenie międzykomórkowe odbywa się poprzez transpozycję *Tn1547* do samoprzenoszącego się plazmidu, który może następnie zostać przekazany komórce biorcy za pośrednictwem koniugacji. Utworzenie plazmidu zawierającego transpozon opiera się na zasadzie transpozycji replikatywnej, w związku z czym kopia *Tn1547* pozostaje w chromosomie;
- (ii) przenoszenie wewnątrzkomórkowe polega na wycięciu, cyrkularyzacji i transferze transpozono-

nu w obrębie jednej komórki. Nie dochodzi wtedy do replikacji elementu transpozycyjnego.

U enterokoków za indukcję koniugacyjnego przenoszenia plazmidów (*pAD1*, *pPD1*, *pBRG1*, *pCF10*, *pAM373*) odpowiedzialne są feromony płciowe, oznaczane analogicznie do symbolu plazmidu, dla którego są swoiste (odpowiednio *cAD1*, *cPD1*, *cBRG1* itd.). Wszystkie opisane do tej pory plazmidy enterokoków, zawierają gen substancji agregującej, odgrywający rolę czynnika sprzyjającego procesowi koniugacji – wytwarzając substancję agregującą, enterokoki doprowadzają do wytworzenia agregacji, czyli specyficznego środowiska, w którym koniugacyjne przekazywanie plazmidów jest znacznie ułatwione [49]. Należy jednak zaznaczyć, że substancja agregująca jest czynnikiem ważnym przy koniugacji zachodzącej w środowisku płynnym i nie odgrywa znaczącej roli w koniugacji odbywającej się między komórkami przylegającymi do powierzchni. Kontakt międzykomórkowy w takim przypadku może być wspomagany za pomocą szeregu innych mechanizmów (białka powierzchniowe *EfaA* i *Esp* [43], relaksazy kodowane w obrębie *pAD1* [20]).

Mechanizm koniugacyjnego przenoszenia plazmidów u enterokoków można przedstawić na przykładzie plazmidu *pCF10* [38, 46]. Wydzielany przez biorcę feromon *cCF10*, czyli krótki (7–8 aminokwasów) hydrofobowy łańcuch peptydowy wydzielany przez komórkę potencjalnego biorcy, wchodzi w interakcję z kodowanym plazmidowo białkiem *PrgZ* lub kodowanym chromosomalnie kompleksem błonowym *Opp* obecnym w komórce dawcy. Feromon jest następnie transportowany do wnętrza komórki dawcy przez kodowany chromosomalnie system permeazy i oddziałuje na wewnątrzkomórkowe cząsteczki efektorów, prowadząc do uwolnienia inhibitora feromonu *cCF10*, zwanego *iCF10*, oraz aktywacji genu substancji agregującej, czego następstwem jest koniugacyjne przeniesienie *pCF10*. Białka *iCF10*, odpowiedzialne za inhibicję produkcji feromonów płciowych syntetyzowane są także, gdy w środowisku nie ma komórek potencjalnych dawców plazmidów koniugacyjnych – związki te zapobiegają wtedy autoindukcji komórek biorców [2].

Feromony płciowe wydają się zatem odgrywać kluczową rolę w ewolucji pewnych plazmidów enterokoków, wiadomo też, że podobne białka, wytwarzane przez *S. aureus* i inne bakterie, są odpowiedzialne za nabywanie tego typu elementów. Oprócz tego, że u *S. aureus* występuje receptor dla substancji agregującej produkowanej przez *E. faecalis*, feromon *cAM373* produkowany przez gronkowca złocistego zwiększa efektywność nabywania DNA enterokoków [20]. Nie udowodniono replikacji żadnego z poznanych do tej pory plazmidów zależnych od feromonów *E. faecalis* w komórkach *S. aureus*, ale duża grupa plazmidów czeka na dokładne badania w tym zakresie. Udowodniono

natomiast, że może zachodzić transfer pAD1 i pAM373 z *E. faecalis* do *S. aureus*, przy czym teoretycznie może dochodzić do kointegracji tych elementów genetycznych w obrębie plazmidów lub transpozonów *S. aureus*, a co za tym idzie ich późniejszej replikacji. Wiadomo na przykład, że plazmid pAD1 wspomaga międzygatunkowy transfer zlokalizowanych w chromosomie transpozonów koniugacyjnych (np. Tn916) w doświadczeniach *in vitro*, zatem prawdopodobne jest także, że mechanizm ten może występować w warunkach naturalnych [19]. Warto zauważyć, że zgrupowanie genów *vanA* może występować u enterokoków także w obrębie Tn916 [35], czyli elementu, który zlokalizowano w obrębie pAM373 *S. aureus* [19]. Przeniesienie elementów niekoniugacyjnych *E. faecalis* (np. pAMá1) do *S. aureus* jest zjawiskiem często spotykanym; zwłaszcza, że znane są elementy o bardzo wysokim stopniu homologii występujące u gronkowca złocistego (np. pUB110) [20].

Kolejnym czynnikiem, który zdaje się odgrywać istotną rolę w międzygatunkowym przenoszeniu ruchomych elementów genetycznych enterokoków są sekwencje insercyjne. Sekwencje insercyjne mogą służyć jako miejsca rekombinacji homologicznych, przy czym wszystko wskazuje na to, że między enterokokami i gronkowcami istnieje sprawnie działający układ wymiany genów opierający się na wykorzystaniu tych elementów genetycznych. W doświadczeniach *in vitro* stwierdzono przeniesienie transpozonu Tn5385 zawierającego geny oporności na tetracykliny, streptomycyny i β -laktamy oraz sekwencje insercyjne IS1216, IS256 i IS257 umożliwiające rekombinację, mobilizację i przeniesienie całości lub części Tn5383 do paciorkowców lub gronkowców [71].

Eksperymenty *in vitro* polegające na próbach koniugacyjnego przekazywania genów oporności na wankomycynę z *E. faecalis* do *S. aureus* dowodzą, że jest to możliwe, ale oporność ta nie ulega stabilizacji u biorcy i łatwo ulega utracie. Wiele genów (a nawet wszystkie) warunkujących oporność na glikopeptydy u enterokoków nie ulega ekspresji u zdecydowanej większości komórek *S. aureus* [57].

Teoretyczne przewidywania i doświadczenia laboratoryjne dotyczące transferu genów oporności z rodzaju *Enterococcus* do rodzaju *Staphylococcus* sprawdziły się niestety w praktyce. Ostatnio opisane zostały trzy szczepy *S. aureus* odporne zarówno na metycylinę, jak i na wankomycynę izolowane z materiałów klinicznych pacjentów szpitalnych [16, 39, 56]. U dwóch spośród tych szczepów wykryto kodowany plazmidowo element Tn1546 [18]. W pierwszym przypadku był to duży element transpozycyjny (ok. 120 tys. pz) pochodzący od enterokoków. Drugi transkoniugant wyhodowany był z materiału pobranego od pacjenta wraz ze szczepem *E. faecalis* (dawca) oraz wrażliwym na wankomycynę szczepem *S. aureus* (biorca) [77].

Kolejnym zagadnieniem związanym z przenoszeniem genów oporności na wankomycynę jest możliwość przeniesienia tych elementów genetycznych ze szczepów enterokoków pochodzących od zwierząt hodowlanych, z żywności lub ze środowiska do szczepów stanowiących składnik flory fizjologicznej człowieka. Analiza sekwencji rejonu *vanX_B* transpozonu Tn5382 ujawniła, że zgrupowania genów *vanB* są integralną częścią elementów typu Tn5382 występujących u *Streptococcus gallolyticus* i *S. lutetienensis*. Szczepy *S. gallolyticus* były izolowane z rozmaitych materiałów, w tym kału różnych zwierząt hodowlanych, mleka krów chorych na zapalenie wymienia, materiałów klinicznych pobieranych od ludzi oraz ze zwacza owiec [25]. *S. lutetienensis* (wcześniej klasyfikowany jako *Streptococcus infantarius* subsp. *coli*) izolowany był z różnych materiałów pobieranych od ludzi, w tym z kału. Zatem, gatunki te zdolne są do przeżycia w przewodzie pokarmowym człowieka, gdzie mają możliwość wymiany materiału genetycznego z innymi komensalami wchodzącymi w skład flory bakteryjnej [25]. Zostało to potwierdzone ostatnio przez Lester [47], który przeprowadził badania na grupie ochotników i udowodnił, że przejściowa kolonizacja przewodu pokarmowego szczepami enterokoków pochodzenia zwierzęcego posiadającymi operon oporności *vanA* wiąże się z ryzykiem rozprzestrzenienia ruchomych elementów genetycznych zawierających geny oporności na antybiotyki glikopeptydowe do enterokoków wchodzących w skład normalnej flory przewodu pokarmowego.

6. Rozprzestrzenianie szczepów VRE w oddziałach szpitalnych

W chwili obecnej, w wyniku wieloletnich badań i obserwacji, epidemiologia zakażeń szpitalnych wywoływanych przez enterokoki odporne na wankomycynę jest bardzo dokładnie zanalizowana i opisana. Główne czynniki wpływające na mechanizm zakażeń szpitalnych wywołanych przez szczepy VRE obejmują [9]:

- czynniki związane z ryzykiem kolonizacji pacjentów szczepami VRE (presją kolonizacyjną)
- udział personelu medycznego w rozprzestrzenieniu szczepów VRE
- kontaminację środowiska szpitalnego
- presję antybiotykową.

Ryzyko nabycia szczepów szpitalnych enterokoków opornych na wankomycynę jest związane przede wszystkim z przebywaniem w bliskości innych pacjentów skolonizowanych VRE (szczególnie pacjentów z biegunką oraz pacjentów, u których występuje zwiększony udział VRE we florze przewodu pokarmowego – np. jako efekt długotrwałej antybiotykoterapii) oraz z długością hospitalizacji [64].

U pacjentów szpitalnych, nasilona kolonizacja opornymi na wankomycynę szczepami enterokoków przebiega najczęściej bezobjawowo, a udokumentowane przypadki zakażeń mogą zdarzać się bardzo rzadko. Jest to zjawisko niepokojące, jako że większość pacjentów pozostaje skolonizowanych VRE długookresowo, a bezobjawowi nosiciele stanowią stałe źródło szczepów VRE dla innych pacjentów. Z drugiej strony, obserwuje się także zjawisko spontanicznej dekolonizacji VRE – w badaniach przeprowadzonych w klinice Mayo stwierdzono, że dotyczy ona 34% badanych pacjentów [64]. Stopień kolonizacji, traktowany jako wyrażona w procentach liczba pacjentów skolonizowanych szczepami VRE w danym dniu w szpitalu/oddziale szpitalnym jest czynnikiem bezpośrednio (i silnie) skorelowanym z ryzykiem nabycia VRE przez pacjentów dotychczas nieskolonizowanych. Analiza czynników ryzyka nabycia szczepów VRE w oddziałach intensywnej terapii, gdzie występowanie szczepów VRE było już na etapie endemicznym umieszcza stopień kolonizacji pośród najważniejszych czynników związanych z prawdopodobieństwem nabycia szpitalnego szczepu VRE przez pacjenta. Inne czynniki ryzyka, takie jak dożylna podawanie związków odżywczych lub długotrwała antybiotykoterapia z zastosowaniem cefalosporyn trzeciej generacji wyprzedzały stopień kolonizacji na liście najważniejszych czynników ryzyka tylko wówczas, gdy stopień kolonizacji VRE w danym oddziale szpitalnym był niższy niż 50%. W chwili, gdy wartość stopnia kolonizacji przekraczała 50%, inne czynniki ryzyka traciły gwałtownie na znaczeniu. Stopień kolonizacji jako wartość pozwalająca ocenić ryzyko nabycia szczepów odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne potwierdziła swoją przydatność także w przypadku zakażeń MRSA oraz *Enterobacter* spp. ESβL+. W niektórych szpitalach wykazano znaczący związek między stopniem kolonizacji a przyjmowaniem na oddział oraz transferem (zarówno wewnątrzszpitalnym, jak i międzyszpitalnym) pacjentów skolonizowanych VRE [29]. Kolonizacja szczepami VRE może przybierać rozmiary uniemożliwiające ich wykrycie standardowymi metodami przesiewowymi, przy najczęściej jest to związane ze zmniejszonym ryzykiem rozprzestrzeniania szczepów. Jednak gdy pacjent wymaga terapii antybiotykowej, występuje u niego zaostrzenie choroby lub biegunka, udział enterokoków opornych na wankomycynę w składzie flory jelit może się zwiększać, w wyniku czego zwiększa się także ryzyko rozprzestrzenienia szczepów VRE [29].

Układ pokarmowy nie jest jedyną niszą w obrębie organizmu człowieka zajmowana przez enterokoki oporne na wankomycynę. Szczepy VRE izolowano ze skóry pachwin oraz ramion, a także z aspiratów pochodzących z żołądka oraz górnych dróg oddechowych.

Kolonizacja tych miejsc jest przewlekła, często też dochodzi do skażenia środowiska wokół pacjenta (łóżka, pościel) szczepami VRE. Zatem, enterokoki łączą w sobie cechy charakterystyczne innych patogenów związanych z zakażeniami szpitalnymi: persystentną kolonizację jelit (pałeczki Gram-ujemne), kolonizację skóry (*S. aureus*) oraz kontaminację środowiska (*Clostridium difficile*) [9]. Enterokoki przeżywają na skórze pacjentów, personelu medycznego oraz studentów odbywających zajęcia w oddziałach szpitalnych. Przeniesienie szczepów VRE za pośrednictwem rąk personelu medycznego zostało udowodnione poprzez porównanie wzorów PFGE szczepów izolowanych od pacjentów, szczepów izolowanych z rąk personelu oraz miejsc, które mogły być skażone szczepami pochodzącymi zarówno od pacjentów, jak i od personelu [59]. Szczepy VRE izolowano praktycznie ze wszystkich miejsc, z którymi mogli mieć kontakt pacjenci lub personel medyczny (przyciski dzwonek, monitory elektrokardiografów, ciśnieniomierze, glukometry, stetoskopy, termometry, rurki intubacyjne, katetery, pojemniki, w których podaje się pacjentom tabletki, klawiatury komputerowe, panele kontrolne w ścianach, telefony, podłóżki, stoły, krzesła, ramy łóżek szpitalnych, zlewy, deski klozetowe, klamki, drzwi, podłogi i obicia mebli) [60, 64].

Presja antybiotykowa jest następnym ważnym czynnikiem oddziałującym na epidemiologię patogenów opornych na antybiotyki. Pojawienie się szpitalnych szczepów VRE wiąże się ze stosowaniem wankomycyny podawanej doustnie – zarówno w Europie, jak i w Stanach Zjednoczonych, przy czym w USA notowano (i nadal notuje się) znacznie wyższe zużycie wankomycyny, w porównaniu do sytuacji w Europie. Biorąc pod uwagę pięć krajów europejskich (Francję, Niemcy, Holandię, Belgię i Wielką Brytanię) o populacji zbliżonej do populacji Stanów Zjednoczonych, w krajach tych notuje się pięć- do dziesięciokrotnie mniejsze roczne zużycie wankomycyny (w obu postaciach – pozajelitowej i doustnej) w odniesieniu do USA [9]. Mimo iż stosowanie wankomycyny jest jednym z głównych czynników ryzyka, jeśli idzie o kolonizację pacjentów szczepami VRE [23, 62], coraz więcej danych przemawia za udziałem innych antybiotyków w tym procesie. Rozprzestrzenianie szpitalnych szczepów enterokoków opornych na wankomycynę może być – przynajmniej w części – wspomagane przez oporność na inne antybiotyki, przy czym na rozróżnienie zasługują dwie kwestie. Jedną to antybiotyki, których intensywne stosowanie może być traktowane jako czynnik ryzyka nabycia szpitalnych szczepów VRE (cefalosporyny trzeciej generacji, metronidazol [34, 71]), druga to zjawisko wielolekooporności szpitalnych szczepów VRE, szczególnie *E. faecium*. Rzucającą się w oczy różnicą między szczepami enterokoków

izolowanymi ze środowiska pozaszpitalnego a szczepami szpitalnymi, jest wzór oporności na leki przeciwbakteryjne. Porównanie wzorów oporności szczepów *E. faecium* izolowanych z produktów mlecznych, kału owiec oraz szczepów izolowanych z materiałów klinicznych, przeprowadzone przez Mannu i wsp. [52], wskazuje przede wszystkim na różnice w oporności na penicylinę, ampicylinę, wysokie stężenia aminoglikozydów oraz erytromycynę. Szczepy pochodzące od zwierząt oraz z produktów spożywczych cechowały się niemalże pełną wrażliwością na wymienione antybiotyki, natomiast 93% szczepów *E. faecium* odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne wykazywało oporność na penicylinę, 75% było odporne na ampicylinę, 82% – na wysokie stężenia aminoglikozydów, a 97% – na erytromycynę.

Źródłem szpitalnych epidemii VRE może być nabycie genu (lub genów) oporności na wankomycynę przez wrażliwy szczep endemiczny (lub grupę szczepów) długotrwale obecny w oddziale szpitalnym. W pracach porównujących wzory PFGE szczepów VRE odpowiedzialnych za epidemie zakażeń szpitalnych [44, 50] uzyskano wyniki wskazujące na rozsiew klonalny jako główny mechanizm rozprzestrzeniania szczepów VRE w oddziale. Opisywano także grupy szczepów wrażliwych na antybiotyki glikopeptydowe, demonstrujące typ PFGE charakterystyczny dla endemicznych szczepów VRE [78]. Z drugiej strony, na podstawie wyników tych badań, niemożliwe było wyróżnienie typu PFGE szczególnie predysponowanego pod względem możliwości nabycia genów *vanA* lub *vanB*.

Wyniki badań, grupujące dane epidemiologiczne oraz genotypowanie umożliwiły opis „historii naturalnej” szczepów VRE w szpitalu (lub oddziale szpitalnym). Pierwszy etap tego procesu obejmuje sporadycznie obserwowane pojawianie się szczepów opornych, pochodzących najczęściej z flory fizjologicznej pojedynczych pacjentów [42]. Drugi etap charakteryzuje się występowaniem epidemii (o różnym zasięgu i nasileniu) powodowanych przez szczepy VRE o wysokim stopniu podobieństwa genetycznego (epidemie klonalne) i ograniczony jest najczęściej do jednego oddziału szpitalnego, rzadko do kilku oddziałów [41]. Trzeci etap charakteryzuje się występowaniem endemicznych zakażeń wywoływanych przez niespokrewnione szczepy VRE izolowane od pacjentów hospitalizowanych w różnych oddziałach [8]. Każdy z wymienionych etapów wymaga innego podejścia do kwestii rozpoznawania oraz kontroli zakażeń spowodowanych przez VRE. O ile istnienie (lub wprowadzenie) odpowiednich procedur kontroli szpitalnych zakażeń VRE na etapie pierwszym lub drugim w większości przypadków umożliwia zahamowanie dalszego rozprzestrzeniania szczepów opornych (a na-

wet ich eradykację), o tyle etap trzeci (endemiczne zakażenia poliklonalne, szczepy izolowane z różnych oddziałów) jest znacznie trudniejszy do opanowania w skali całego szpitala [9].

Piśmiennictwo

1. Allen N.E., Nicas T.I.: Mechanisms of action of oritavancin and related glycopeptide antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 511–532 (2003)
2. An F.Y., Clewell D.B.: Identification of the *cAD1* sex pheromone precursor in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **184**, 1880–1887 (2002)
3. Arias C.A., Courvalin P., Reynolds P.E.: *vanC* cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1660–1666 (2000)
4. Arias C.A., Pena J., Panesso D., Reynolds P.: Role of the transmembrane domain of the VanT serine racemase in resistance to vancomycin in *Enterococcus gallinarum* BM4174. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 557–564 (2003)
5. Arthur M., Molinas C., Dutka-Malen S., Courvalin P.: Structural relationship between the vancomycin resistance protein VanH and 2-hydroxycarboxylic acid dehydrogenases. *Gene*, **103**, 133–134 (1991)
6. Arthur M., Molinas C., Depardieu F., Courvalin P.: Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J. Bacteriol.* **175**, 117–127 (1993)
7. van Bambeke F., Chauvel M., Reynolds P.E., Fraimow H.S., Courvalin P.: Vancomycin-dependent *Enterococcus faecalis* clinical isolates and revertant mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 41–47 (1999)
8. Bischoff W.E., Reynolds T.M., Hall G.O., Wenzel R.P., Edmond M.B.: Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a large urban hospital over a 5-year period. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3912–3916 (1999)
9. Bonten M.J., Willems R., Weinstein R.A.: Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect. Dis.* **1**, 314–325 (2001)
10. Boyd D.A., Conly J., Dedier H., Peters G., Robertson L., Slater E., Mulvey M.R.: Molecular characterization of the *vanD* gene cluster and a novel insertion element in a vancomycin-resistant enterococcus isolated in Canada. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2392–2394 (2000)
11. Boyd D.A., Cabral T., Van Caeseele P., Wylie J., Mulvey M.R.: Molecular characterization of *vanE* gene cluster in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* N00-410 isolated in Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1977–1979 (2002)
12. Brandt J.J., Chatwood L.L., Crowder M.W.: Analysis of three overexpression systems for VanX, the zinc(II) dipeptidase required for high-level vancomycin resistance of bacteria. *Protein Expr. Purif.* **20**, 300–307 (2000)
13. Casadewall B., Courvalin P.: Characterization of the *vanD* glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. *J. Bacteriol.* **181**, 3644–3648 (1999)
14. Casadewall B., Reynolds P.E., Courvalin P.: Regulation of expression of the *vanD* glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. *J. Bacteriol.* **183**, 3436–3446 (2001)
15. Cetinkaya Y., Falk P., Mayhall G.: Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 686–707 (2000)

16. Chang S., Sievert D.M., Hageman J.C., Boulton M.L., Tenover F.C., Downes F.P., Shah S., Rudrik J.T., Pupp G.R., Brown W.J., Cardo D., Fridkin S.K.: Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1342–1347 (2003)
17. Clark N.C., Cooksey N.C., Hill B.C., Swenson J.M., Tenover F.C.: Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from US hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 2311–2317 (1993)
18. Clark N.C., Weigel L.M., Patel J.B., Tenover F.C.: Comparison of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Michigan and Pennsylvania. *Antimicrob. J. Chemother.* **49**, 470–472 (2005)
19. Clewell D.B.: Bacterial sex-pheromone-induced plasmid transfer. *Cell*, **73**, 9–12 (1993)
20. Clewell D.B., Francia M.V., Flanagan, S.E., An F.Y.: Enterococcal plasmid transfer: sex pheromones, transfer origins, relaxases, and the *Staphylococcus aureus* issue. *Plasmid*, **48**, 193–201 (2002)
21. Corso A., Faccone D., Gaggioli P., Togneri A., Lopardo H., Melano R., Rodriguez V., Rodriguez M., Galas M.: First report of VanA *Enterococcus gallinarum* dissemination within an intensive care unit in Argentina. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **25**, 51–56 (2005)
22. Courvalin P.: Genetics of glycopeptide resistance in Gram-positive pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**, 479–486 (2005)
23. Currie B.P., Lemos-Filho L.: Evidence for biliary excretion of vancomycin into stool during intravenous therapy: potential implications for rectal colonization with vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4427–4429 (2005)
24. da Costa Darini A.L., Palepou M.F.I., Woodford N.: Nucleotide sequence of IS1542, an insertion sequence identified within VanA glycopeptide resistance elements of enterococci. *FEMS Microbiol. Lett.* **173**, 341–346 (1999)
25. Dahl K.H., Rokenes T.P., Lundblad E.W., Sundsfjord A.: Nonconjugative transposition of the vanB-containing Tn5382-like element in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 786–789 (2003)
26. DeJonge B.L.M., Handwerger S., Gage D.: Altered peptidoglycan composition in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 863–869 (1996)
27. Depardieu F., Bonora M.G., Reynolds P.E., Courvalin P.: The *vanG* glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. *Mol. Microbiol.* **50**, 931–948 (2003)
28. Depardieu F., Kolbert M., Pruul H., Bell J., Courvalin P.: VanD-type vancomycin resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3892–3904 (2004)
29. Donskey C.J., Chowdhry T.K., Hecker M.T., Huyen C.K., Hanrahan J.A., Hujer A.M., Hutton-Thomas R.A.: Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N. Engl. J. Med.* **343**, 1925–1932 (2002)
30. Dutta I., Reynolds P.E.: Biochemical and genetic characterization of the *vanC-2* vancomycin resistance gene cluster of *Enterococcus casseliflavus* ATCC 25788. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3125–3132 (2002)
31. Dutta I., Reynolds P.E.: The *vanC-3* vancomycin resistance gene cluster of *Enterococcus flavescens* CCM 439. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 703–706 (2003)
32. Eaton T.J., Gasson M.J.: Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environment. Microbiol.* **67**, 1628–1635 (2001)
33. Farrag N., Eltringham I., Liddy H.: Vancomycin-dependent *Enterococcus faecalis*. *Lancet*, **348**, 1581–1582 (1996)
34. Fridkin S.K., Edwards J.R., Courvalin J.M., Hill H., Tenover F.C., Lawton R., Gaynes R.P., McGowan J.E.: The effect of vancomycin and third generation cephalosporins on prevalence of vancomycin-resistant enterococci in 126 U.S. adult intensive care units. *Ann. Int. Med.* **135**, 175–183 (2001)
35. Garnier F., Taourit S., Glaser P., Courvalin P., Gakimand M.: Characterization of transposon Tn1549, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus* spp. *Microbiol.* **146**, 1481–1489 (2000)
36. Gholizadeh Y., Courvalin P.: Acquired and intrinsic glycopeptide resistance in enterococci. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **16 (Supl. 1)**, S11–S17 (2000)
37. Handwerger S., Pucci M.J., Volk K.J., Liu J., Lee M.: Vancomycin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei* synthesise cytoplasmatic peptidoglycan precursors that terminate in D-lactate. *J. Bacteriol.* **176**, 260–264 (1994)
38. Hirt H., Schlievert P.M., Dunny G.M.: In vivo induction of virulence and antibiotic resistance transfer in *Enterococcus faecalis* mediated by the sex pheromone-sensing system of pCF10. *Infect. Immun.* **70**, 716–723 (2002)
39. Joyanes P., Pascual A., Martinez-Martinez L., Hevia A., Perea E.: In vitro adherence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* to urinary catheters. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**, 124–127 (2000)
40. Kacica M., McDonald L.C.: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* – New York, 2004. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* **53**, 322–323 (2004)
41. Kawalec M., Gniadkowski M., Kedzierska J., Skotnicki A., Fiett J., Hryniewicz W.: Selection of a teicoplanin-resistant *Enterococcus faecium* mutant during an outbreak caused by vancomycin-resistant enterococci with the vanB phenotype. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 4274–4282 (2001)
42. Kawalec M., Gniadkowski M., Zielinska U., Klos W., Hryniewicz W.: Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain carrying the *vanB2* gene variant in a Polish hospital. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 811–815 (2001)
43. Khachatourians G.G.: Agricultural use of the antibiotics and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Can. Med. Assoc. J.* **159**, 1129–1136 (1998)
44. Leavis H., Top J., Shankar N.: A novel putative pathogenicity island linked to *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J. Bacteriol.* **186**, 672–682 (2004)
45. Lee W.G., Huh J.Y., Cho S.R., Lim Y.A.: Reduction in glycopeptide resistance in vancomycin-resistant enterococci as a result of *vanA* cluster rearrangement. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1379–1381 (2004)
46. Leonard B.A.B., Podbielski A., Hedberg P.J., Dunny G.M.: *Enterococcus faecalis* pheromone binding protein, PrgZ, recruits a chromosomal oligopeptide permease system to import sex pheromone cCF10 for induction of conjugation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 260–264 (1996)
47. Lester C.H., Frimodt-Müller N., Sørensen T.L., Monnet D., Hammerum A.M.: In vivo transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 596–599 (2006)
48. Lu J.J., Perngh C.L., Ho M.F., Chiueh T.S., Lee W.H.: High prevalence of VanB2 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2140–2145 (2001)

49. Magi G., Capretti R., Paoletti C., Pietrella M., Ferrante L., Biavasco F., Varaldo P.E., Facinelli B.: Presence of a vanA-carrying pheromone response plasmid (pBRG1) in a clinical isolate of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1571–1576 (2003)
50. Malani P.N., Thal L., Donabedian S.M., Robinson-Dunn B., Kauffman C.A., Chow J.W., Hershberger E., Zervos M.J.: Molecular analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* from Michigan hospitals during a 10 year period. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 841–843 (2002)
51. Malathum K., Murray B.E.: Vancomycin-resistant enterococci: recent advances in genetics, epidemiology and therapeutic options. *Drug Resist. Updat.* **2**, 224–243 (1999)
52. Mannu L., Paba A., Daga E., Comunian R., Zanetti S., Dupre I., Sechi L.A.: Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 291–304 (2003)
53. Marshall C.G., Lessard I.A., Park I., Wright G.D.: Glycopeptide antibiotic resistance genes in glycopeptide-producing organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2215–2220 (1998)
54. McKessar S.J., Berry A.M., Bell J.M., Turnidge J.D., Paton J.C.: Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 3224–3228 (2000)
55. Mendez-Alvarez S., Perez-Hernandez X., Claviere-Martin F.: Glycopeptide resistance in enterococci. *Int. Microbiol.* **3**, 71–80 (2000)
56. Miller D., Urdaneta V., Weltman A.: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* – Pennsylvania, 2002. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* **51**, 902 (2002)
57. Młynarczyk A., Młynarczyk G., Łuczak M.: Koniugacyjne przekazywanie genów oporności na glikopeptydy i makrolidy w obrębie rodzaju *Enterococcus* oraz ze szczepów *Enterococcus* do *Staphylococcus aureus*. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **54**, 21–28 (2002)
58. Murray B.E.: Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerging Infect. Dis.* **4**, 37–47 (1998)
59. Noskin G.A.: Vancomycin-resistant enterococci: clinical, microbiologic, and epidemiologic features. *J. Lab. Clin. Med.* **130**, 14–20 (1997)
60. Noskin G.A., Bednarz P., Suriano T., Reiner S., Peterson L.R.: Persistent contamination of fabric-covered furniture by vancomycin-resistant enterococci: Implications for upholstery selection in hospitals. *Am. J. Infect. Control.* **28**, 311–313 (2000)
61. Ostrovsky B.E., Clark N.C., Thauvin-Eliopoulos C., Venkataraman L., Samore M.H., Tenover F.C., Eliopoulos G.M., Moellering R.C., Gold H.S.: A cluster of vanD vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: molecular characterization and clinical epidemiology. *J. Infect. Dis.* **180**, 1177–1185 (1999)
62. Patel R., Uhl J.R., Kohner P., Hopkins M.K., Cockerill F.R.: Multiplex PCR detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-1* and *vanC-2/3* genes in enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 703–707 (1997)
63. Patel R.: Enterococcal-type glycopeptide resistance genes in non-enterococcal organisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **185**, 1–7 (1999)
64. Patel R.: Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **51** (Suppl. 3), 13–21 (2003)
65. Patiño L.A., Courvalin P., Perichon B.: vanE gene cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* BM4405. *J. Bacteriol.* **184**, 6457–6464 (2002)
66. Paulsen I.T., Banerjee L., Myers G.S., Nelson K.E., Seshadri R., Read T.D., Fouts D.E., Eisen J.A., Gill S.R., Heidelberg J.F., Tettelin H., Dodson R.J., Umayam L., Brinkac L., Beanan M., Daugherty S., DeBoy R.T., Durkin S., Kolonay J., Madupu R., Nelson W., Vamathevan J., Tran B., Upton J., Hansen T., Shetty J., Khouri H., Utterback T., Radune D., Ketchum K.A., Dougherty B.A., Fraser C.M.: Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*, **299**, 2071–2074 (2003)
67. Perichon B., Reynolds P., Courvalin P.: VanD-Type Glycopeptide-Resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 2016–2018 (1997)
68. Reynolds P.E.: Control of peptidoglycan synthesis in vancomycin-resistant enterococci: D,D-dipeptidases and D,D-carboxypeptidases. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 325–331 (1998)
69. Reynolds P.E., Courvalin P.: Vancomycin resistance in enterococci due to synthesis of precursors terminating in D-alanyl-D-serine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 21–25 (2005)
70. Rice L.B.: The theoretical origin of vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Newslett.* **24**, 185–192 (1995)
71. Rice L.B.: Emergence of vancomycin-resistant enterococci. *Emerging Infect. Dis.* **7**, 183–187 (2002)
72. Rippere K., Patel R., Uhl J.R., Piper K.E., Steckelberg J.M., Kline B.C., Cockerill F.R., Yousten A.A.: DNA sequence resembling *vanA* and *vanB* in the vancomycin-resistant biopesticide *Bacillus popilliae*. *J. Infect. Dis.* **178**, 584–588 (1998)
73. Sahn D.F., Free L., Handwerger S.: Inducible and constitutive expression of *vanCI* encoded resistance to vancomycin in *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1480–1484 (1995)
74. Samet A., Bronk M., Hellman A., Kur J.: Isolation and epidemiological study of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from patients of a haematological unit in Poland. *J. Hosp. Infect.* **41**, 137–143 (1999)
75. Serina S., Radice F., Maffioli S., Donadio S., Sosio M.: Glycopeptide resistance determinants from the teicoplanin producer *Actinoplanes teichomyceticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **240**, 69–74 (2004)
76. Shepard B.D., Gilmore MS.: Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes Infect.* **4**, 215–224 (2002)
77. Suppola J.P., Kuikka A., Vaara M., Valtonen VV.: Comparison of risk factors and outcome in patients with *Enterococcus faecalis* vs. *Enterococcus faecium* bacteraemia, Scandinavian *J. Infect. Dis.* **30**, 153–157 (1998)
78. Tenover F.C., Weigel L.M., Appelbaum P.C., McDougal L.K., Chaitram J., McAllister S., Clark N., Killgore G., O'Hara C.M., Jevitt L., Patel J.B., Bozdogan B.: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 275–280 (2004)
79. Umeda A., Garnier F., Courvalin P., Galimand M.: Association between the *vanB2* glycopeptide resistance operon and Tn1549 in enterococci from France. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 253–256 (2002)
80. Wilks M.: Vancomycin-dependent enterococcus. *Lancet*, **349**, 429 (1997)
81. Yu H.S., Seol S.Y., Cho D.T.: Diversity of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant enterococci isolated from humans and poultry in Korea. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 2641–2643 (2003)