

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Adéla Zajičková

**Enterococcus spp. jako rezervoár genů rezistence
Enterococcus spp. as a reservoir of resistance genes**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Irena Lichá, CSc.

Praha, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6. 5. 2021

Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala RNDr. Ireně Liché, CSc. za vedení této bakalářské práce a za její cenné rady a připomínky.

Abstrakt

Bakterie rodu *Enterococcus* se řadí mezi běžné nozokominální patogeny. Jsou významným rezervoárem genů rezistence k velké většině antibiotik a vykazují přirozenou odolnost k nízkým hladinám betalaktamů, glykopeptidů, aminoglykosidů, dále ke streptograminům a linkosamidům. Náplní této práce je shrnutí hlavních genů rezistence a dalších mechanismů podílejících se na vývoji odolnosti bakterií tohoto rodu k antibiotikům. Práce se zabývá především odolností k betalaktamovým antibiotikům, která je zajišťována expresí a mutacemi v nízkoafinitních PBPs, dále jednotlivými van rezistenčními typy zprostředkovávající odolnost k vankomycinu a expresí enzymů schopných modifikovat funkční skupiny aminoglykosidových antibiotik. V práci jsou také popsány odolnosti k novějším antibiotikům, která jsou využívána k léčbě vankomycin rezistentních izolátů. Odolnost k jednotlivým antibiotikům může být založena na kódování vlastních chromozomálních genů či celých signálních drah vedoucích k omezení účinku antibiotik, získání mutací v genech, a hlavně šíření nových rezistenčních genů horizontálním přenosem.

Klíčová slova: *E. faecium*, *E. faecalis*, odolnost k antibiotikům, multirezistentní izoláty, horizontální přenos genů

Abstract

Bacteria of the genus *Enterococcus* are categorised among common nosocomial pathogens. They are a significant reservoir of resistance genes to a majority of antibiotics and exhibit an intrinsic resistance to low levels of beta-lactams, glycopeptides, aminoglycosides, streptogramins and lincosamides. The aim of this paper is to review the main resistance genes and other mechanisms involved in the resistance of bacteria of this genus to antibiotics. The paper is mainly focused on the resistance to beta-lactam antibiotics, which is provided by the expression and mutations of low-affinity PBPs, the individual van resistance types mediating resistance to vancomycin, and the expression of enzymes capable of modifying the functional groups of aminoglycoside antibiotics. The paper also describes the resistance to newer antibiotics that are used to treat vancomycin-resistant isolates. The resistance to individual antibiotics can arise from the coding of their own chromosomal genes or entire signaling pathways leading to a reduction in the effect of antibiotics, the acquisition of genetic mutations, and especially the spread of new resistance genes by horizontal transfer.

Key words: *E. faecium*, *E. faecalis*, antibiotic resistance, multiresistance isolates, horizontal gene transfer

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Rezistence u rodu <i>Enterococcus</i>	2
3. Rezistence k betalaktamovým antibiotikům	3
3.1. Vlastní rezistence.....	3
3.1.1. Nadprodukce nízkoafinitních PBP třídy B.....	4
3.1.2. Role PBP třídy A.....	4
3.1.3. Ser/Thr kináza IreK, IreP a systém CroRS	5
3.1.4. Mutace PBP5 a PBP4.....	5
3.2. Získaná rezistence.....	6
3.2.1. Produkce betalaktamázy.....	6
4. Rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům.....	8
4.1. Rezistenční typ vanA.....	9
4.1.1. Gen <i>vanH</i> , <i>vanA</i> , <i>vanX</i>	9
4.1.2. Gen <i>vanY</i>	10
4.1.3. Gen <i>vanZ</i>	10
4.1.4. VanRS systém regulace.....	10
4.2. Rezistenční typ vanB.....	11
4.3. Rezistenční typ vanC.....	11
5. Rezistence k aminoglykosidovým antibiotikům.....	13
5.1. Aminoglykosid modifikující enzymy.....	13
5.1.1. Aminoglykosid acetyltransferázy.....	14
5.1.2. Aminoglykosid adenyltransferázy	14
5.1.3. Aminoglykosid fosfotranferázy.....	15
5.2. Ribozomální mutace.....	15
6. Odolnost enterokoků k ostatním antibiotikům.....	16
6.1. Streptograminy	16

6.2.	Oxazolidinony-linezolid	16
6.3.	Tetracyklinová antibiotika	17
6.4.	Lipopeptidová antibiotika – daptomycin	18
7.	Šíření genů rezistence k antibiotikům	20
8.	Multirezistentní izoláty populace <i>Enterococcus</i>	21
9.	Závěr	22
10.	Použitá literatura	24

Seznam použitých zkratk

AAC	aminoglykosid acetyltransferáza (aminoglycoside acetyltransferase)
ABC	proteiny kazety vázající ATP (ATP binding cassette)
AME	enzymy modifikující aminoglykosidy (aminoglykosid modifying enzymes)
ANT	aminoglykosid nukleotidyltransferáza (aminoglycoside nucleotidyltransferase)
APH	aminoglykosid fosfotransferáza (aminoglycoside phosphotransferase)
KTG	motiv C-koncové domény penicilin vazebného proteinu (lysin-K, threonin-T, glycín-G)
MIC	minimální inhibiční koncentrace (the minimum inhibitory concentration)
P5AP	protein asociovaný s PBP5 (PBP5 associated protein)
PBPs	penicilin vazebné proteiny (penicillin-binding proteins)
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina (ribosomal ribonucleic acid)
SDN	motiv C-koncové domény penicilin vazebného proteinu (serin-S, kyselina asparagová-D, asparagin-N)
tRNA	transferová ribonukleová kyselina (transfer ribonucleic acid)
UDP-MurNac	uridin-difosfát-N-acetylmuramová kyselina (uridine-diphosphate-N-acetylmuramic acid)
VRE	vankomycin rezistentní enterokoci (vancomycin resistant enterococci)

1. Úvod

Bakterie rodu *Enterococcus* se řadí k jednomu z hlavních druhů bakterií zodpovědných za velkou část onemocnění spojených s nemocniční hospitalizací. Mezi nejčastější onemocnění, způsobené především kmeny *E. faecalis* a *E. faecium*, patří endokarditida, infekce močových cest či bakteriémie spojené s transplantací, zavedením katetru nebo kloubních náhrad. Hovoří se o tom, že by tyto mikroorganismy mohly mít velký vliv i na chronické záněty střevního traktu jako je ulcerózní kolitida či Crohnova choroba.

Bakterie tohoto rodu mají vysokou schopnost adaptace na nejrůznější prostředí. Přirozeně se tyto grampozitivní bakterie vyskytují v gastrointestinálním traktu jakožto komenzální mikroorganismy, dále se hojně vyskytují v odpadních a povrchových vodách, půdě, v potravinách živočišného i rostlinného původu či v nemocničních zařízeních jako patogenní organismy. Vysoká míra schopnosti přizpůsobit se nejrůznějším podmínkám a šířit mezi sebou geny rezistence vytváří z enterokoků nebezpečné hrozby.

K nejzávažnějším problémům dnešní doby patří enterokoky odolné k vankomycinu, tzv. VRE, které jsou zodpovědné za řadu závažných enterokokových infekcí. Stále více přibývají VRE kmenů *E. faecium*, jelikož tento druh vytváří typicky multirezistentní izoláty vykazující odolnost k více druhům antibiotik. Postupný vývoj odolnosti k antibiotikům spočívá v jejich nadměrném používání v nemocničních zařízeních či v hospodářství jako součást potravy hospodářských zvířat. Enterokoky si tak po neustálé expozici antibiotik vytváří různými mechanismy odolnost. Závažný problém nastává s poměrně rychlým vývojem odolnosti k novým antibiotikům, která se podávají proti vankomycin odolným bakteriím.

Cílem této práce je shrnutí dosavadních znalostí o výskytu a šíření genů rezistence k antibiotikům u bakterií rodu *Enterococcus*. Jsou popsány hlavní mechanismy stojící za vývojem odolnosti těchto patogenních bakterií a následné šíření odolnosti mezi enterokoky. Práce je zaměřena převážně na betalaktamová, glykopeptidová a aminoglykosidová antibiotika jakožto nejvíce využívaná antimikrobiální léčiva v klinické praxi. Dále jsou okrajově popsány odolnosti k novějším antibiotikům jako je chinupristin, dalfopristin, linezolid, tigecyklin, daptomycin, která jsou dnes využívána k léčbě infekcí způsobených enterokoky odolnými k vankomycinu.

2. Rezistence u rodu *Enterococcus*

Rod *Enterococcus* vykazuje odolnost k velké většině běžně používaných antibiotik, přičemž různé mechanismy vývoje odolnosti se mohou mezi jednotlivými kmeny lišit. Enterokoky jsou přirozeně odolné k betalaktamovým, glykopeptidovým, aminoglykosidovým antibiotikům či k streptograminům. Tyto odolnosti zajištěné chromozomálně kódovanými geny způsobují odolnost typicky k nízkým hladinám antibiotik (Hollenbeck & Rice, 2012).

Mnohem důležitější je horizontální přenos genů či získání mutací v genech, kterými si tyto mikroorganismy zajišťují vysokou odolnost k velké většině antibiotik. Enterokoky mohou získat odolnost k vysokým hladinám betalaktamů, glykopeptidů a aminoglykosidů (Patterson et al., 1995). Jsou velmi často odolné k fluorochinolonům způsobené mutacemi v genech *gyrA*, *parC* (Tankovic et al., 1996). Dále vykazují odolnost k makrolidům a linkosamidům expresí *ermB* genu (Jensen et al., 1999), odolnost k chloramfenikolu v přítomnosti *cat* genu (Parent & Roy, 1992) či odolnost k rifampicinu způsobenou mutacemi v genu *rpoB* (Enne et al., 2004).

Časem si bakterie získávají odolnost i k poměrně novým druhům antibiotik jako je chinupristin, dalfopristin, linezolid, tigecyklin nebo daptomycin (Arias et al., 2011; Fiedler et al., 2016; Marshall et al., 2002; Singh et al., 2002).

Níže jsou detailněji popsány odolnosti k antibiotikům, která jsou v dnešní době velmi často využívaná k léčbě enterokokových infekcí.

3. Rezistence k betalaktamovým antibiotikům

Betalaktamy, mezi které se řadí peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy a monobaktamy, jsou běžně využívaná antibiotika k léčbě enterokokových infekcí (Patterson et al., 1995). Mechanismus účinku spočívá ve vazbě antibiotika s penicilin vazebnými proteiny (PBP), po které dochází k modifikaci PBPs a nastává inhibice syntézy buněčné stěny bakterií a inhibice buněčnému růstu (Coyette et al., 1980).

Genom rodu *Enterococcus* kóduje šest odlišných proteinů vázajících penicilin (Coyette et al., 1980; Williamson et al., 1983) s vysokými molekulovými hmotnostmi. Původně byly PBPs označovány číselně (Coyette et al., 1980; Williamson et al., 1983), dnes jsou rozdělovány na geny *ponA*, *pbpF*, *pbpZ* kódující penicilin vazebné proteiny třídy A a geny *pbp5*, *pbpA*, *pbpB* kódující penicilin vazebné proteiny třídy B. (Arbeloa et al., 2004).

PBP třídy B s funkcí D, D-transpeptidázy umožňují zesíťování buněčné stěny. Katalyzují tvorbu peptidových můstků, které propojují peptidoglykanové řetězce (Coyette et al., 1980). PBP třídy A s funkcí glykosyltransferázy se podílejí na zesíťování peptidoglykanu, nejsou nutné pro přežívání bakterií, ale hrají důležitou roli při vzniku rezistentních kmenů (Arbeloa et al., 2004).

3.1. Vlastní rezistence

Nízká přirozená rezistence k betalaktamům je u bakterií rodu *Enterococcus* způsobena produkcí PBP třídy B, které mají daleko nižší afinitu k betalaktamům než penicilin vázající proteiny ostatních druhů bakterií. Kmeny přenášející nízkoafinitní PBPs mají několikanásobně nižší citlivost k betalaktamům oproti kmenům, které tyto PBPs nenesou (Fontana et al., 1983). *E. faecium*, druh přirozeně nejvíce rezistentní k penicilinu (Williamson et al., 1983), má kódované nízkoafinitní proteiny označované jako PBP5 (Fontana et al., 1983). U *E. faecalis* jsou označované jako PBP4 (Duez et al., 2001; Fontana et al., 1983).

Kromě přirozeného kódování nízkoafinitních PBP třídy B s funkcí D, D-transpeptidázy mohou některé enterokokové izoláty exprimovat enzym Ldtfm s funkcí L, D-transpeptidázy, který se podílí na zesíťování peptidoglykanu. Tento mechanismus je využíván jen výjimečně v nepřítomnosti PBP5 (Diaz et al., 2014).

Přirozená odolnost k cefalosporinům je zajišťována produkcí PBP třídy A (Arbeloa et al., 2004). Odolnost je regulována aktivitami kináz a fosfatáz. U kmenů *E. faecium* se jedná o Ser/Thr fosfatáza/kinázový systém StpA a Stk (Desbonnet et al., 2016), u *E. faecalis* Ser/Thr

fosfatáza/kinázový systém IreP, IreK (Kristich et al., 2007). Dále je u obou kmenů odolnost spojená s regulační dráhou systému CroRS (Comenge et al., 2003).

Zvýšení vnitřní odolnosti k cefalosporinům umožňuje u izolátů *E. faecalis* také enzym MurA, který zajišťuje syntézu buněčné stěny bakterií (Vesić & Kristich, 2012).

3.1.1. Nadprodukce nízkoafinitních PBP třídy B

Bakterie rodu *Enterococcus* mohou nízkoafinitní PBP produkovat ve větším množství, a tím se jejich odolnost k betalaktamům zvyšuje (Fontana et al., 1983). V nadprodukcí může tento nízkoafinitní PBP převzít funkci D, D-transpeptidázy ostatních PBP, které jsou satureovány antibiotikem (Fontana et al., 1983). Nadprodukce PBP5 bez přítomnosti mutací je spojena se střední rezistencí k beta laktamům (Zorzi et al., 1996).

U *Enterococcus hireae* (Ligozzi et al., 1993) a *E. faecium* (Zorzi et al., 1996) se nachází 1 kb před genem kódujícím PBP5 gen pro represor označovaný jako *psr*. Protein Psr o velikosti 19 kDa má funkci regulátoru syntézy nízkoafinitních PBP. U nemutantní formy Psr represoru dochází k nízké produkci PBP5, bakterie mají vyšší citlivost k antibiotikům. Naopak bodová mutace či delece v genu *psr* způsobí inaktivaci represoru a dochází k vyšší produkci PBP5, která způsobí daleko vyšší odolnost k antibiotikům (Ligozzi et al., 1993). U *E. faecalis* byl také nalezen a identifikován gen podobný represoru *psr*, který byl ovšem nalezen v jiné části chromozomu a nebyla potvrzena jeho funkce (Duez et al., 2001).

3.1.2. Role PBP třídy A

PBP třídy A jsou důležité k vytvoření odolnosti enterokoků k cefalosporinům. Pro samotné přežití bakterie nejsou tyto PBP potřebné (Arbeloa et al., 2004). U *E. faecalis* (Arbeloa et al., 2004) a *E. faecium* (Rice et al., 2009) interakce glykosyltransferázové aktivity jednoho z PBP třídy A (PonA, PBPF) s PBP5 způsobuje rezistenci k ceftriaxonu a cefepimu (Arbeloa et al., 2004). Samotná produkce PBP5 je důležitá pro odolnost bakterií k ampicilinu i cefalosporinům, ale delece genu *ponA* a *pbpF* zvyšují citlivost bakterií pouze k cefalosporinům (Rice et al., 2009).

U kmenů *E. faecium*, které nenesou PBP třídy A, byl zaznamenán výskyt proteinu P5AP (protein asociovaný s PBP5) podílející se na rezistenci k cefalosporinům. Exprese P5AP proteinu je ovlivněna aktivitou Ser/Thr fosfatáza/kinázovým systémem StpA a Stk. PBP5 u *E. faecium* obsahuje alosterické místo pro navázání cefalosporinu. Po jeho navázání dochází ke konformační změně v aktivním místě, která poskytne snadné navázání další molekuly

antibiotika. Pokud bakterie kódují PBP5 společně s PBP třídy A nebo s P5AP, pravděpodobně nedochází k navázání antibiotika na alosterické místo nebo nenastává konformační změna tohoto místa a není tak umožněno navázání další molekuly antibiotika (Desbonnet et al., 2016).

3.1.3. Ser/Thr kináza IreK, IreP a systém CroRS

Vnitřní rezistence na cefalosporiny je u *E. faecalis* (Kristich et al., 2007) regulovaná signální drahou, jejíž součástí je kináza IreK a fosfatáza IreP. Díky tomuto signálnímu systému může rod *Enterococcus* velmi spolehlivě reagovat na cefalosporiny působící na buněčnou stěnu bakterií (Kristich et al., 2007; Kristich et al., 2011).

Reakcí na stres buněčné stěny, způsobený expozicí antibiotika, dochází ke zvýšené expresi autofosforylační kinázy IreK, která následně vede signalizaci k dalším podjednotkám této signální dráhy. Fosfatázová aktivita IreP funguje antagonicky proti IreK a je tak důležitým negativním regulátorem této signální dráhy. Kmeny s delecí v *ireP* vykazují vysokou odolnost k cefalosporinům, ale zároveň mají sníženou fitness v prostředí bez působení antibiotik (Kristich et al., 2011).

Nejsou přesně známy další podjednotky v IreK, IreP signální dráze, nicméně bylo zjištěno, že jedna z možných cest této signalizace vede k aktivaci kinázy CroS, která je součástí transdukčního systému CroRS (Kellogg & Kristich, 2018). Dvoukomponentový systém CroRS odpovídá za rezistenci k antibiotikům, které cílí na buněčnou stěnu bakterií (betalaktamy, bacitracin, vankomycin) (Kellogg et al., 2017). CroRS složený z regulátoru odezvy CroR a senzorové kinázy CroS (Comenge et al., 2003), je schopen ovlivnit aktivitu dalších dosud neznámých genů, které mají vliv na lokalizaci a funkci PBP5. Bez této signální dráhy se nemůže PBP5 podílet na zesíťování peptidoglykanu a zprostředkovávat tak odolnost k antibiotikům. CroRS je u *E. faecium* důležitý k vysoké odolnosti na cefalosporiny a ampiciliny, která je způsobena nadměrnou expresí PBP5 a mutovaných PBP5 (Kellogg et al., 2017).

3.1.4. Mutace PBP5 a PBP4

Další možností zvýšení míry odolnosti jsou mutace v genech pro nízkoafinitní PBP (Ligozzi et al., 1996), které způsobují vysokou odolnost rodu *Enterococcus* k betalaktamovým antibiotikům (Zorzi et al., 1996).

Nejčastěji dochází k mutacím v PBP5, konkrétně k aminokyselinovým substitucím v oblastech mezi motivy SDN a KTG aktivního místa domény vázající penicilin (Ligozzi et al., 1996). U vysoce rezistentních kmenů *E. faecium* se jedná o substituce v oblastech Thr-562-Ala,

Thr-574-Ile (Ligozzi et al., 1996), Thr-499-Ala nebo Thr-499-Ile (Zorzi et al., 1996), Val-629-Glu a Ser-667-Pro (Rybkin et al., 1998). U nejvíce odolných kmenů bylo zaznamenáno několik bodových mutací, které se vyskytovaly společně se Ser v poloze 466. Vysoká úroveň rezistence bakterií byla zaznamenána při kombinaci několika bodových mutací dohromady, naopak jednotlivé mutace nepřinesly kmenům zvýšenou odolnost k antibiotikům (Rice et al., 2004).

U *E. faecalis* jsou bodové mutace v genu kódující PBP4 zodpovědné za rezistenci na penicilin a imipenem (Ono et al., 2005). Jedná se o aminokyselinové substituce Pro-520-Ser a Tyr-605-His, které se nachází v oblastech mezi motivy SDN a KTG (Ono et al., 2005) C-koncové domény vázající penicilin. Substituce Asp-573-Glu je zodpovědná za sníženou citlivost k penicilinu, ale zároveň nemění afinitu k ampicilinu (Conceição et al., 2014).

3.2. Získaná rezistence

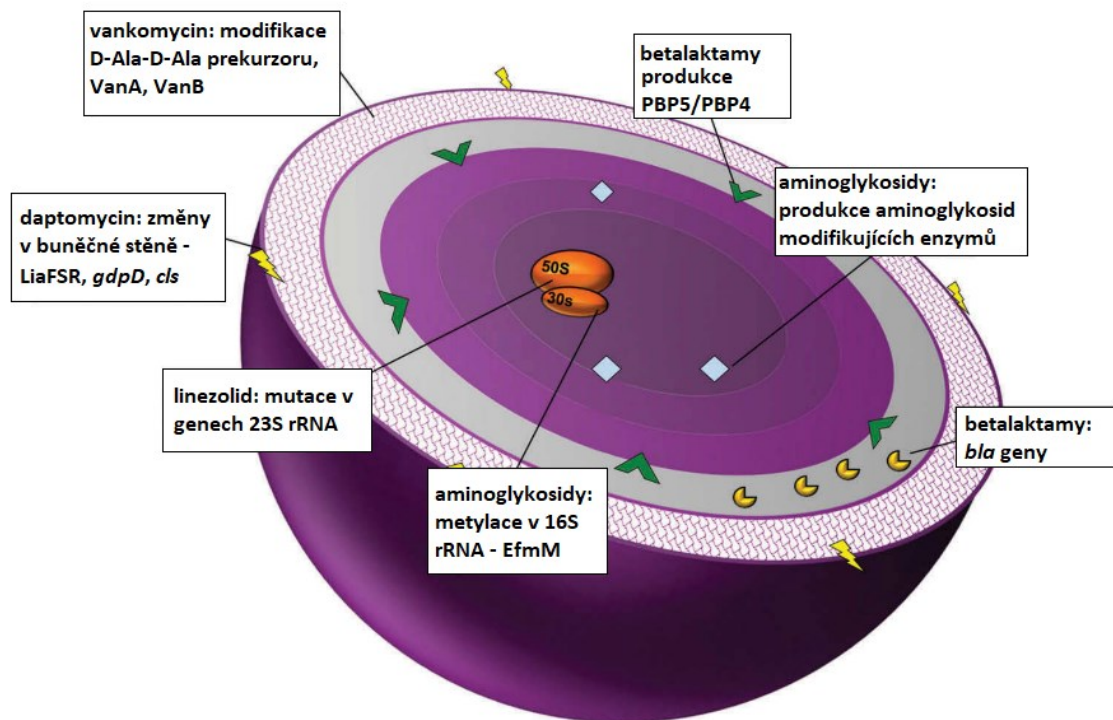
3.2.1. Produkce betalaktamázy

Betalaktamáza neboli penicilináza je bakteriální enzym kódovaný *bla* geny, které jsou schopny hydrolyzovat antibiotika a zvýšit tak MIC u jednotlivých bakterií (Murray et al., 1986). První přítomnost betalaktamázy u rodu *Enterococcus* byla pozorována roku 1983 u izolátu *E. faecalis*. Kódovaný enzym byl získán pravděpodobně od *Staphylococcus aureus*, jelikož u nich byl nalezen příbuzný gen pro betalaktamázu (Murray et al., 1986).

Mezi antibiotika podléhající hydrolýze betalaktamázami patří ampicilin, penicilin, ureido peniciliny (mezlocilin, piperacilin, azlocilin) a také tikarcilin a karbenicilin. Antibiotika methicilin, nafcililin a imipenem hydrolyzují v přítomnosti betalaktamázy jen minimálně. Cephalosporiny jsou také k hydrolýze odolné (Murray et al., 1986).

Bla geny se nachází na chromozomech (Rice et al., 1991) a konjugativních plasmidech, kterými jsou také přenášeny mezi jedinci (Murray et al., 1986). Často se přenáší společně s geny rezistence na gentamycin, streptomycin, erytromycin a tetracyklin (Rice et al., 1991).

U rodu *Enterococcus* je produkce beta laktamázy konstitutivní (Murray et al., 1986). Ke konstitutivní expresi betalaktamázy pravděpodobně dochází díky absenci nebo pozměnění regulačních genu pro *blaI* kódující represor (Zscheck & Murray, 1991) a genu *blaRI* kódující antirepresor, které již nejsou schopné řídit tvorbu enzymu (Zscheck & Murray, 1993).



Obrázek 1: Schéma hlavních mechanismů odolnosti k vybraným antibiotikům u gram pozitivní bakterie rodu *Enterococcus*. Odolnost k betalaktamovým antibiotikům způsobená produkcí nízkoafinitních proteinů PBP5/PBP4 a *bla* genů kódujících betalaktamázu, odolnost k aminoglykosidům vzniklá produkcí aminoglykosid modifikujících enzymů schopných modifikace funkčních skupin aminoglykosidů nebo mutacemi genů v 30S ribozomální podjednotce. Změny v cytoplazmatické membráně bakterií, způsobených systémem LiaFSR či mutacemi v genech *gdpD* a *cls*, vytvářející odolnost k daptomycinu. Odolnost k vankomycinu vzniklá modifikací D-Ala-D-Ala prekurzoru peptidoglykanu a odolnost k linezolidu vzniklá mutacemi v genech 23S rRNA v 50S ribozomální podjednotce (převzato a upraveno podle Mercurio et al., 2018).

4. Rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům

Glykopeptidová antibiotika vankomycin a teikoplanin jsou schopná inhibovat syntézu buněčné stěny bakterií, ke které dochází vazbou antibiotika na prekurzor peptidoglykanu zakončený dipeptidem D-Ala-D-Ala (Nieto & Perkins, 1971). Vankomycin je společně s peniciliny běžně využívaným antibiotikem při léčbě enterokokových onemocnění. U bakterií odolných k vankomycinu je léčba vankomycinem nahrazována jinými, méně účinnými antibiotiky (Patterson et al., 1995).

U bakterií rodu *Enterococcus* bylo identifikováno devět typů rezistence ke glykopeptidům (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM*, *vanN*), které se liší mechanismy fungování (Arthur et al., 1996). Nejvíce rozšířené jsou rezistence typu *vanA* a *vanB* (Willems et al., 2005).

Operony rezistenčních typů *vanA*, *vanB* (Dutka-Malen, Leclercq, et al., 1990), *vanD* (Perichon et al., 1997) a *vanM* (Xu et al., 2010) zodpovídají za změnu konce prekurzoru peptidoglykanu z pentapeptidů zakončených dipeptidem D-alanyl-D-alanin na depsipeptid zakončený D-alanyl-D-laktát (Messer & Reynolds, 1992). Geny zodpovědné za jednotlivé rezistenční typy se nachází na bakteriálním chromozomu či na plazmidech a jsou přenášeny intercelulárně konjugací (Dutka-Malen, Leclercq, et al., 1990). Pouze geny zodpovědné za rezistenci typu *vanD* nejsou přenosné konjugací pomocí plazmidu (Perichon et al., 1997).

Geny s funkcí ligázy kódované operony *vanC* (Billot-Klein et al., 1994), *vanE* (Fines et al., 1999), *vanG* (Depardieu et al., 2003), *vanL* (Boyd et al., 2008) a *vanN* (Lebreton et al., 2011) vytváří modifikovaný prekurzor peptidoglykanu s koncovým D-alanyl-D-serin (Billot-Klein et al., 1994). Geny rezistencí typu *vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* a *vanN* jsou umístěny na chromozomech, pouze geny zprostředkovávající rezistenci typu *vanN* mohou být přenášeny plazmidy (Lebreton et al., 2011).

Rezistenční typy vytvářející depsipeptid s koncovým D-Ala-D-Ser zodpovídají za nižší úroveň odolnosti enterokoků k vankomycinu oproti typům rezistence vytvářející depsipeptid s koncovým D-Ala-D-Lac. Zároveň rezistenční typy vytvářející D-Ala-D-Ser nezpůsobují odolnost bakterií k teikoplaninu (Billot-Klein et al., 1994; Reynolds, Snaith, et al., 1994).

4.1. Rezistenční typ vanA

Nejběžnější vanA typ je zodpovědný za vysokou odolnost enterokoků k vankomycinu a odolnost k teikoplaninu (Dutka-Malen, Leclercq, et al., 1990), která je způsobená modifikací glykopeptidového cíle (Dutka-Malen, Molinas, et al., 1990) u *E. faecalis* (Shlaes, Bouvet, et al., 1989) a *E. faecium* (Shlaes, Al-Obeid, et al., 1989).

Operon *vanA* obsahující geny *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY* a *vanZ* se nachází na transpozonu Tn1546 (Arthur et al., 1993). *VanA* geny rezistence byly lokalizovány na chromozomu a více různých konjugativních plazmidech (Dutka-Malen, Leclercq, et al., 1990). Nejčastěji jsou přenášeny plazmidem pIP816. Další plazmid pIP817 nese rezistenci k vankomycinu společně s rezistencí k streptomycinu, makrolidům, linkosamidům a streptograminům (Leclercq et al., 1988). Šíření genů *vanA* rezistence typu může být i mezidruhové díky transpozici Tn1546 do plazmidů se širokým hostitelským rozhraním (Arthur et al., 1993).

4.1.1. Gen *vanH*, *vanA*, *vanX*

Gen *vanA* kóduje protein VanA s funkcí D, D-dipeptidové ligázy, s pozměněnou substrátovou specifitou (Bugg, Dutka-Malen, et al., 1991) využívající ke své funkci substrát D-laktát (Handwerker et al., 1992; Messer & Reynolds, 1992). Exprese tohoto proteinu je indukována vankomycinem (Al-Obeid et al., 1990).

Protein VanA zajišťuje esterovou vazbu (Bugg, Wright, et al., 1991) mezi D-alanyl a D-laktátem. Dipeptid D-alanyl-D-laktát je následně přidán k prekurzoru peptidoglykanu UDP-MurNAc-D-Ala-D-Glu-L-Lys (Messer & Reynolds, 1992). Vzniklý depsipentapeptid L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Lac (Allen et al., 1992), zabudovaný do peptidoglykanu, má sníženou afinitu k vankomycinu. Antibiotikum není schopné účinně depsipentapeptid rozpoznat a vázat se na něj (Bugg, Dutka-Malen, et al., 1991).

Působením produktů genů *vanH*, *vanA*, *vanX* je z celkového množství prekurzorů peptidoglykanu syntetizováno až 98% depsipentapeptidu s koncovým D-Ala-D-Lac a 2% pentapeptidu zakončených D-Ala-D-Ala (Reynolds, Depardieu, et al., 1994). Se zvyšujícím se množstvím depsipentapeptidu stoupá MIC pro vankomycin (Arthur et al., 1996).

Odolnost k teikoplaninu vyžaduje úplnou eliminaci pentapeptidů v peptidoglykanu, jelikož i jeho malé množství způsobí inhibici růstu bakterií (Arthur et al., 1996).

Gen *vanH* kódující protein s funkcí dehydrogenázy (Arthur et al., 1991) redukuje pyruvát (Bugg, Wright, et al., 1991) na D-laktát, který slouží jako substrát pro VanA D, D-dipeptidovou ligázu (Handwerger et al., 1992; Messer & Reynolds, 1992).

Gen *vanX* kóduje protein s funkcí D, D-dipeptidázy, která hydrolyzuje dipeptid D-alanyl-D-alanin. Štěpením těchto dipeptidů je zabráněno vzniku prekursoru peptidoglykanu ve formě pentapeptidů zakončených D-Ala-D-Ala, ke kterým se snadno glykopeptidová antibiotika vážou (Reynolds, Depardieu, et al., 1994).

4.1.2. Gen *vanY*

VanY a *vanZ* geny lokalizované na Tn1546 se za určitých podmínek podílí na rezistenci ke glykopeptidům (Arthur et al., 1996), ale každý zodpovídá za odlišnou úroveň rezistence k vankomycinu a teikoplaninu (Arthur et al., 1995).

Protein VanY má funkci D, D-karboxypeptidázy, která hydrolyzuje D-Ala-D-Ala z UDP-MurNac-pentapeptidu a funkci D, D-karboxyesterázy štěpící D-Ala-D-Lac z UDP-MurNac-pentapeptidu (Wright et al., 1992). Zvýšení odolnosti bakterií ke glykopeptidům vlivem VanY nastává za situace, kdy je nízká exprese genů *vanH*, *vanA*, *vanX*, při které dochází k akumulaci velkého množství UDP-MurNac-pentapeptidu.

Gen *vanY* je vyžadován k účinné rezistenci u bakterií rostoucích při výskytu D-alaninu v médiu (Arthur et al., 1994).

4.1.3. Gen *vanZ*

Gen *vanZ*, stejně jako *vanY*, může zvyšovat odolnost bakterií ke glykopeptidům, jestliže je exprese genů *vanH*, *vanA*, *vanX* na nízké úrovni a dochází k hromadění pentapeptidu. V opačném případě má *vanZ* na rezistenci jen nepatrný vliv (Arthur et al., 1995).

VanZ je schopen až šestnáctkrát zvýšit MIC k teikoplaninu, avšak neovlivňuje odolnost k vankomycinu (Arthur et al., 1995).

4.1.4. VanRS systém regulace

Expresa genů *vanH*, *vanA*, *vanX* je regulována mechanismem dvou regulačních proteinů VanS a VanR (Arthur et al., 1992). V přítomnosti glykopeptidového antibiotika stimuluje pomocí fosforylace histidinová kináza VanS transkripční aktivátor VanR (Arthur et al., 1997).

VanR je následně schopen řídit transkripci *vanH*, *vanA*, *vanX* genů aktivací specifického promotoru (Arthur et al., 1992).

4.2. Rezistenční typ vanB

Bakterie nesoucí operon *vanB* vykazují odolnost k nízkým hladinám vankomycinu, ale zároveň jsou velmi často citlivé na teikoplanin (Dutka-Malen, Leclercq, et al., 1990).

Operon *vanB* kóduje geny *vanH_B*, *vanB*, *vanX_B*, *vanY_B*, a geny regulačního systému *vanS_B*, *vanR_B* které jsou shodné s geny operonu *vanA*. Rozdíl oproti *vanA* operonu je v přítomnosti genu *vanW*, jehož funkce je neznámá (Evers & Courvalin, 1996).

Geny operonu *vanB* jsou exprimovány až po indukci vankomycinem. Díky nedostatečné produkci D, D-dipeptidázy se v peptidoglykanu hromadí UDP-MurNac-pentadepsi-peptid společně s UDP-MurNac-pentapeptidem, které mohou vytvářet odolnost pouze k nízkým hladinám vankomycinu. Indukce teikoplaninem je často nedostatečná a proto jsou bakterie na toto antibiotikum citlivé (Arthur et al., 1996).

Rezistenční typ vanB vykazuje stejný mechanismus zajišťující odolnost bakterií ke glykopeptidům jako vanA typ rezistence. Produkovaný prekurzor peptidoglykanu je UDP-MurNac-pentapeptid s koncovým D-alanyl-D-laktát (Billot-Klein et al., 1994; Evers et al., 1994).

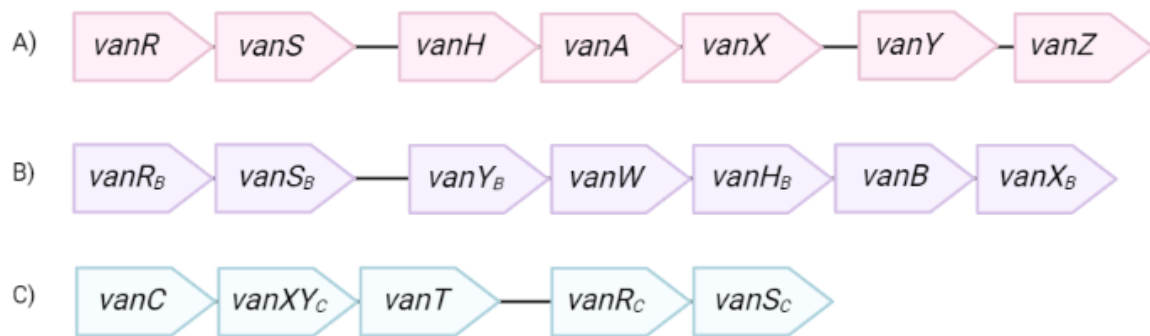
Rezistence typu vanB je nejčastěji nesena na transpozonu Tn1547 lokalizovaném na chromozomu i plazmidech (Quintiliani & Courvalin, 1996). Tn1547 označovaný také jako Tn5382 může nést operon *vanB* společně s genem kódujícím PBP5. U izolátů *E. faecium* je přenos genů rezistence k vankomycinu společně s geny rezistence k ampicilinu běžný. Geny kódující PBP5 tak nemusejí být pouze zprostředkovatelé vnitřní odolnosti bakterií, ale mohou být mezi enterokoky šířeny horizontálním přenosem (Carias et al., 1998).

4.3. Rezistenční typ vanC

Bakterie rodu *Enterococcus* s chromozomálně kódovaným operonem *vanC* vykazují přirozenou odolnost k nízkým hladinám vankomycinu (Billot-Klein et al., 1994), ale náchylnost k teikoplaninu (Reynolds, Snaith, et al., 1994). Rezistence typu *vanC* byla prokázána pouze u *E. gallinarum* (Dutka-Malen, Leclercq, et al., 1990), *E. casseliflavus* a *E. flavescens* (Navarro & Courvalin, 1994).

Operon *vanC* obsahuje gen *vanC* kódující funkci D-Ala-D-Ser ligázy (Reynolds, Snaith, et al., 1994), gen *vanXY_C* s funkcí D, D-dipeptidáza-karboxypeptidázy (Reynolds et al., 1999),

gen *vanT* kódující serinovou racemázou (Arlas et al., 1999) a *vanR_C*, *vanS_C* regulační geny (Arias et al., 2000). Mechanismus rezistence typu *vanC* je založen na produkci modifikovaného prekursoru peptidoglykanu ve formě depsipeptidu s koncovým D-alanyl-D-serin místo koncového dipeptidu D-alanyl-D-alanin (Billot-Klein et al., 1994).



Obrázek 2: **Operony zodpovědné za jednotlivé rezistenční typy udělující odolnost ke glykopeptidům.** Směr transkripce je označen šipkami. A) Rezistenční typ *vanA*. Operon *vanA* nesoucí *vanR* a *vanS* geny regulačního systému, gen *vanH* kódující protein s funkcí dehydrogenázy, gen *vanA* kódující protein s funkcí D, D-dipeptidové ligázy, gen *vanX* kódující D, D-dipeptidázu a vedlejší geny *vanY* kódující funkcí D, D-karboxypeptidázy a *vanZ* s neznámou funkcí. B) Rezistenční typ *vanB*. Operon *vanB* nesoucí geny regulačního systému *vanR_B* a *vanS_B*, gen *vanY_B* kódující protein s funkcí D, D-karboxypeptidázy, gen *vanW* s neznámou funkcí, gen *vanH_B* kódující dehydrogenázu, gen *vanB* kódující D, D-dipeptidovou ligázu a gen *vanX_B* kódující protein s funkcí D, D-dipeptidázy. C) Rezistenční typ *vanC*. Operon *vanC* nesoucí gen *vanC* kódující protein s funkcí D, D-dipeptidové ligázy, gen *vanXY_C* kódující D, D-dipeptidáza-karboxypeptidázu, gen *vanT* kódující serinovou racemázou a regulační geny *vanR_C* a *vanS_C* (vytvořeno autorem této práce).

5. Rezistence k aminoglykosidovým antibiotikům

Mechanismus funkce aminoglykosidových antibiotik je založen na vazbě na A místo v 30S ribozomální podjednotce bakterií. Tato vazba vede k špatnému rozpoznání tRNA s komplementární rRNA a dochází tak k nepřesné translaci proteinů nebo k úplnému zastavení translace (Kotra et al., 2000).

Buněčná stěna gramnegativních bakterií je pro aminoglykosidy částečně propustná. U grampozitivních bakterií, tedy i enterokoků, je zapotřebí kombinace aminoglykosidu s antibiotikem, které je schopné inhibovat syntézu buněčné stěny bakterií a umožní tak vstup aminoglykosidů do buněk. Tento mechanismus je označován jako baktericidní synergismus. Nejčastěji je k tomuto účinku využíván penicilin, dále cykloserin, bacitracin či vankomycin (Moellering & Weinberg, 1971).

Většina bakterií rodu *Enterococcus* vykazuje přirozenou odolnost ke středním hladinám aminoglykosidů s MIC 62 – 500 µg/ml (Zimmermann et al., 1971). Získání bakteriálních enzymů AME schopných modifikovat aminoglykosidy vede k daleko vyšší odolnosti s MIC od 2000 µg/ml (Mederski Samoraj & Murray, 1983). Odolnost k vysokým hladinám streptomycinu s MIC až 128 000 µg/ml je způsobena mutacemi v enterokokovém ribozomu, které neumožňují následnou vazbu streptomycinu k 30S ribozomální podjednotce (Eliopoulos et al., 1984).

Izoláty *E. faecalis*, *E. faecium* odolné k vysokým hladinám gentamicinu nebo streptomycinu obvykle vykazují odolnost k dalším antibiotikům. Léčba se proto u těchto izolátů značně komplikuje (Peyvasti et al., 2020).

5.1. Aminoglykosid modifikující enzymy

Odolnost k aminoglykosidům je u rodu *Enterococcus* nejčastěji způsobená expresí enzymů označovaných AME (aminoglykosid modifying enzymes) (Krogstad et al., 1978), které jsou schopné svými enzymovými aktivitami modifikovat funkční skupiny těchto antibiotik. Modifikované antibiotikum se následně nedokáže efektivně vázat k 30S ribozomální podjednotce a ztrácí tak svou antibakteriální schopnost (Llano-Sotelo et al., 2002).

Jedná se o konstitutivně exprimované enzymy, které mohou mít funkci aminoglykosid adenyltransferázy (ANT), aminoglykosid fosfotransferázy (APH) nebo aminoglykosid acetyltransferázy (AAC) (Combes et al., 1983). Kromě narušení antibiotického účinku jsou tyto enzymy schopné omezit funkci synergismu s inaktivovaným antibiotikem (Krogstad et al., 1978).

Geny kódující AME jsou s vysokou frekvencí přenášeny mezi izoláty konjugativními plazmidy, přičemž odolné kmeny mohou nést i několik takových genů (Mederski Samoraj & Murray, 1983).

5.1.1. Aminoglykosid acetyltransferázy

Aminoglykosid acetyltransferázy jsou enzymy schopné acetylace aminoskupin aminoglykosidů. Acetyltransferázy nalezené u rodu *Enterococcus* modifikují aminoskupiny 6-aminohexozy v poloze 6' (Combes et al., 1983).

Nejčastěji objeveným genem zprostředkovávající rezistenci na aminoglykosidy je bifunkční gen *aph(2'')-Ia-aac(6')-Ie*, vzniklý fúzí genu *aac(6')* a *aph(2'')*, způsobující konstitutivní expresi dvou enzymových aktivit schopných modifikovat aminoglykosidy. Část enzymu APH(2'') fosforyluje hydroxyskupiny na pozici 2'' a druhá část AAC(6')-Ie umožňuje acetylaci aminoskupiny 6-aminohexozy v pozici 6' (Ferretti et al., 1986). Tento bifunkční enzym způsobuje vysokou míru odolnosti na gentamicin, dále rezistenci na tobramycin, kanamycin, amikacin, netilmicin (Hodel-Christian & Murray, 1991).

Gen je přenášen konjugativními plazmidy společně s dalšími geny rezistence a je lokalizován na Tn5281 (Hodel-Christian & Murray, 1991). U *E. faecalis* nese plazmid pIP800 rezistenci na gentamicin a kanamycin společně s rezistencí na chloramfenikol (Courvalin et al., 1980) a plazmid pBEM10 přenáší geny rezistence ke gentamicinu společně s *bla* geny kódující betalaktamázu (Hodel-Christian & Murray, 1991). U *E. faecium* byl gen *aph(2'')-Ia-aac(6')-Ie* objeven na transpozonu Tn4001 v konjugativním plazmidu pMG1 (Tanimoto & Ike, 2008).

Výhradně na chromozomech *E. faecium* se nachází další gen *aac(6')-Ii* z rodiny AAC(6')-I acetyltransferáz kódující enzym AAC(6')-Ii, který zajišťuje vnitřní odolnost *E. faecium* ke středním hladinám kanamycinu, tobramycinu, netilmicinu a sisomicinu (Costa et al., 1993).

5.1.2. Aminoglykosid adenyltransferázy

Aminoglykosid adenyltransferázy, vyskytující se u rodu *Enterococcus*, adenylují hydroxylové skupiny aminoglykosidů v poloze 3'', 4', 6' (Combes et al., 1983).

Mezi nejčastěji se vyskytující geny kódující aktivitu adenyltransferáz patří *ant(6')-Ia* a *ant(3'')-Ia*, které jsou lokalizované, společně s geny dalších rezistencí, na plazmidech. Funkce enzymů ANT(6')-Ia a ANT(3'')-Ia zajišťuje bakteriím vysokou úroveň odolnosti ke streptomycinu (Hollingshead & Vapnek, 1985; Ounissi et al., 1990).

Další objevený gen *ant(4')-Ia* poskytuje odolnost na tobramycin, amikacin, kanamycin, neomycin, dibekacin (Carlier & Courvalin, 1990) a gen *ant(9)-Ia* nesený na transpozonu Tn554 uděluje enterokokům odolnost k spektinomycinu (Alam et al., 2005).

5.1.3. Aminoglykosid fosfotranferázy

Aminoglykosid fosfotranferázy u rodu *Enterococcus* fosforylují hydroxylové skupiny aminoglykosidů nejčastěji v pozici 2' a 3' (Combes et al., 1983).

Gen *aph(2'')-Ic*, původně izolovaný z *E. gallinarum*, uděluje enterokokům odolnost na střední hladiny gentamicinu, tobramycinu, kanamycinu. U některých kmenů je enzymová aktivita APH(2'')-Ic schopna bránit synergismu ampicilin-gentamicin. Gen *aph(2'')-Ic* se nachází na chromozomech a je přenášen konjugativními plazmidy (Chow et al., 1997).

Gen *aph(2'')-Id*, objevený u *E. casseliflavus*, uděluje kmenům vysokou odolnost ke gentamicinu, dále k tobramycinu, kanamycinu, netilmycinu, dibekacinu. U *E. faecium* byl výskyt genu *aph(2'')-Id*, kódující enzym APH(2'')-Id, spojen s odolností bakterií k vankomycinu (Tsai et al., 1998).

Gen *aph(2'')-Ib* uděluje bakteriím odolnost na vysoké hladiny gentamicinu, odolnost k tobramycinu, kanamycinu, netilmycinu a dibekacinu (Kao et al., 2000).

Velmi podobný gen *aph(2'')-Ie*, lišící se od *aph(2'')-Id* aminokyselinovou sekvencí, způsobuje odolnost vůči vysokým hladinám gentamicinu a streptomycinu (Alam et al., 2005).

Gen *aph(3')-IIIa* zprostředkovává vysokou odolnost bakterií na kanamycin, amikacin a neomycin. Bakterie zůstávají citlivé na streptomycin a tobramycin (Trieu-Cuot & Courvalin, 1983).

5.2. Ribozomální mutace

Chromozomální gen *efmM* s funkcí metyltransferázy umožňuje modifikaci bakteriálního ribozomu a uděluje enterokokům střední odolnost ke kanamycinu a tobramycinu. Enzym EfmM způsobuje metylaci cytidinu na pozici C5 nukleotidu C1404, který se nachází v A místě 30S ribozomální podjednotky (Galimand et al., 2011).

6. Odolnost enterokoků k ostatním antibiotikům

6.1. Streptograminy

U všech izolátů kmene *E. faecalis* byl identifikován gen *lsa* udělující bakteriím odolnost ke klindamycinu (linkosamid), dalfopristinu (streptogramin třídy A) a k chinupristinu (streptogramin třídy B). Gen *lsa* kóduje funkci efluxní pumpy založené na ABC transportu a zajišťuje tak vnitřní odolnost k těmto antibiotikům u *E. faecalis* (Singh et al., 2002).

Pro kmen *E. faecium* je typický chromozomální gen *mrsC*, který zajišťuje vnitřní odolnost ke streptograminům třídy B a k makrolidům (erytromycin). Jedná se o gen s funkcí ABC efluxní pumpy (Portillo et al., 2000). Kromě genu *mrsC* byl u kmene *E. faecium* nalezen plazmidový gen *vgaD* s funkcí efluxní pumpy udělující získanou odolnost k streptograminům třídy A (Jung et al., 2010).

Získanou odolnost bakterií k streptograminům zajišťuje také řada genů kódující enzymy s funkcí acetylace funkčních skupin antibiotik. Jedná se o geny *vatH*, *vgaA*, *vatE* a *vatD*. Acetyltransferázy *vatH*, *vatD* a *vatE* udělují bakteriím rodu *Enterococcus* odolnost k streptograminům třídy A (Jung et al., 2010; Rende-Fournier et al., 1993; Werner & Witte, 1999). Acetyltransferáza *vgaA* zajišťuje rezistenci k streptograminům třídy B (Jensen et al., 1998).

Vysokou odolnost enterokoků k makrolidům, linkosamidům a streptograminům zajišťuje přítomnost genů *ermA* a *ermB*. Tyto geny kódují funkci umožňující metylaci 23S rRNA v místě vazby antibiotika. Gen *ermA* je obvykle nesen na Tn554 a *ermB* na Tn917 (Jensen et al., 1999).

6.2. Oxazolidinony-linezolid

Linezolid je využíván k léčbě závažných enterokokových onemocnění. Obvykle je brán jako poslední možnost léčby po neúčinnosti všech ostatních antibiotik (Ruiz-Ripa et al., 2020). Mechanismus jeho účinku spočívá v zabránění syntéze proteinů vazbou na A místo v 50S bakteriální ribozomální podjednotce (Wilson et al., 2008).

Nejčastěji je u rodu *Enterococcus* odolnost k linezolidu způsobena v důsledku bodových mutací v genech 23S rRNA, která je součástí 50S ribozomální podjednotky. Konkrétně se jedná o nukleotidové substituce, které se nachází v blízkosti místa, kam se váže linezolid. *E. faecium* i *E. faecalis* mají několik kopií genů 23S rRNA, přičemž množství mutací může ovlivnit úroveň rezistence (Kloss et al., 1999; Marshall et al., 2002). Kromě mutací v 23S rRNA byly

u enterokoků pozorovány mutace v genech pro ribozomální proteiny L3 a L4, které ale nehrají významnou roli při rezistenci (Chen et al., 2013).

Další z možností bakteriální odolnosti k linezolidu je získání genu *cfrr* kódující enzym s funkcí methyltransferázy, který umožňuje metylaci nukleotidu A2503 v 23S rRNA. Touto metylací dochází k odolnosti ke streptograminům A, linkosamidům, oxazolidinonům a amfenikolům. Gen *cfrr* je přenosný různými plazmidy, nejčastěji plazmidem pEF-01 (Liu et al., 2012). Kromě *cfrr* byly nalezeny také nové varianty *cfrr(B)* (Deshpande et al., 2015) a *cfrr(D)* (Guerin et al., 2020), které se liší některými aminokyselinovými sekvencemi. Tyto nové varianty pravděpodobně přináší enterokokům odolnost k dalším druhům antibiotik, nicméně jsou za potřebí další studie pro potvrzení jejich mechanismu (Guerin et al., 2020).

V roce 2015 byl na plazmidu u *E. faecalis* objeven gen *optrA* s funkcí ABC transportéru, který zprostředkovává odolnost na linezolid a chloramfenikol (Wang et al., 2015). V nedávné době byl objeven ještě další gen kódující protein z rodiny ABC transportérů, označen jako *poxTA* (Antonelli et al., 2018). Gen *optrA* má společně s mutacemi v genech 23S rRNA velký význam u enterokoků odolných k linezolidu (Ruiz-Ripa et al., 2020).

6.3. Tetracyklinová antibiotika

Odolnost na tetracyklinová antibiotika je u bakterií rodu *Enterococcus* poměrně běžná. Je zprostředkována *tet* geny, které jsou rozlišovány na geny kódující efluxní pumpy *tet(L)*, *tet(K)* a geny *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)* a jsou zodpovědné za expresi proteinů schopných chránit ribozom (Bentorcha et al., 1991; Charpentier et al., 1994). V populaci enterokoků se nejčastěji vyskytují geny *tet(L)* a *tet(M)*. Gen *tet(L)* se obvykle nachází na plazmidu plP1534, pomocí kterého je přenášen. Gen *tet(M)* se nachází na bakteriálním chromozomu. Je nesen různými transpozony, z nichž nejčastěji je lokalizován na Tn916 (Bentorcha et al., 1991) a Tn1545 (Cochetti et al., 2008). Šíření genu *tet(M)* s vysokou frekvencí pravděpodobně stojí za rozsáhlým výskytem enterokoků odolných k tetracyklinům (Agersø et al., 2006).

Kmeny, které nadměrně exprimují *tet(L)* a *tet(M)* vykazují odolnost k poměrně novému léčivu tigeicyklinu, řadící se mezi glycylycyklinová antibiotika (Fiedler et al., 2016). Kromě *tet* genů byly u enterokoků nalezeny aminokyselinové substituce v genu *rpsJ* v 30S ribozomální podjednotce, které také vytváří odolnost k tigeicyklinu (Cattoir et al., 2015).

6.4. Lipopeptidová antibiotika – daptomycin

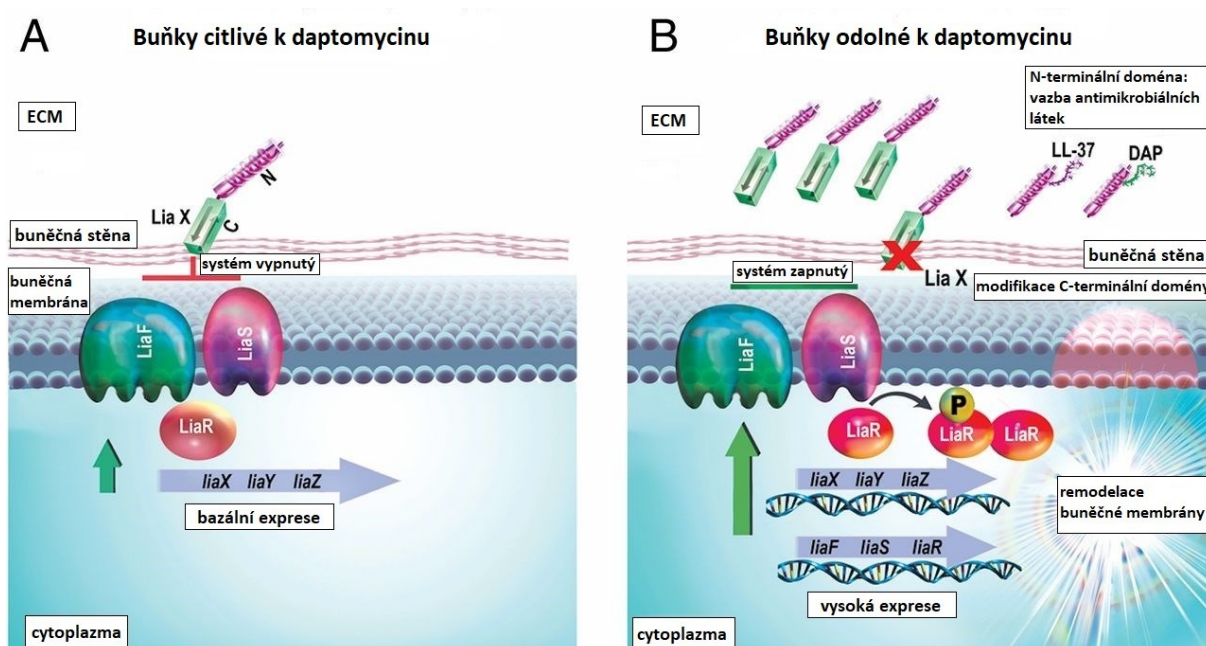
Lipopeptidové antibiotikum daptomycin je velmi často využíván při léčbě enterokokových onemocnění způsobených vankomycin odolnými druhy (VRE). Přesný mechanismus účinku daptomycinu nebyl dosud objasněn, nicméně bylo prokázáno, že daptomycin inhibuje syntézu buněčné stěny bakterií. Vazba daptomycinu k buněčné stěně bakterií umožňuje změny v lokalizaci tekutých lipidových domén a k následné degradaci proteinů, které se podílí na syntéze lipidů v buněčné stěně. Přeskupení lipidových domén vede k snadnému úniku protonů způsobující depolarizaci membrány bakterií a inhibici syntézy buněčné stěny (Müller et al., 2016).

Daptomycinová odolnost využívána enterokoky spočívá ve změně rozložení aniontových fosfolipidů v cytoplazmatické membráně bakterií (Khan et al., 2019). Byly objeveny tři možné regulační systémy LiaFSR, YycFG a YxdJK, které se podílí na tomto principu rezistence (Diaz et al., 2014; Miller et al., 2019).

Nejvíce využívaným regulačním systémem je LiaFSR, který kóduje protein s funkcí histidinové kinázy LiaS, regulátor odezvy LiaR a regulační protein LiaF. Systém reaguje na stres cytoplazmatické membrány vyvolaný přítomností antibiotika. Buněčným stresem aktivovaná histidinová kináza LiaS fosforyluje regulátor odezvy LiaR, který ovlivňuje transkripci dalších genů v tomto systému podílejících se na metabolismu fosfolipidů (Diaz et al., 2014) a také ovlivňuje transkripci genů operonu *liaXYZ* (Khan et al., 2019).

Protein LiaX, který je součástí operonu *liaXYZ*, hraje důležitou roli při remodelaci membrány, ale zároveň negativně reguluje systém LiaFSR. Za normálních okolností je C-terminální doména proteinu LiaX lokalizovaná na cytoplazmatické membráně bakterií a inhibuje tak systém LiaFSR. N-terminální doména je umístěná v extracelulárním prostředí buňky a je schopná vazby antibiotika či jiných léčiv. Pro vytvoření odolnosti je nutné inhibovat C-terminální doménu proteinu LiaX. K tomu dochází buď zkrácením C-terminální domény nebo mutacemi v systému LiaFSR, vedoucí k nadměrné produkci proteinu LiaX do extracelulárního prostředí, kde jeho vazba s daptomycinem už není schopná inhibovat systém LiaFSR. Aktivovaný systém je následně schopen svým mechanismem zajistit distribuci fosfolipidů a tím odolnost v daptomycinu (Khan et al., 2019).

Počáteční studie zjistily, že na vzniku odolnosti k daptomycinu mají podíl také mutace v genech *gdpD* a *cls*, které mají vliv na regulaci metabolismu fosfolipidů a pravděpodobně mohou aktivovat systém LiaFSR. Gen *gdpD* kóduje protein s funkcí glycerofosforyl diester fosfodiesterázy a gen *cls* kóduje protein s funkcí kardiolipin syntetázy (Arias et al., 2011).



Obrázek 3: **Mechanismus vzniku odolnosti k daptomycinu u bakterií rodu *Enterococcus*.** A) Buňky vykazující citlivost k daptomycinu. C-terminální doména proteinu LiaX je lokalizovaná na cytoplazmatické membráně bakterií a inhibuje systém LiaFSR. N-terminální doména je umístěná v extracelulárním prostředí buňky a je schopná vazby antibiotika či jiných léčiv. Nedochozí k expresi genů systému LiaFSR, pouze k velmi nízké expresi genů operonu *liaXYZ*. V této situaci nedochází k remodelaci buněčné membrány. B) Buňky vykazující odolnost k daptomycinu. C-terminální doména proteinu LiaX byla buď zkrácena nebo došlo k mutacím v systému LiaFSR, které vedou k nadměrné produkci proteinu LiaX do extracelulárního prostředí. Systém LiaFSR již není inhibovaný proteinem LiaX a může tak docházet k transkripci genů, které se podílí na remodelaci buněčné membrány (převzato a upraveno z Khan et al., 2019).

7. Šíření genů rezistence k antibiotikům

Důležitou roli při šíření genů rezistence k antibiotikům hraje horizontální přenos, který v některých případech umožňuje distribuci genů rezistence i mezi různými rody bakterií (Willems et al., 2005).

Hlavním mechanismem přenosu genů rezistence na antibiotika je konjugace, při které jsou dva jedinci spolu propojeni konjugačním aparátem. U rodu *Enterococcus* jsou k přenosu z velké části využívány plazmidy, které jsou ovlivňovány signálními feromony produkované buňkou příjemce. Tyto plazmidy jsou přenášeny s vysokou frekvencí, ale jejich nevýhodou je omezený rozsah hostitelů. Kmeny *E. faecalis* velmi často přenáší plazmid pCF10 kódující mobilní prvek Tn925. Na transpozonu Tn925 jsou lokalizovány *tet(M)* geny udělující mikroorganismům odolnost k tetracyklinům (Hirt et al., 2005).

K distribuci genů rezistence jsou u enterokoků dále využívány plazmidy rodiny pRUM a Inc18, které již mohou mít velký rozsah hostitelů (Freitas et al., 2013). Geny kódující odolnost k antibiotikům jsou v plazmidech lokalizované na různých transpozonech. Velmi často se nachází na transpozonu Tn1546 nebo Tn917 z rodiny Tn3. Tn1546 nese geny *vanA* rezistenčního typu a zprostředkovává tak vysokou odolnost k vankomycinu a teikoplaninu (Arthur et al., 1993). Tn917 obsahuje *ermB* geny odolnosti k makrolidům, streptograminům třídy B a linkosamidům (Shaw & Clewell, 1985).

Šíření genů rezistence může být způsobeno také konjugativními transpozony, které jsou přenášeny nezávisle na plazmidech. Nejčastěji jsou využívány transpozony rodin Tn916/Tn1545. Tn916 nese *tet(M)* geny a zprostředkovává odolnost k tetracyklinům (Bentorcha et al., 1991), Tn1545 nese *tet(M)*, *ermB* a *aph(3')-IIIa* geny a uděluje enterokokům odolnost k tetracyklinům, makrolid-linkosamid-streptograminům třídy B a kanamycinu (Cochetti et al., 2008). Mezi další konjugativní transpozony podobné Tn916 patří např. Tn6000, který nese geny *tet(S)* a kóduje odolnost na tetracykliny (Brouwer et al., 2010) a Tn1549, který nese geny operonu *vanB* a zprostředkovává odolnost k vankomycinu (Tsvetkova et al., 2010).

8. Multirezistentní izoláty populace *Enterococcus*

E. faecium společně s *E. faecalis* patří k hlavním nemocničním patogenům způsobující řadu onemocnění. Z těchto bakteriálních kmenů mohou selekcí vznikat multirezistentní izoláty odolné k více typům antibiotik (Raven et al., 2016; Willems et al., 2005).

Izoláty *E. faecium* jsou rozdělovány do dvou subpopulací A a B, které se od sebe liší místem výskytu, genomem, genetickými prvky, virulencí či patogenitou. Subpopulace A je spojená s nemocničním prostředím. Kmeny patřící do této skupiny jsou vysoce virulentní a často přenášejí geny rezistence k antibiotikům. Subpopulace B je spojená s izoláty *E. faecium* nacházející se v gastrointestinálním traktu jakožto běžný komenzální mikroorganismus (Galloway-Peña et al., 2012). Subpopulace A je dále rozdělena na podskupiny A1, A2, které se od sebe začaly vzdalovat při zvýšeném používání antibiotik. Do skupiny A1 patří kmeny *E. faecium* omezené pouze na nemocniční prostředí a kmeny A2 skupiny jsou spojené s využíváním antibiotik v zemědělství. Vzájemnou rekombinací bakterií z různých subpopulací mohou vznikat úplně nové skupiny enterokoků, které nesou shodné geny rezistence k antibiotikům (Lebreton et al., 2013).

Nejvíce rozšířené izoláty, nalezené v nemocničních zařízeních, patří k linii klonů označené jako komplex-17 *E. faecium*. Tato linie, dnes již globálně rozšířená, je zodpovědná za velkou část infekcí způsobených enterokoky. Multirezistentní kmeny komplexu-17 jsou nebezpečné především díky vysoké odolnosti k vankomycinu a ampicilinu, jakožto nejvíce využívaná antibiotika při léčbě enterokokových onemocnění (Willems et al., 2005).

Multirezistentní linie *E. faecalis*, nacházející se také v nemocničních zařízeních, jsou rozdělovány do třech linií L1, L2 a L3. Všechny tři linie umožňují přenos genů odolnosti k vankomycinu, aminoglykosidům, tetracyklinům, chloramfenikolu, trimethoprimu, makrolidům, linkosamidům a streptograminům třídy B (Raven et al., 2016).

9. Závěr

Bakterie rodu *Enterococcus*, jedny z hlavních nozokominální patogenních mikroorganismů, způsobují závažné enterokokové infekce. Tyto bakterie jsou významným rezervoárem genů rezistence k různým antibiotikům, proto je léčba enterokokových onemocnění značně omezena. Vývoj jejich odolnosti je spojen převážně s rozsáhlým používáním antibiotik v nemocničních zařízeních a také používání antibiotik či jiných antimikrobiálních látek jako součást krmiva pro hospodářská zvířata. Po dlouhodobé expozici antibiotik jsou bakterie schopny vyvinout odolnost ke konkrétním látkám. Jejich vysoká adaptabilita na nejrůznější prostředí jim umožňuje efektivně šířit odolnost k antibiotikům.

V nemocničních prostředích přispívá k šíření odolnosti časté hospitalizace pacientů, vzájemný kontakt s infikovanými osobami, infekce spojené s kloubními náhradami, katetry a transplantacemi.

Enterokoky vykazují odolnost k běžně využívaným antibiotikům jako jsou betalaktamy, glykopeptidy a aminoglykosidy. Odolnost může být vytvořena kódováním vlastních chromozomálních genů či celých signalizačních drah vedoucích k omezení účinku antibiotik, dále získáním mutací v určitých genech, a hlavně šířením nových rezistenčních genů horizontálním přenosem. Některé izoláty jako je např. komplex-17 u *E. faecium* vykazují odolnost k více druhům antibiotik.

Odolnost k betalaktamovým antibiotikům je u enterokoků nejčastěji zajišťována expresí PBPs, které se k antibiotikům vážou s nižší afinitou. Ke zvýšení míry odolnosti dochází převážně nadprodukcí nízkoafinitních PBPs nebo mutacemi v těchto proteinech. Odolnost k vysokým hladinám aminoglykosidů je způsobena expresí enzymů schopných modifikovat funkční skupiny aminoglykosidů. Nejvíce rozšířený bifunkční gen *aph(2'')-Ia-aac(6)-Ie* uděluje bakteriím rodu *Enterococcus* vysokou odolnost ke gentamicinu. Závažným problémem je stále se zvyšující míra odolnosti enterokoků k vankomycinu, která je zprostředkována převážně rezistenčními typy *vanA* a *vanB*, jejichž ligázy vytváří modifikovaný prekurzor peptidoglykanu s koncovým D-alanyl-D-laktát, ke kterému se vankomycin váže s daleko nižší afinitou.

Z důvodu neúčinnosti běžných léčiv se k léčbě VRE využívají novější antibiotika jako je chinupristin-dalfopristin, linezolid, tigecyklin a daptomycin. Bakterie rodu *Enterococcus* si postupem času vytváří odolnost i k těmto látkám a komplikují tak možnost léčby. Odolnost k chinupristinu a dalfopristinu zajišťuje u *E. faecalis* gen *lsa*, u *E. faecium* gen *mrsC*. Gen *oprA* a mutace v genech 23S rRNA hrají důležitou roli při vývoji odolnosti k linezolidu.

Nadprodukce genů *tet(L)* a *tet(M)* nebo mutace v genu *rpsJ* udělují enterokokům odolnost k tigeicyklinu a odolnost k daptomycinu je nejčastěji zajišťována regulačním systémem LiaFSR.

Stále se zvyšující výskyt rezistentních kmenů rodu *Enterococcus* může být vážným globálním problémem v budoucnu. Je proto důležité omezit používání antibiotik a také pochopit jednotlivé mechanismy vývoje odolnosti, které by mohly přispět k tvorbě dalších antimikrobiálních látek.

10. Použitá literatura

- Agersø, Y., Pedersen, A. G., & Aarestrup, F. M. (2006). Identification of Tn5397-like and Tn916-like transposons and diversity of the tetracycline resistance gene *tet(M)* in enterococci from humans, pigs and poultry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(5), 832–839.
- Al-Obeid, S., Collatz, E., & Gutmann, L. (1990). Mechanism of resistance to vancomycin in *Enterococcus faecium* D366 and *Enterococcus faecalis* A256. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(2), 252–256.
- Alam, M. M., Kobayashi, N., Ishino, M., Sumi, A., Kobayashi, K.-I., Uehara, N., & Watanabe, N. (2005). Detection of a novel *aph(2'')* allele (*aph[2'']-Ie*) conferring high-level gentamicin resistance and a spectinomycin resistance gene *ant(9)-Ia* (*aad9*) in clinical isolates of enterococci. *Microbial Drug Resistance*, 11(3), 239–247.
- Allen, N. E., Hobbs, J. N., Richardson, J. M., & Riggin, R. M. (1992). Biosynthesis of modified peptidoglycan precursors by vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiology Letters*, 98(1–3), 109–116.
- Antonelli, A., D'Andrea, M. M., Brenciani, A., Galeotti, C. L., Morroni, G., Pollini, S., Varaldo, P. E., & Rossolini, G. M. (2018). Characterization of *poxTA*, a novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(7), 1763–1769. <https://doi.org/10.1093/jac/dky088>
- Arbeloa A., Segal, H., Hugonnet, J. E., Josseaume, N., Dubost, L., Brouard, J., Gutmann, L., Mengin-Lecreulx, D., & Arthur, M. (2004). Role of class A penicillin-binding proteins in PBP5-mediated β -lactam resistance in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 186(5), 1221–1228.
- Arias, C. A., Courvalin, P., & Reynolds, P. E. (2000). *VanC* cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), 1660–1666.
- Arias, C. A., Panesso, D., McGrath, D. M., Qin, X., Mojica, M. F., Miller, C., Diaz, L., Tran, T. T., Rincon, S., Barbu, E. M., Reyes, J., Roh, J. H., Lobos, E., Soderger, E., Pasqualini, R., Arap, W., Quinn, J. P., Shamoo, Y., Murray, B. E., & Weinstock, G. M. (2011). Genetic basis for in vivo daptomycin resistance in enterococci. *The New England Journal of Medicine*, 365, 892–900.
- Arlas, C. A., Martin-Martinez, M., Blundell, T. L., Arthur, M., Courvalin, P., & Reynolds, P. E. (1999). Characterization and modelling of VanT: A novel, membrane-bound, serine racemase from vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Molecular Microbiology*, 31(6), 1653–1664.

- Arthur, M., Depardieu, F., Gerbaud, G., Galimand, M., Leclercq, R., & Courvalin, P. (1997). The VanS sensor negatively controls VanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction. *Journal of Bacteriology*, 179(1), 97–106.
- Arthur, M., Depardieu, F., Molinas, C., Reynolds, P., & Courvalin, P. (1995). The *vanZ* gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin. *Gene*, 154(1), 87–92.
- Arthur, M., Depardieu, F., Reynolds, P., & Courvalin, P. (1996). Quantitative analysis of the metabolism of soluble cytoplasmic peptidoglycan precursors of glycopeptide-resistant enterococci. *Molecular Microbiology*, 21(1), 33–44.
- Arthur, M., Depardieu, F., Snaith, H. A., Reynolds, P. E., & Courvalin, P. (1994). Contribution of *vanY* D,D-carboxypeptidase to glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* by hydrolysis of peptidoglycan precursors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(9), 1899–1903.
- Arthur, M., Molinas, C., & Courvalin, P. (1992). The VanS-VanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *Journal of Bacteriology*, 174(8), 2582–2591.
- Arthur, M., Molinas, C., Depardieu, F., & Courvalin, P. (1993). Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *Journal of Bacteriology*, 175(1), 117–127.
- Arthur, M., Molinas, C., Dutka-Malen, S., & Courvalin, P. (1991). Structural relationship between the vancomycin resistance protein VanH and 2-hydroxycarboxylic acid dehydrogenases. *Gene*, 103(1), 133–134.
- Bentorcha, F., De Cespedes, G., & Horaud, T. (1991). Tetracycline resistance heterogeneity in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(5), 808–812.
- Billot-Klein, D., Gutmann, L., Sable, S., Guittet, E., & Van Heijenoort, J. (1994). Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level vancomycin-resistant VANB-type enterococcus D366 and of the naturally glycopeptide-resistant species *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Enterococcus gallinarum*. *Journal of Bacteriology*, 176(8), 2398–2405.
- Boyd, D. A., Willey, B. M., Fawcett, D., Gillani, N., & Mulvey, M. R. (2008). Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, *vanL*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(7), 2667–2672.
- Brouwer, M. S. M., Mullany, P., & Roberts, A. P. (2010). Characterization of the conjugative transposon Tn6000 from *Enterococcus casseliflavus* 664.1H1 (formerly *Enterococcus faecium* 664.1H1). *FEMS Microbiology Letters*, 309(1), 71–76.

- Bugg, T. D. H., Dutka-Malen, S., Arthur, M., Courvalin, P., & Walsh, C. T. (1991). Identification of vancomycin resistance protein VanA as a D-alanine:D-alanine ligase of altered substrate specificity. *Biochemistry*, *30*(8), 2017–2021.
- Bugg, T. D. H., Wright, G. D., Dutka-Malen, S., Arthur, M., Courvalin, P., & Walsh, C. T. (1991). Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry*, *30*(43), 10408–10415.
- Carias, L. L., Rudin, S. D., Donskey, C. J., & Rice, L. B. (1998). Genetic linkage and cotransfer of a novel, *vanB*-containing transposon (Tn5382) and a low-affinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolate. *Journal of Bacteriology*, *180*(17), 4426–4434.
- Carlier, C., & Courvalin, P. (1990). Emergence of 4',4''-aminoglycoside nucleotidyltransferase in enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *34*(8), 1565–1569.
- Cattoir, V., Isnard, C., Cosquer, T., Odhiambo, A., Bucquet, F., Guérin, F., & Giard, J. C. (2015). Genomic analysis of reduced susceptibility to tigecycline in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(1), 239–244.
- Charpentier, E., Gerbaud, G., & Courvalin, P. (1994). Presence of the *listeria* tetracycline resistance gene *tet(S)* in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *38*(10), 2330–2335.
- Chen, H., Wu, W., Ni, M., Liu, Y., Zhang, J., Xia, F., He, W., Wang, Q., Wang, Z., Cao, B., & Wang, H. (2013). Linezolid-resistant clinical isolates of enterococci and *Staphylococcus cohnii* from a multicentre study in China: molecular epidemiology and resistance mechanisms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *42*(4), 317–321.
- Chow, J. W., Zervos, M. J., Lerner, S. A., Thal, L. A., Donabedian, S. M., Jaworski, D. D., Tsai, S., Shaw, K. J., & Clewell, D. B. (1997). A novel gentamicin resistance gene in *Enterococcus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *41*(3), 511–514.
- Cochetti, I., Tili, E., Mingoia, M., Varaldo, P. E., & Montanari, M. P. (2008). *Erm(B)*-carrying elements in tetracycline-resistant pneumococci and correspondence between Tn1545 and Tn6003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *52*(4), 1285–1290.
- Combes, T., Carlier, C., & Courvalin, P. (1983). Aminoglycoside-modifying enzyme content of a multiply resistant strain of *Streptococcus faecalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *11*(1), 41–47.
- Comenge, Y., Quintiliani, R., Li, L., Dubost, L., Brouard, J. P., Hugonnet, J. E., & Arthur, M. (2003). The CroRS two-component regulatory system is required for intrinsic β -lactam resistance in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, *185*(24), 7184–7192.

- Conceição, N., da Silva, L. E. P., da Costa Darini, A. L., Pitondo-Silva, A., & de Oliveira, A. G. (2014). Penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* of hospital origin: *pbp4* gene polymorphism and genetic diversity. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 289–295.
- Costa, Y., Galimand, M., Leclercq, R., Duval, J., & Courvalin, P. (1993). Characterization of the chromosomal *aac(6')-Ii* gene specific for *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(9), 1896–1903.
- Courvalin, P., Carlier, C., & Collatz, E. (1980). Plasmid-mediated resistance to aminocyclitol antibiotics in group D streptococci. *Journal of Bacteriology*, 143(2), 541–551.
- Coyette, J., Ghuysen, J. M., & Fontana, R. (1980). The Penicillin-Binding Proteins in *Streptococcus faecalis* ATCC 9790. *European Journal of Biochemistry*, 110(2), 445–456.
- Depardieu, F., Bonora, M. G., Reynolds, P. E., & Courvalin, P. (2003). The *vanG* glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. *Molecular Microbiology*, 50(3), 931–948.
- Desbonnet, C., Tait-Kamradt, A., Garcia-Solache, M., Dunman, P., Coleman, J., Arthur, M., & Rice, L. B. (2016). Involvement of the eukaryote-like kinase-phosphatase system and a protein that interacts with penicillin-binding protein 5 in emergence of cephalosporin resistance in cephalosporin-sensitive class A penicillin-binding protein mutants in *Enterococcus faecium*. *MBio*, 7(2), 1–10.
- Deshpande, L. M., Ashcraft, D. S., Kahn, H. P., Pankey, G., Jones, R. N., Farrell, D. J., & Mendes, R. E. (2015). Detection of a new *cfr*-like gene, *cfr(B)*, in *Enterococcus faecium* isolates recovered from human specimens in the United States as part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10), 6256–6261.
- Diaz, L., Tran, T. T., Munita, J. M., Miller, W. R., Rincon, S., Carvajal, L. P., Wollam, A., Reyes, J., Panesso, D., Rojas, N. L., Shamoo, Y., Murray, B. E., Weinstock, G. M., & Arias, C. A. (2014). Whole-genome analyses of *Enterococcus faecium* isolates with diverse daptomycin MICs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(8), 4527–4534.
- Duez, C., Zorzi, W., Sapunovic, F., Amoroso, A., Thamm, I., & Coyette, J. (2001). The penicillin resistance of *Enterococcus faecalis* JH2-2r results from an overproduction of the low-affinity penicillin-binding protein PBP4 and does not involve a *psr*-like gene. *Microbiology*, 147(9), 2561–2569.
- Dutka-Malen, S., Leclercq, R., Coutant, V., Duval, J., & Courvalin, P. (1990). Phenotypic and genotypic heterogeneity of glycopeptide resistance determinants in gram-positive bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(10), 1875–1879.
- Dutka-Malen, S., Molinas, C., Arthur, M., & Courvalin, P. (1990). The VANA glycopeptide resistance protein is related to D-alanyl-D-alanine ligase cell wall biosynthesis enzymes. *MGG Molecular & General Genetics*, 224(3), 364–372.

- Eliopoulos, G. M., Farber, B. F., Murray, B. E., Wennersten, C., & Moellering, R. C. (1984). Ribosomal resistance of clinical enterococcal to streptomycin isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 25(3), 398–399.
- Enne, V. I., Delsol, A. A., Roe, J. M., & Bennett, P. M. (2004). Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2), 203–207.
- Evers, S., & Courvalin, P. (1996). Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanSB-VanRB two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *Journal of Bacteriology*, 178(5), 1302–1309.
- Evers, S., Reynolds, P. E., & Courvalin, P. (1994). Sequence of the *vanB* and *ddl* genes encoding D-alanine:D-lactate and D-alanine:D-alanine ligases in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* V583. *Gene*, 140, 97–102.
- Ferretti, J. J., Gilmore, K. S., & Courvalin, P. (1986). Nucleotide sequence analysis of the gene specifying the bifunctional 6'-aminoglycoside acetyltransferase 2''-aminoglycoside phosphotransferase enzyme in *Streptococcus faecalis* and identification and cloning of gene regions specifying the two activities. *Journal of Bacteriology*, 167(2), 631–638.
- Fiedler, S., Bender, J. K., Klare, I., Halbedel, S., Grohmann, E., Szewzyk, U., & Werner, G. (2016). Tigecycline resistance in clinical isolates of *Enterococcus faecium* is mediated by an upregulation of plasmid-encoded tetracycline determinants *tet(L)* and *tet(M)*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(4), 871–881.
- Fines, M., Perichon, B., Reynolds, P., Sahm, D. F., & Courvalin, P. (1999). VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(9), 2161–2164.
- Fontana, R., Cerini, R., Longoni, P., Grossato, A., & Canepari, P. (1983). Identification of a streptococcal penicillin-binding protein that reacts very slowly with penicillin. *Journal of Bacteriology*, 155(3), 1343–1350.
- Freitas, A. R., Novais, C., Tedim, A. P., Francia, M. V., Baquero, F., Peixe, L., & Coque, T. M. (2013). Microevolutionary events involving narrow host plasmids influences local fixation of vancomycin-resistance in *Enterococcus* populations. *PLoS ONE*, 8(3), 1–11.
- Galimand, M., Schmitt, E., Panvert, M., Desmolaize, B., Douthwaite, S., Mechulam, Y., & Courvalin, P. (2011). Intrinsic resistance to aminoglycosides in *Enterococcus faecium* is conferred by the 16S rRNA m5C1404-specific methyltransferase EfmM. *Rna*, 17(2), 251–262.
- Galloway-Peña, J., Roh, J. H., Latorre, M., Qin, X., & Murray, B. E. (2012). Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium*. *PLoS ONE*, 7(1).

- Guerin, F., Sassi, M., Dejoies, L., Zouari, A., Schutz, S., Potrel, S., Auzou, M., Collet A., Lecointe, D., Auger, G., & Cattoir, V. (2020). Molecular and functional analysis of the novel *cfr(D)* linezolid resistance gene identified in *Enterococcus faecium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(7), 1–5.
- Handwerger, S., Pucci, M. J., Volk, K. J., Liu, J., & Lee, M. S. (1992). The cytoplasmic peptidoglycan precursor of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* terminates in lactate. *Journal of Bacteriology*, 174(18), 5982–5984.
- Hirt, H., Manias, D. A., Bryan, E. M., Klein, J. R., Marklund, J. K., Staddon, J. H., Paustian, M. L., Kapur, V., & Dunny, G. M. (2005). Characterization of the pheromone response of the *Enterococcus faecalis* conjugative plasmid pCF10: Complete sequence and comparative analysis of the transcriptional and phenotypic responses of pCF10-containing cells to pheromone induction. *Journal of Bacteriology*, 187(3), 1044–1054.
- Hodel-Christian, S. L., & Murray, B. E. (1991). Characterization of the gentamicin resistance transposon Tn5281 from *Enterococcus faecalis* and comparison to staphylococcal transposons Tn4001 and Tn4031. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(6), 1147–1152.
- *Hollenbeck, B. L., & Rice, L. B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*, 3(5), 421–569.
- Hollingshead, S., & Vapnek, D. (1985). Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenylyltransferase. *Plasmid*, 13(1), 17–30.
- Jensen, L. B., Frimodt-Møller, N., & Aarestrup, F. M. (1999). Presence of *erm* gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 151–158.
- *Jensen, L. B., Hammerum, A. M., Aarestrup, F. M., Van den Bogaard, A. E., & Stobberingh, E. E. (1998). Occurrence of *satA* and *vgb* genes in streptogramin-resistant *Enterococcus faecium* isolates of animal and human origins in The Netherlands [2]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(12), 3330–3331.
- Jung, Y. H., Shin, E. S., Kim, O., Yoo, J. S., Lee, K. M., Yoo, J. I., Chung, G. T., & Lee, Y. S. (2010). Characterization of two newly identified genes, *vgaD* and *vatG*, conferring resistance to streptogramin a in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), 4744–4749.
- Kao, S. J., You, I., Clewell, D. B., Donabedian, S. M., Zervos, M. J., Petrin, J., Shaw, K. J., & Chow, J. W. (2000). Detection of the high-level aminoglycoside resistance gene *aph(2'')-Ib* in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(10), 2876–2879.
- Kellogg, S. L., & Kristich, C. J. (2018). Convergence of PASTA kinase and two-component signaling in response to cell wall stress in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 200(12), 1–14.

- Kellogg, S. L., Little, J. L., Hoff, J. S., & Kristich, C. J. (2017). Requirement of the CroRS two-component system for resistance to cell wall-targeting antimicrobials in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(5), 1–11.
- Khan, A., Davlieva, M., Panesso, D., Rincon, S., Miller, W. R., Diaz, L., Reyes, J., Cruz, M. R., Pemberton, O., Nguyen, A. H., Siegel, S. D., Planet, P. J., Narechania, A., Latorre, M., Rios, R., Singh, K. V., Ton-That, H., Garsin, D. A., Tran, T. T., Shamo, Y., & Arias, C. A. (2019). Antimicrobial sensing coupled with cell membrane remodeling mediates antibiotic resistance and virulence in *Enterococcus faecalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(52), 26925–26932.
- Kloss, P., Xiong, L., Shinabarger, D. L., & Mankin, A. S. (1999). Resistance mutations in 23 S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *Journal of Molecular Biology*, *294*(1), 93–101.
- *Kotra, L. P., Haddad, J., & Mobashery, S. (2000). Aminoglycosides: Perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *44*(12), 3249–3256.
- Kristich, C. J., Wells, C. L., & Dunny, G. M. (2007). A eukaryotic-type Ser/Thr kinase in *Enterococcus faecalis* mediates antimicrobial resistance and intestinal persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(9), 3508–3513.
- Kristich, C. J., Little, J. L., Hall, C. L., & Hoff, J. S. (2011). Reciprocal regulation of cephalosporin resistance in *Enterococcus faecalis*. *MBio*, *2*(6), 1–9.
- Krogstad, D. J., Korfhagen, T. R., Moellering, R. C., Wennersten, C., & Swartz, M. N. (1978). Aminoglycoside-inactivating enzymes in clinical isolates of *Streptococcus faecalis*. An explanation for resistance to antibiotic synergism. *Journal of Clinical Investigation*, *62*(2), 480–486.
- Lebreton, F., Depardieu, F., Bourdon, N., Fines-Guyon, M., Berger, P., Camiade, S., Leclercq, R., Courvalin, P., & Cattoir, V. (2011). D-Ala-D-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(10), 4606–4612.
- Lebreton, F., van Schaik, W., McGuire, A. M., Godfrey, P., Griggs, A., Mazumdar, V., Corander, J., Cheng, L., Saif, S., Young, S., Zeng, Q., Wortman, J., Birren, B., Willems, R. J. L., Earl, A. M., & Gilmore, M. S. (2013). Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. *MBio*, *4*(4), 1–10.
- Leclercq, R., Duval, J. D., & Courvalin, P. (1988). Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *The New England Journal of Medicine*, *319*(3), 157–161.
- Ligozzi, M., Pittaluga, F., & Fontana, R. (1993). Identification of a genetic element (*psr*) which negatively controls expression of *Enterococcus hirae* penicillin-binding protein 5. *Journal of Bacteriology*, *175*(7), 2046–2051.

- Ligozzi, M., Pittaluga, F., & Fontana, R. (1996). Modification of penicillin-binding protein 5 associated with high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *40*(2), 354–357.
- Liu, Y., Wang, Y., Wu, C., Shen, Z., Schwarz, S., Du, X. D., Dai, L., Zhang, W., Zhang, Q., & Shen, J. (2012). First report of the multidrug resistance gene *cfr* in *Enterococcus faecalis* of animal origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(3), 1650–1654.
- Llano-Sotelo, B., Azucena, E. F., Kotra, L. P., Mobashery, S., & Chow, C. S. (2002). Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to the bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site. *Chemistry and Biology*, *9*(4), 455–463.
- Marshall, S. H., Donskey, C. J., Hutton-Thomas, R., Salata, R. A., & Rice, L. B. (2002). Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(10), 3334–3336.
- Mederski Samoraj, B. D., & Murray, B. E. (1983). High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of enterococci. *Journal of Infectious Diseases*, *147*(4), 751–757.
- *Mercuro, N. J., Davis, S. L., Zervos, M. J., & Herc, E. S. (2018). Combatting resistant enterococcal infections: a pharmacotherapy review. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *19*(9), 979–992.
- Messer, J., & Reynolds, P. E. (1992). Modified peptidoglycan precursors produced by glycopeptide-resistant enterococci. *FEMS Microbiology Letters*, *94*(1–2), 195–200.
- Miller, W. R., Tran, T. T., Diaz, L., Rios, R., Khan, A., Reyes, J., Prater, A. G., Panesso, D., Shamoo, Y., & Arias, C. A. (2019). LiaR-independent pathways to daptomycin resistance in *Enterococcus faecalis* reveal a multilayer defense against cell envelope antibiotics. *Molecular Microbiology*, *111*(3), 811–824.
- Moellering, R. C., & Weinberg, A. N. (1971). Studies on antibiotic synergism against enterococci. *Journal of Clinical Investigation*, *50*(12), 2580–2584.
- Müller, A., Wenzel, M., Strahl, H., Grein, F., Saaki, T. N. V., Kohl, B., Siersma, T., Bandow, J. E., Sahl, H. G., Schneider, T., & Hamoen, L. W. (2016). Daptomycin inhibits cell envelope synthesis by interfering with fluid membrane microdomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(45), E7077–E7086.
- Murray, B. E., Mederski-Samoraj, M., Foster, S. K., Brunton, J. L., & Harford, P. (1986). In vitro studies of plasmid-mediated penicillinase from *Streptococcus faecalis* suggest a staphylococcal origin. *Journal of Clinical Investigation*, *77*(1), 289–293.
- Navarro, F., & Courvalin, P. (1994). Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *38*(8), 1788–1793.
- Nieto, M., & Perkins, H. R. (1971). Modifications of the acyl-D-alanyl-D-alanine terminus affecting complex-formation with vancomycin. *The Biochemical Journal*, *123*(5), 789–803.

- Ono, S., Muratani, T., & Matsumoto, T. (2005). Mechanisms of resistance to imipenem and ampicillin in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2954–2958.
- Ounissi, H., Derlot, E., Carlier, C., & Courvalin, P. (1990). Gene homogeneity for aminoglycoside-modifying enzymes in gram-positive cocci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(11), 2164–2168.
- Parent, R., & Roy, P. H. (1992). The chloramphenicol acetyltransferase gene of Tn2424: A new breed of cat. *Journal of Bacteriology*, 174(9), 2891–2897.
- Patterson, J. E., Sweeney, A. H., Simms, M., Carley, N., Mangi, R., Sabetta, J., & Lyons, R. W. (1995). An analysis of 110 serious enterococcal infections: epidemiology, antibiotic susceptibility, and outcome. *Medicine (United States)*, 74(4), 191–200.
- Perichon, B., Reynolds, P., & Courvalin, P. (1997). VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(9), 2016–2018.
- Peyvasti, S. V., Mobarez, M. A., Shahcheraghi, F., Khoramabadi, N., Rahmati, R. N., & Doust, H. R. (2020). High-level aminoglycoside resistance and distribution of aminoglycoside resistance genes among *Enterococcus spp.* clinical isolates in Tehran, Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 20, 318–323.
- Portillo, A., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M., Alonso, A., Martinez, J. L., & Torres, C. (2000). Macrolide resistance genes in *Enterococcus spp.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(4), 967–971.
- Quintiliani, R., & Courvalin, P. (1996). Characterization of Tn1547, a composite transposon flanked by the IS16 and IS256-like elements, that confers vancomycin resistance in *Enterococcus faecalis* BM4281. *Gene*, 172(1), 1–8.
- Raven, K. E., Reuter, S., Gouliouris, T., Reynolds, R., Russell, J. E., Brown, N. M., Török, M. E., Parkhill, J., & Peacock, S. J. (2016). Genome-based characterization of hospital-adapted *Enterococcus faecalis* lineages. *Nature Microbiology*, 1(3), 1–18.
- Rende-Fournier, R., Leclercq, R., Galimand, M., Duval, J., & Courvalin, P. (1993). Identification of the *satA* gene encoding a streptogramin A acetyltransferase in *Enterococcus faecium* BM4145. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(10), 2119–2125.
- Reynolds, P. E., Arias, C. A., & Courvalin, P. (1999). Gene *vanXY(c)* encodes D,D-dipeptidase (VanX) and D,D-carboxypeptidase (VanY) activities in vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Molecular Microbiology*, 34(2), 341–349.
- Reynolds, P. E., Depardieu, F., Dutka-Malen, S., Arthur, M., & Courvalin, P. (1994). Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon Tn1546 requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. *Molecular Microbiology*, 13(6), 1065–1070.

- Reynolds, P. E., Snaith, H. A., Maguire, A. J., Dutka-Malen, S., & Courvalin, P. (1994). Analysis of peptidoglycan precursors in vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Biochemical Journal*, *301*(1), 5–8.
- Rice, L. B., Bellais, S., Carias, L. L., Hutton-Thomas, R., Bonomo, R. A., Caspers, P., Page, M. G. P., & Gutmann, L. (2004). Impact of specific *pbp5* mutations on expression of β -lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(8), 3028–3032.
- Rice, L. B., Carias, L. L., Rudin, S., Hutton, R., Marshall, S., Hassan, M., Josseume, N., Dubost, L., Marie, A., & Arthur, M. (2009). Role of class A penicillin-binding proteins in the expression of β -lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *Journal of Bacteriology*, *191*(11), 3649–3656.
- Rice, L. B., Eliopoulos, G. M., Wennersten, C., Goldmann, D., Jacoby, G. A., & Moellering, R. C. (1991). Chromosomally mediated β -lactamase production and gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *35*(2), 272–276.
- Ruiz-Ripa, L., Feßler, A. T., Hanke, D., Eichhorn, I., Azcona-Gutiérrez, J. M., Pérez-Moreno, M. O., Seral, C., Aspiroz, C., Alonso, C. A., Torres, L., Alós, J. I., Schwarz, S., & Torres, C. (2020). Mechanisms of linezolid resistance among enterococci of clinical origin in Spain—detection of *optrA*- and *cfr(D)*-carrying *E. faecalis*. *Microorganisms*, *8*(8), 1–17.
- Rybkin, T., Mainardi, J. L., Sougakoff, W., Collatz, E., & Gutmann, L. (1998). Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of β -lactam resistance. *Journal of Infectious Diseases*, *178*(1), 159–163.
- Shaw, J. H., & Clewell, D. B. (1985). Complete nucleotide sequence of macrolide-linkosamide-streptogramin B-resistance transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, *164*(2), 782–796.
- Shlaes, D. M., Al-Obeid, S., Shlaes, J. H., Boisivon, A., & Williamson, R. (1989). Inducible, transferable resistance to vancomycin in *Enterococcus faecium*, D399. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *23*, 503–508.
- Shlaes, D. M., Bouvet, A., Devine, C., Shlaes, J. H., Al-Obeid, S., & Williamson, R. (1989). Inducible, transferable resistance to vancomycin in *Enterococcus faecalis* A256. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *33*(2), 198–203.
- Singh, K. V., Weinstock, G. M., & Murray, B. E. (2002). An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(6), 1845–1850.
- Tanimoto, K., & Ike, Y. (2008). Complete nucleotide sequencing and analysis of the 65-kb highly conjugative *Enterococcus faecium* plasmid pMG1: Identification of the transfer-related region and the minimum region required for replication. *FEMS Microbiology Letters*, *288*(2), 186–195.

- Tankovic, J., Mahjoubi, F., Courvalin, P., Duval, J., & Leclercq, R. (1996). Development of fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis* and role of mutations in the DNA gyrase *gyrA* gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(11), 2558–2561.
- Trieu-Cuot, P., & Courvalin, P. (1983). Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'5''-aminoglycoside phosphotransferase type III. *Gene*, 23(3), 331–341.
- Tsai, S. F., Zervos, M. J., Clewell, D. B., Donabedian, S. M., Sahm, D. F., & Chow, J. W. (1998). A new high-level gentamicin resistance gene, *aph(2'')*-Id, in *Enterococcus spp.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(5), 1229–1232.
- Tsvetkova, K., Marvaud, J. C., & Lambert, T. (2010). Analysis of the mobilization functions of the vancomycin resistance transposon Tn1549, a member of a new family of conjugative elements. *Journal of Bacteriology*, 192(3), 702–713.
- Vesić, D., & Kristich, C. J. (2012). MurAA is required for intrinsic cephalosporin resistance of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(5), 2443–2451.
- Wang, Y., Lv, Y., Cai, J., Schwarz, S., Cui, L., Hu, Z., Zhang, R., Li, J., Zhao, Q., He, T., Wang, D., Wang, Z., Shen, Y., Li, Y., Feßler, A. T., Wu, C., Yu, H., Deng, X., Xia, X., & Shen, J. (2015). A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(8), 2182–2190.
- Werner, G., & Witte, W. (1999). Characterization of a new enterococcal gene, *satG*, encoding a putative acetyltransferase conferring resistance to streptogramin A compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(7), 1813–1814.
- Willems, R. J. L., Top, J., Van Santen, M., Robinson, D. A., Coque, T. M., Baquero, F., Grundmann, H., & Bonten, M. J. M. (2005). Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerging Infectious Diseases*, 11(6), 821–828.
- Williamson, R., Calderwood, S. B., Moellering, R. C., & Tomasz, A. (1983). Studies on the mechanism of intrinsic resistance to β -lactam antibiotics in group D streptococci. *Journal of General Microbiology*, 129(3), 813–822.
- Wilson, D. N., Schlutzen, F., Harms, J. M., Starosta, A. L., Connell, S. R., & Fucini, P. (2008). The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), 13339–13344.
- Wright, G. D., Molinas, C., Arthur, M., Courvalin, P., & Walsh, C. T. (1992). Characterization of VanY, a DD-carboxypeptidase from vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* BM4147. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(7), 1514–1518.

- Xu, X., Lin, D., Yan, G., Ye, X., Wu, S., Guo, Y., Zhu, D., Hu, F., Zhang, Y., Wang, F., Jacoby, G. A., & Wang, M. (2010). *VanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), 4643–4647.
- Zimmermann, R. A., Moellering, R. C., & Weinberg, A. N. (1971). Mechanism of resistance to antibiotic synergism in enterococci. *Journal of Bacteriology*, 105(3), 873–879.
- Zorzi, W., Zhou, X. Y., Dardenne, O., Lamotte, J., Raze, D., Pierre, J., Gutmann, L., & Coyette, J. (1996). Structure of the low-affinity penicillin-binding protein 5 PBP5_{fm} in wild-type and highly penicillin-resistant strains of *Enterococcus faecium*. *Journal of Bacteriology*, 178(16), 4948–4957.
- Zscheck, K. K., & Murray, B. E. (1991). Nucleotide sequence of the β -lactamase gene from *Enterococcus faecalis* HH22 and its similarity to staphylococcal β -lactamase genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(9), 1736–1740.
- Zscheck, K. K., & Murray, B. E. (1993). Genes involved in the regulation of β -lactamase production in enterococci and staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(9), 1966–1970.