

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program:
Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor:
Molekulární biologie a biochemie organismů



Barbora Kozická

Rezistence k antibiotikům u klinicky významných kmenů rodu *Enterococcus*
Antibiotic resistance in clinically important strains of *Enterococcus* spp.

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Denisa Petráčková, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

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

V Praze, 22. 8. 2013

.....

Děkuji RNDr. Denise Petráčkové, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce a za cenné připomínky a rady.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Charakteristika rodu <i>Enterococcus</i>	2
2.1. Základní charakteristika a fyziologie	2
2.2. Rozšíření rodu <i>Enterococcus</i>	2
2.2.1. Výskyt rodu <i>Enterococcus</i> v potravinách.....	2
2.2.2. <i>Enterococcus</i> jako probiotika	3
2.2.3. Klinický význam rodu <i>Enterococcus</i>	3
3. Rezistence	5
3.1. Rezistence u rodu <i>Enterococcus</i>	5
3.1.1. Přirozené rezistence u rodu <i>Enterococcus</i>	5
3.1.2. Získané rezistence u rodu <i>Enterococcus</i>	6
4. Rezistence k vankomycinu	8
4.1. Charakteristika vankomycinu	8
4.2. Mechanismus účinku vankomycinu	8
4.3. Mechanismus rezistence k vankomycinu	9
4.4. Typy rezistence k vankomycinu	10
4.5. Systém regulace rezistence k vankomycinu	12
4.6. Vývoj rezistence k vankomycinu	12
5. Rezistence k linezolidu.....	15
5.1. Charakteristika linezolidu.....	15
5.2. Mechanismus účinku linezolidu	15
5.3. Mechanismus rezistence k linezolidu	16
5.4. Vývoj rezistence k linezolidu	18
6. Závěr.....	19
7. Seznam literatury.....	21

Abstrakt

Rod *Enterococcus* je běžnou součástí mikroflóry zažívacího traktu, bývá využíván v potravinářství a je přidáván i do probiotik, ale v posledních několika desetiletích se dostává do popředí zejména jako původce nosokomiálních onemocnění. Jeho význam roste se zvyšující se rezistencí k antibiotikům. *Enterococcus* je přirozeně rezistentní k řadě antibiotik a mutacemi nebo horizontálním přenosem genů může získávat další rezistenční determinanty. Největší klinický význam mají *Enterococcus faecium* a *Enterococcus faecalis*, proto se tato práce zaměřuje na přirozené i získané rezistence těchto dvou kmenů. Největší pozornost je v práci věnována rezistenci k antibiotikům vankomycin a linezolid. Vankomycin představoval po několik desetiletí poslední možnost léčby při selhání obvykle užívaných antibiotik, ale rychle se šířící rezistence k tomuto antibiotiku znamenala velký problém. Antibiotikum linezolid bylo vyvinuto jako odpověď na rostoucí rezistenci k dostupným antibiotikům u gram pozitivních bakterií obecně a účinně působí proti vankomycin-rezistentním kmenům *E. faecium* a *E. faecalis*.

Klíčová slova: rezistence, linezolid, vankomycin, *Enterococcus*, cílové místo

Abstract

The *Enterococcus* spp. is a common part of microflora in the digestive tract; it is used in the food industry and added to probiotics. However, in the last few decades it comes to the fore particularly as a cause of nosocomial diseases. Its importance grows with its increasing resistance to antibiotics. The *Enterococcus* is intrinsically resistant to many types of antibiotics. In addition to that it may acquire additional resistance determinants by mutations or horizontal gene transfer. This work focuses on the *Enterococcus faecium* and the *Enterococcus faecalis* intrinsic and acquired resistances, as these two strains have the major clinical importance. In this work, the most attention is dedicated to the antibiotics vancomycin and linezolid. For several decades, vancomycin was the last treatment option in the case of a failure of commonly used antibiotics. The fact that the resistance to this antibiotic was spreading rapidly became a significant problem in these cases of treatment. Hence the antibiotic linezolid was developed as a response to the growing resistance of gram-positive bacteria to available antibiotics. It is also proved to be effective against the vancomycin-resistant strains *E. faecium* and *E. faecalis*.

Keywords: resistance, linezolid, vancomycin, *Enterococcus*, target structure

1. Úvod

Enterococcus je široce rozšířená bakterie, nachází se běžně v půdě, ve vodě, na rostlinách, i v průmyslově zpracovaných potravinách. Za klinicky významné kmeny rodu *Enterococcus* jsou považovány *Enterococcus faecium* a *Enterococcus faecalis*, které jsou přirozenou součástí střevní mikrobioty lidí i zvířat, ale také příčinou závažných nosokomiálních infekcí, jež postihují zejména oslabené (imunosuprimované) pacienty.

Klinické prostředí potlačuje růst citlivých bakterií, čímž zvýhodňuje rezistentní kmeny a navíc poskytuje příležitost pro šíření bakterií. Paradoxně v klinickém prostředí dochází k vyselektování nebezpečných rezistentních kmenů, které komplikují léčbu hospitalizovaných pacientů, oslabených jinou chorobou či chirurgickým zákrokem. Rod *Enterococcus* je přirozeně odolný vůči vysoké teplotě a řadě dezinfekčních látek, proto v nemocnicích snadno přežívá a rychle se šíří mezi pacienty. Roku 2008 byly *E. faecium* a *E. faecalis* prohlášeny za třetí celosvětově nejrozšířenější nosokomiálními patogeny, v závěsu za koaguláza-negativním *Staphylococcus* a *Staphylococcus aureus* (Hidron et al. 2008).

Stoupající bakteriální rezistence k antibiotikům obecně je vnímána jako velký problém, proto jsou vydávána přísná opatření ohledně předepisování antibiotik, omezení možnosti šíření rezistentních kmenů nosokomiální cestou a omezení selekčního tlaku antibiotik v zemědělství. Ale i přes to je třeba neustále vyvíjet nové účinné látky, nejlépe co nejvíc odlišné od těch již používaných.

Předmětem této práce je shrnout podstatu a současný stav rezistence *E. faecium* a *E. faecalis* ke klinicky významným antibiotikům, se zaměřením na dva aktuálně nejužívanější léky – vankomycin a linezolid.

Vankomycin byl po dlouhou dobu antibiotikem poslední volby při infekcích způsobených bakteriemi *Enterococcus*. Byl aplikován až při selhání obvykle užívaných antibiotik (peniciliny, aminoglykosidy), proto je rychlý vzestup rezistence k vankomycinu v centru zájmu odborníků. Tato práce popisuje vývoj rezistence k vankomycinu, mechanismus účinku antibiotika i způsob, jakým bakterie vyvíjí rezistenci.

V reakci na rostoucí rezistenci u grampozitivních bakterií obecně byl vyvinut linezolid, první klinicky aplikované antibiotikum třídy oxazolidinonů. Linezolid nahradil vankomycin v jeho pozici „léku poslední volby“ a je s úspěchem používán při léčbě infekcí způsobených vankomycin-rezistentními kmeny rodu *Enterococcus* (VRE). Přesto se v současnosti začínají objevovat kmeny *E. faecium* rezistentní k oběma antibiotikům a jsou hledána nová řešení kombinací antibiotik či vývojem nových účinných látek.

2. Charakteristika rodu *Enterococcus*

2.1. Základní charakteristika a fyziologie

Rod *Enterococcus* jsou grampozitivní, kataláza-negativní, nesporulující, fakultativně anaerobní bakterie a patří mezi bakterie mléčného kvašení (lactic acid bacteria). Tvoří jednotlivé koky, diplokoky, také se vyskytují ve shlucích nebo krátkých řetízcích (Foulquie Moreno et al. 2006).

Enterococcus jsou termofilní a neutrofilní bakterie. Teplotní optimum pro růst bakterií rodu *Enterococcus* je 35°C. Ačkoli většina druhů roste v rozmezí od 10°C do 45°C, *E. faecalis* a *E. faecium* dokonce přežijí působí teploty 60°C po dobu 30 minut (Foulquie Moreno et al. 2006). Tolerují 6,5% NaCl a rostou v rozmezí pH 4,6 – 9,9, optimum je 7,5 (Foulquie Moreno et al. 2006; Van den Berghe et al. 2006).

2.2. Rozšíření rodu *Enterococcus*

Bakterie rodu *Enterococcus* jsou přirozenou součástí mikroflóry zažívacího traktu teplokrevných živočichů a člověka, kromě toho jsou nalézány také v půdě, povrchových vodách, na rostlinách (Mundt 1961), na zelenině i v živočišných masných a mléčných produktech (Franz et al. 1999).

2.2.1. Výskyt rodu *Enterococcus* v potravinách

E. faecium a *E. faecalis* byly nalezeny v zelenině a v mnoha druzích masných i mléčných produktů, syrových i zpracovaných. Jejich odolnost jim umožňuje přežít tepelné úpravy i extrémní pH nebo vysoké koncentrace solí (Foulquie Moreno et al. 2006).

Přítomnost bakterií rodu *Enterococcus* v potravinách je na jednu stranu považována za indikátor fekální kontaminace, ke které mohlo dojít při porážce zvířete nebo důsledkem nehygienických podmínek při následném zpracování (Foulquie Moreno et al. 2006; Franz et al. 1999), ale při výrobě některých mléčných výrobků je *Enterococcus* do potravin záměrně přidáván jako startovací kultury, které se podílejí na utváření charakteristického aroma zrajících sýrů a fermentovaných produktů. Bakterie *Enterococcus* produkují bakteriociny, které znemožňují ve svém okolí růst jiných grampozitivních bakterií, proto jsou v potravinářství používány také jako protektivní kultury, chránící výrobky před pomnožením nebezpečných bakterií jako je *Listeria* nebo *Clostridium* (Foulquie Moreno et al. 2006).

2.2.2. *Enterococcus* jako probiotika

Většina lidských probiotik obsahuje bakterie rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, příležitostně jsou přidávány také bakterie rodu *Enterococcus* (Franz et al. 2003), obvykle kmen *E. faecium* SF 68 (Foulquie Moreno et al. 2006). *E. faecium* SF 68 je také přidáván do krmiv pro zvířata, například do suchého psího krmiva, kde prokazatelně zlepšuje imunitu psů (Benyacoub et al. 2003).

Vzhledem k vzrůstajícímu významu bakterií rodu *Enterococcus* jako patogenů a jejich stoupající rezistenci k vankomycinu vznikly obavy z bezpečnosti jejich použití jako probiotik. V roce 2000 proběhla studie, jejímž cílem bylo zjistit, zda při současném užívání probiotik obsahujících *E. faecium* SF 68 ve fermentovaném mléčném výrobku GAIO a vankomycinu nevyvine *E. faecium* SF 68 rezistenci k vankomycinu. Během studie ke vzniku rezistentního kmene nedošlo (Lund et al. 2000).

V roce 2010 byl proveden pokus zaměřený na otázku, zda probiotika obsahující bakterie *Enterococcus* mohou zabránit kolonizaci střeva rezistentními kmeny rodu *Enterococcus* u pacientů léčených antibiotiky na jednotce intenzivní péče, kde byla vysoká prevalence kmenů *Enterococcus* rezistentních k různým antibiotikům (Marieke et al. 2010). Výsledky studie neprokázaly žádné zlepšení v prevenci kolonizace v průběhu léčby.

2.2.3. Klinický význam rodu *Enterococcus*

Enterococcus je obecně nízce virulentní bakterie, o čemž svědčí jeho přítomnost v trávicím traktu lidí a zvířat a také fakt, že byl po dlouhou dobu součástí lidských i zvířecích probiotik (Arias & Murray 2012). Je to ale významný oportunní patogen, který se může snadno pomnožit u imunosuprimovaných pacientů po transplantaci nebo při dlouhodobé hospitalizaci na jednotkách intenzivní péče (Sawicka-Grzelak et al. 2006) a způsobit vážné infekce, které často ještě komplikuje rezistence k antibiotikům.

K rozvoji infekce dochází nejčastěji po léčbě antibiotiky, která působí proti gramnegativním nebo i grampozitivním bakteriím (kromě rodu *Enterococcus*). Tím dojde k narušení rovnováhy mikrobiálního prostředí trávicího traktu a usnadnění kolonizace bakteriemi *Enterococcus*, které potom mohou dominovat ve střevní mikroflóře i dva měsíce po ukončení léčby. Bylo také prokázáno, že pomnožení rodu *Enterococcus* v trávicím traktu předchází jejich invazi do krevního řečiště pacienta (Ubeda et al. 2010).

Mezi nejčastější zdravotní komplikace, které způsobují, patří infekce kardiovaskulárního systému (zejména bakterémie a endokarditida), infekce močových cest, ledvin, kůže a měkkých tkání a pooperačních ran (Patterson et al. 1995).

Přestože je *Enterococcus* přirozeně rezistentní k nízkým koncentracím beta-laktamových antibiotik, používají se pro léčbu v kombinaci s jinými antibiotiky, která působí synergicky. Jako efektivní se ukázala být kombinace penicilinu (nebo glykopeptidu) s aminoglykosidem (streptomycin nebo gentamicin) (Robbins & Tompsett 1951), ale stoupající aminoglykosidová rezistence snižuje efektivitu této terapie (Adhikari 2010). Navíc je rezistence k ampicilinu dnes nalézána u téměř 100 % klinických izolátů *E. faecium* (Top et al. 2008).

Důležitou alternativou při rezistenci k penicilinům nebo při alergii na penicilin jsou glykopeptidová antibiotika vankomycin a teikoplanin. Stoupající rezistence k těmto antibiotikům dramaticky snižuje možnosti léčby, proto je tato třída rezistencí z lékařského hlediska obzvlášť významná (Klare et al. 2003).

Roku 1999 byl speciálně pro léčbu VRE schválen quinupristin-dalfopristin (kombinace dvou streptograminů) a roku 2000 linezolid (antibiotikum třídy oxazolidinonů) (Arias & Murray 2008). Oba léky mají srovnatelné klinické výsledky (Smith et al. 2005), ale linezolid je více univerzální, spektrum jeho účinku je minimálně tak široké jako spektrum quinupristinu-dalfopristinu a je aktivní vůči *E. faecium* i *E. faecalis*. Navíc může být podáván pacientovi orálně, kdy nehrozí riziko infekce jako u intravenózní aplikace, která je nutná u quinupristinu-dalfopristinu (Eliopoulos 2003).

Cyklický lipopeptid daptomycin vykazuje aktivitu proti grampozitivním bakteriím, včetně rezistentních kmenů rodu *Enterococcus* (Barry et al. 2001), roku 2003 byl schválen pro léčbu infekcí *E. faecalis* (Steenbergen et al. 2005). Daptomycin se za přítomnosti fyziologické koncentrace vápenatých kationtů inkorporuje do membrány grampozitivních bakterií a způsobuje únik kationtů draslíku do extracelulárního prostoru, což má za následek buněčnou smrt (Alborn et al. 1991).

Další léčebnou alternativou proti rodu *Enterococcus* včetně VRE může být širokospektré glycylycyklinové antibiotikum tigecyklin (Doan et al. 2006), které blokuje bakteriální proteinovou syntézu vazbou na 30S ribozomální podjednotku (Bauer et al. 2004).

3. Rezistence

Rezistence u grampozitivních bakterií je typicky založena na jednom z těchto tří mechanismů: modifikace cílového místa, inaktivace antibiotika nebo jeho aktivní odčerpávání (eflux). Tyto mechanismy jsou náročné na fitness bakterie, ale náklady mohou být sníženy regulací exprese genů a/nebo proteinů zajišťujících rezistenci v nepřítomnosti antibiotika. Protože konstitutivní exprese rezistenčních determinant může mít nároky na fitness bakterie a vytvářet selekční tlak proti šíření rezistence, rezistence s indukibilní expresí se šíří snáze a přetrvávají v bakteriální populaci déle (Chancey et al. 2012).

Na rezistenci gramnegativních bakterií se významně podílí vnější membrána, která omezuje průchod velkých a hydrofobních molekul včetně některých antibiotik do buňky (Livermore 2012). Klíčovou roli hrají také membránově vázané proteinové pumpy, zejména RND transportéry (z angl. *r*esistance-*n*odulation-*d*ivision), čerpávající širokou škálu substrátů ven skrz bakteriální stěnu. RND transportéry jsou poháněny iontovým antiportem (Li & Nikaido 2009).

3.1. Rezistence u rodu *Enterococcus*

Enterococcus, zejména *E. faecium*, disponuje širokým spektrem antibiotických rezistencí (Top et al. 2008). Rezistence u bakterií mohou být děleny na přirozené a získané. Přirozené rezistence jsou specifické pro daný bakteriální kmen či druh (Klare et al. 2003). Získané rezistence vznikají mutací v původní bakteriální DNA nebo získáním nové molekuly DNA (Murray 1990).

3.1.1. Přirozené rezistence u rodu *Enterococcus*

Přirozená rezistence je způsobena buď nedostatkem vazebných míst pro antibiotikum nebo nedostatečnou penetrací látky do buňky (Top et al. 2008). Rod *Enterococcus* je přirozeně rezistentní k streptograminům, slabě k β -laktamovým antibiotikům a aminoglykosidům, linkosamidům, polymyxinům (*E. faecalis*) a k vankomycinu (typ *vanC*, slabá rezistence, *E. gallinarum*) (Foulquie Moreno et al. 2006).

Jeden z typů přirozené slabé rezistence k aminoglykosidům u *E. faecium* je dán tím, že bakterie nemá dostatek cytochromových enzymů pro výrobu potřebné energie k transportu aminoglykosidů do buňky. K překonání této rezistence na aminoglykosidy se používá kombinovaná terapie aminoglykosidů s penicilinem (např. gentamicin a ampicilin), které synergicky působí tak, že penicilinová komponenta prolomí buněčnou stěnu a

aminoglykosidová potom penetruje. Synergie ale nefunguje, jedná-li se o kmen rezistentní na ampicilin nebo vlastní-li získanou vysokou rezistenci na aminoglykosidy (Klare et al. 2003).

Slabá přirozená rezistence k β -laktamovým antibiotikům u rodu *Enterococcus* je založena na modifikaci cílového místa pro antibiotikum. Místo zásahu těchto antibiotik jsou penicilin-vazebné proteiny (penicillin-binding proteins, PBPs), které zodpovídají za připojování pentapeptidových prekurzorů k peptidoglykanu v buněčné stěně. Vazba β -laktamových antibiotik k PBPs narušuje syntézu buněčné stěny, což vede k buněčné lýzi (Tomasz 1979). Principem rezistence je produkce PBPs, které β -laktamová antibiotika vážou s nižší afinitou; u *E. faecium* je to PBP5 (Sifaoui et al. 2001), u *E. faecalis* PBP4 (Ono et al. 2005).

E. faecalis je přirozeně rezistentní ke streptograminům quinupristinu (streptogramin třídy B) a dalfopristinu (streptogramin třídy A) kvůli efluxní pumpě kódované genem *lsa*, která je strukturně podobná ABC transportéru (zkr. ATP-binding cassette) (Singh et al. 2002). *E. faecium* disponuje jiným typem efluxní pumpy, kterou kóduje gen *msrC*, blízké příbuzný genům *msrA* a *msrB* bakterií rodu *Staphylococcus*. Gen *msrC* je příčinou slabé rezistence *E. faecalis* ke streptograminům třídy B (Portillo et al. 2000).

3.1.2. Získané rezistence u rodu *Enterococcus*

Mikroorganismus může získat rezistenci akumulováním mutací nebo může obdržet geny pro rezistenci od donorové buňky (Klare et al. 2003). Přenosné geny pro rezistenci si buňky předávají konjugací, transdukcí nebo transformací. Mezi bakteriemi rodu *Enterococcus* se rezistence šíří konjugativním systémem pomocí feromonových plazmidů, které obsahují také proteiny agregační substance (Arias & Murray, 2012) nebo konjugativními transpozony. Předpokladem pro udržení rezistence je selekční tlak antibiotika na mikroorganismus (Klare et al. 2003).

Je podezření, že *E. faecium* hraje ústřední roli v hromadění, udržení a šíření genů rezistence mezi grampozitivními bakteriemi (Witte 2004).

Mezi získané rezistence u bakterií rodu *Enterococcus* patří zvýšená rezistence k β -laktamovým antibiotikům (Klare et al. 2003), způsobená modifikací PBPs (Williamson et al. 1985), nadprodukcí PBPs (Duez et al. 2001; Fontana et al. 1994) nebo produkcí β -laktamázy, která enzymaticky inaktivuje antibiotikum (Murray & Mederski-Samaroj 1983). Vysoká rezistence k ampicilinu, zejména v klinických izolátech *E. faecium*, je způsobena právě nadprodukcí (Fontana et al. 1994) nebo modifikací PBP5 (Rybkin et al. 1998). β -laktamáza je kódována *bla* geny (Zscheck et al. 1988) na plazmidu, který je mezi bakteriemi s vysokou

frekvencí předáván konjugací (Murray & Mederski-Samaroj 1983). *Enterococcus* β -laktamázu pravděpodobně získal od rodu *Staphylococcus* (Zscheck & Murray 1991).

Získaná rezistence k aminoglykosidům je podmíněna přenosnými geny kódujícími aminoglykosidy-modifikující enzym (Klare 2003); tento typ rezistence brání synergickému působení kombinované terapie ampicilinu a aminoglykosidů (Krogstad et al. 1978). Zatímco přirozená rezistence k aminoglykosidům je slabá, získaná rezistence je typicky vysoká u *E. faecium* i *E. faecalis* (Murray 1990).

Rezistence ke streptograminům je způsobena třemi různými mechanismy: acylací antibiotika, jeho aktivním efluxem nebo dimethylací cílového místa 23S rRNA. U rodu *Enterococcus* bylo popsáno 12 genů způsobujících rezistenci ke streptograminům (Hollenbeck & Rice 2012).

Nově byla objevena také získaná rezistence k daptomycinu. Identifikace mutací u rezistentních kmenů poukazuje na mutace v proteinech buněčné stěny, nicméně přesný mechanismus u rodu *Enterococcus* není zcela znám (Arias et al. 2011).

Další získané rezistence u rodu *Enterococcus* jsou: rezistence k makrolidům, chloramfenikolu, fluorochinolonům, tetracyklinům, glykopeptidům a oxazolidinonům (linezolidu) (Klare et al. 2012). Rezistence ke glykopeptidům a oxazolidinonům (resp. linezolidu) jsou podrobně rozvedeny níže.

4. Rezistence k vankomycinu

4.1. Charakteristika vankomycinu

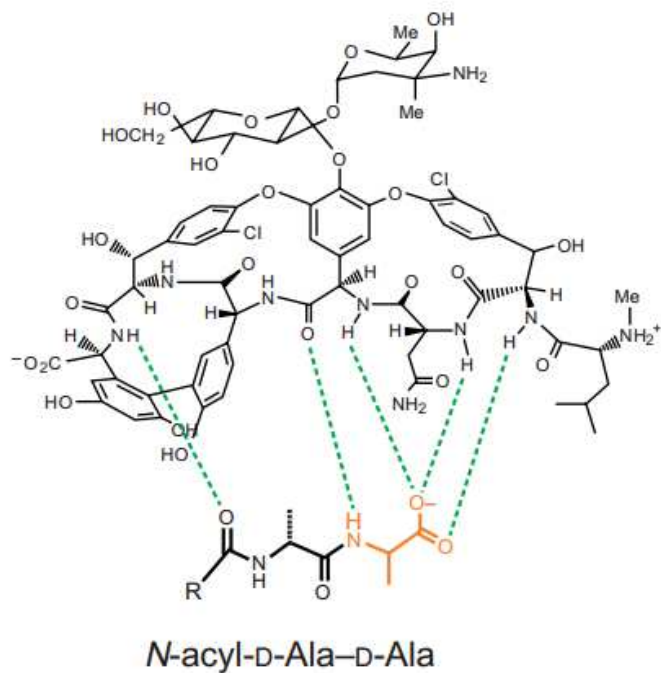
Vankomycin je součástí třídy glykopeptidových antibiotik, která účinkují na grampozitivní bakterie. Dalším významným zástupcem této skupiny antibiotik je také teikoplanin (Top et al. 2008). Gramnegativní bakterie jsou proti glykopeptidovým antibiotikům přirozeně rezistentní díky jejich nepropustné vnější membráně (Healy et al. 2000).

Vankomycin byl donedávna lékem „poslední instance“ při infekcích multirezistentními bakteriemi rodu *Enterococcus* nebo v případě infekce methicilin-rezistentním *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Kuhn et al. 2005); jak postupně mezi mikroorganismy narůstá rezistence k vankomycinu, je v této úloze nahrazován linezolidem.

Glykopeptidy jsou složeny z heptapeptidové páteře, nesoucí pět až sedm substituentů – aromatických kruhů a různých cukrů. Vankomycin obsahuje dvě hexózy a pět aromatických kruhů. Druhé glykopeptidové antibiotikum, které bylo schváleno pro lidskou spotřebu, teikoplanin, obsahuje tři cukry a sedm aromatických kruhů (Healy et al. 2000).

4.2. Mechanismus účinku vankomycinu

Mechanismus účinku glykopeptidových antibiotik spočívá v inhibici syntézy bakteriální buněčné stěny. Vankomycin se váže s vysokou afinitou k D-alanyl-D-alaninu (D-Ala-D-Ala) na C-konci peptidoglykanového peptapeptidového prekurzoru, a tak blokuje přidávání prekurzorů na vznikající peptidoglykanový řetěz. Prekurzor je pevně vázán antibiotikem, které fyzicky brání transpeptidaci a transglykosylaci. Toto narušení buněčné stěny vede až k lýzi buňky (Perkins 1982).



obrázek 4.2.: Mechanismus účinku vankomycinu, vazba vankomycinu na D-Ala-D-Ala peptidoglykanové konce. Převzato z Healy et al. 2000.

4.3. Mechanismus rezistence k vankomycinu

Glykopeptidová rezistence u rodu *Enterococcus* je založena na produkci modifikovaných peptidoglykanových prekurzorů, zakončených D-alanyl-D-laktátem (D-Ala-D-Lac), u typů rezistence VanA, VanB, VanD a VanM, nebo D-alanyl-D-serinem (D-Ala-D-Ser), u VanC, VanE, VanG, VanL, VanN. Glykopeptidy tyto modifikované prekurzory vážou s nižší afinitou. Současně jsou hydrolyzovány vysokoafinní prekurzory zakončené D-Ala-D-Ala (Reynolds et al. 1994a).

Depsipeptidy D-Ala-D-Lac jsou syntetizovány ligázou, podle které jsou rozlišeny jednotlivé fenotypy – VanA, VanB, VanD a VanM. D-laktát pro ligázu připravuje VanH dehydrogenáza konverzí pyruvátu (Arthur et al. 1993). V kmenech s rezistencí založenou na prekurzorech typu D-Ala-D-Ser, geny *vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* a *vanN* kódují protein katalyzující syntézu D-Ala-D-Ser prekurzorů (Reynolds et al. 1994a) a membránově vázanou serinovou racemázu VanT, která konvertuje L-serin na D-serin (Arias et al. 1999).

Hydrolyza vysokoafinních prekurzorů D-Ala-D-Ala probíhá za účasti dvou enzymů: cytoplazmatické D,D-dipeptidázy VanX, štěpící D-Ala-D-Ala (vytvořené původní D-Ala:D-Ala ligázou) a membránově vázané D,D-karboxypeptidázy VanY, která odstraňuje C-terminální D-Ala zbytky z pozdních peptidoglykanových prekurzorů a redukuje tak množství

cílových D-Ala-D-Ala prekurzorů pro působení vankomycinu. Obě tyto aktivity jsou u typů rezistence VanC, VanE, VanG kódovány jedním genem: *vanXY* (Arthur et al. 1998; Reynolds et al. 1994b). Dále operony kódují ještě regulační proteiny, které jsou součástí dvoukomponentového regulačního systému (Abadia Patino et al. 2002).

Pro rezistenci jsou nezbytné pouze tři z výše zmíněných proteinů: ligáza, dehydrogenáza nebo serinová racemáza a D,D-dipeptidáza. D,D-karboxypeptidáza má spíše doplňující funkci (Lebreton et al. 2011).

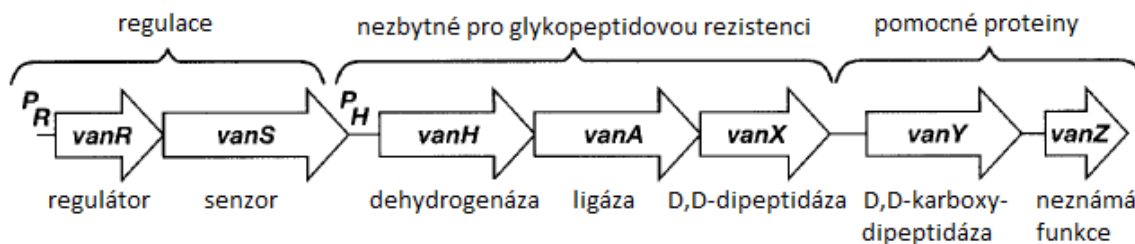
4.4. Typy rezistence k vankomycinu

Od vzniku vankomycinové rezistence bylo zatím popsáno celkem devět operonů kódujících rezistenci ke glykopeptidovým antibiotikům na základě sekvence strukturních genů pro ligázu (Lebreton et al. 2011).

Operony typu D-Ala-D-Lac byly nalezeny buď na plasmidu nebo na chromozomu, zatímco genové klastry kódující prekurzory typu D-Ala-D-Ser byly identifikovány pouze na chromozomu *E. faecalis* (Boyd et al. 2008).

VanA fenotyp je typický vysokou rezistencí k vankomycinu (minimální inhibiční koncentrace pro vankomycin je vyšší než 256 µg/ml) a je rezistentní také k teikoplaninu (Rivera & Boucher 2011). VanA je nejrozšířenějším typem glykopeptidové rezistence, v roce 2009 v USA tvořil 92,4 % případů klinických izolátů VRE (Farrell et al. 2011).

Lokus *vanA* je tvořen klastrem několika genů (*vanS*, *vanR*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY* a *vanZ*), které se nacházejí na 10,8 kbp velkém transpozonu (Arthur et al. 1993). Funkce genu *vanZ* není známa, ale zjistilo se, že způsobuje slabou rezistenci k teikoplaninu i v nepřítomnosti genů potřebných k syntéze prekurzorů (Arthur et al. 1995).



obrázek 4.4.: Organizace *vanA* operonu. Otevřené šipky představují kódující sekvence a ukazují směr transkripce. Regulační geny a geny rezistence jsou kotranskribovány z promotorů P_R a P_H. Převzato z Courvalin 2006.

Transpozon s *vanA* operonem, který byl nazván *Tn1456*, je předáván mezi bakteriemi pomocí plazmidu o velikosti 30 – 150 kbp. K přenosu dochází konjugací, úspěšnost je u *E. faecium* 95 % a u *E. faecalis* 97 %. U *E. faecium* se *VanA* rezistence může nacházet na třech druzích plazmidů (Freitas et al. 2013).

V roce 1999 byl poprvé zjištěn případ horizontálního přenosu *vanA* genů z vankomycin-rezistentního kmene *E. faecalis* na MRSA, čímž vznikne nebezpečný MRSA s vysokou rezistencí k vankomycinu (Smith et al. 1999). VRE zjevně mohou hrát roli rezervoáru mobilních genetických elementů kódujících rezistenci pro jiné, více virulentní nosokomiální patogeny.

VanB fenotyp je rezistentní k vankomycinu, ale zůstává citlivý k teikoplaninu (Rivera & Boucher 2011). *VanB* genový klastr může být lokalizován na chromozomu i na plazmidu, přenášen je kompozitním transpozonem *Tn1547* (Quintiliani et al. 1996). U některých izolátů *E. faecalis* byl ve *vanB* operonu popsán gen *vanV*, který pravděpodobně kóduje pomocný protein, pro rezistenci k vankomycinu není nezbytný (Ribeiro et al. 2011).

VanC typ rezistence se nachází na chromozomu a kóduje slabou přirozenou rezistenci k vankomycinu, k teikoplaninu zůstává citlivý. Tato rezistence je typická pro *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* a *E. flavescens* (Navarro & Courvalin 1994), které nejsou běžnými klinickými izoláty, podílejí se na infekcích zhruba jedním procentem (Ruoff et al. 1990). Rezistence může být konstitutivní nebo inducibilní (Panesso et al. 2005).

VanD typ je charakterizován relativně silnou rezistencí k vankomycinu a slabou k teikoplaninu. Klastř genů *vanD* se nalézá na chromozomu a nepřenáší se konjugací (Depardieu et al. 2004).

VanE typ byl objeven roku 1999, vykazuje slabou rezistenci k vankomycinu a je citlivý k teikoplaninu (Fines et al. 1999). Expres *vanE* operonu je inducibilní nebo konstitutivní (Abadia Patino et al. 2004), operon je součástí transpozonu *Tn6202*, který byl objeven na chromozomu *E. faecalis* (Boyd & Mulvey 2013).

VanG typ je slabě rezistentní k vankomycinu, k teikoplaninu zůstává citlivý (Depardieu et al. 2003), byl objeven v roce 2000 (McKessar et al. 2000). VanG rezistence je inducibilní a je kódována na chromozomu *E. faecalis*. Přenáší se z chromozomu na chromozom pomocí genetických elementů (Depardieu et al. 2003).

VanL typ byl nalezen u *E. faecalis*, kóduje slabou rezistenci k vankomycinu. Aktivita serinové racemázy je kódována dvěma geny. Operon se pravděpodobně nachází na chromozomu, stejně jako ostatní typy rezistence s prekurzory typu D-Ala-D-Ser. Přenos genového klastru *vanL* do recipienta *E. faecalis* se nepodařilo prokázat (Boyd et al. 2008).

VanM typ kóduje rezistenci k vankomycinu i teikoplaninu, která je přenosná konjugací mezi *E. faecium* (Xu et al. 2010).

VanN typ rezistence byl objeven jako poslední, v roce 2011. Kóduje slabou rezistenci k vankomycinu, ale nenese žádné známé geny pro ligázu syntetizující modifikované prekurzory. Rezistenci k teikoplaninu nezpůsobuje. Je to první rezistence typu D-Ala-D-Ser, která se nachází na chromozomu *E. faecium*, je přenosná konjugací pouze mezi *E. faecium*. Operon je exprimován konstitutivně (Lebreton et al. 2011).

4.5. Systém regulace rezistence k vankomycinu

Expresi genů rezistence k vankomycinu reguluje dvoukomponentový regulační systém typu VanS/VanR, který se skládá z membránově-vázané histidin kinázy (VanS) a cytoplazmatického regulátoru odpovědi, zastávajícího funkci transkripčního aktivátoru (VanR) (Arthur et al., 1992). Přítomnost glykopeptidu v periplazmě vyvolá aktivaci VanS

skrze autofosforylaci, aktivovaný VanS potom fosforyluje VanR. Fosforylovaný VanR interaguje se specifickou oblastí promotoru a zvyšuje tak transkripci ostatních genů *van* operonu včetně VanS a VanR (Wright et al. 1993). Aktivita VanR a VanS je nezbytná pro plnou expresi *van* operonu (Gagnon et al. 2011).

4.6. Vývoj rezistence k vankomycinu

První VRE izoláty byly objeveny až po několika desetiletích používání vankomycinu v roce 1987 v Evropě (Leclercq et al. 1988) a v roce 1988 v USA (Kaplan et al. 1988). Poté se incidence VRE začala, zejména v USA, rychle rozšiřovat. Ve Spojených státech se zvýšil podíl VRE u infekcí krevního řečiště způsobenými bakteriemi rodu *Enterococcus* z nulového výskytu v roce 1989 na 28,5 % v roce 2003 ([http://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553\(99\)70031-3/abstract](http://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553(99)70031-3/abstract); [http://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553\(04\)00542-5/abstract](http://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553(04)00542-5/abstract)). Situace se nadále nemění, v roce 2009 v USA byl podíl VRE mezi klinickými izoláty rodu *Enterococcus* 29 % (Farrell et al. 2011).

Nárůstu VRE v USA v 90. letech předcházela vlna ampicilin-rezistentních kmenů *E. faecium* v 80. letech (Grayson et al. 1991). Stejná situace nastala v následujícím desetiletí i v Evropě (Lavery et al. 1997).

Vývoj rezistence k vankomycinu také doprovází změna podílu *E. faecium* a *E. faecalis* na patogenezi. V USA od roku 1970 do roku 1977, kdy ještě nebyla zjištěna rezistence k vankomycinu, byl v 87 % klinických izolátů nalezen *E. faecalis*, pouhých 9 % izolátů byl *E. faecium* (Maki & Agger 1988). Z dat, která v průběhu let 2006 a 2007 shromáždila a analyzovala National Healthcare Safety Network (NHSN) vyplývá, že *E. faecium* se dnes podílí na infekcích již ve znatelně větší míře než v minulém století, ale stále méně než *E. faecalis* (v poměru zhruba 2:3). To koreluje s vyšším počtem infekcí rezistentními kmeny rodu *Enterococcus*, u *E. faecium* vykazuje rezistenci k vankomycinu až 80 % izolátů, zatímco u *E. faecalis* byla rezistence nalezena u pouhých přibližně 6 %. Totéž platí i pro rezistenci k ampicilinu (cca 90 % ampicilin-rezistentních izolátů u *E. faecium* a zhruba 4 % u *E. faecalis*) (Hidron et al. 2008).

Epidemiologie VRE infekcí v Evropě a ve Spojených státech se značně liší. Předpokládá se, že za situací v USA může stát pěti- až desetinásobně vyšší spotřeba vankomycinu v USA v porovnání s Evropou (Bonten et al. 2001). Celosvětová spotřeba vankomycinu v lékařské praxi byla enormní zejména v 80. letech a v první polovině 90. let (Kirst et al. 1998). V roce 1994 byl zaznamenán mírný pokles, který odráží začátek pokusů o omezení podávání

vankomycinu v reakci na obavy z šíření rezistence (<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00039349.htm>).

V Evropě nejsou VRE v klinickém prostředí tak rozšířené jako ve Spojených státech, v roce 2000 byly nalezeny VRE v necelých 3 % krevních izolátů obsahujících rod *Enterococcus*, ohniska infekcí VRE se objevují zřídka a jen vzácně jsou doprovázena vážnými infekcemi (Schouten et al. 2000). Zato jsou VRE běžné u hospodářských zvířat (Bonten et al. 2001) a zdravých lidí. Například ve Francii v roce 2000 byly VRE nalezeny u 11,8 % testovaných jedinců, kteří nebyli nikdy hospitalizováni (Gambarotto et al. 2000).

V Evropě několik studií zaznamenalo případy pravděpodobného přenosu VRE ze zvířat na lidi, zejména chovatele hospodářských zvířat (Stobberingh et al. 1999). Naproti tomu v USA nebyly pozorovány téměř žádné přenosy tohoto druhu (Simjee et al. 2002), kromě studie z roku 2002, kdy byl identifikován VRE přítomný v psí moči se stejným *Tn1546*, který je typický pouze pro lidské klinické VRE izoláty. Dokazuje tedy, že je možná výměna rezistenčních determinant mezi lidskými a psími kmeny rodu *Enterococcus* (Simjee et al. 2002).

Vznik veřejného rezervoáru VRE v Evropě je dáván do souvislosti s masivním užíváním avoparcinu jako růstového stimulantu od 70. let ve většině Evropských zemí (Bonten et al. 2001). Kvůli obavám z dalšího šíření VRE z tohoto rezervoáru do klinického prostředí Evropská unie užívání avoparcinu v dubnu roku 1997 zakázala (Top et al. 2008). Poté byl u hospodářských zvířat i ve střevní mikroflóře zdravých osob zjištěn pokles výskytu VRE, ale následné studie odhalily, že došlo k nárůstu ampicilinové a vankomycinové rezistence u nosokomiálních infekcí bakteriemi rodu *Enterococcus* (Arias & Murray 2012).

Avoparcin je glykopeptid blízce příbuzný vankomycinu, proto vyvíjí na VRE selekční tlak, který vede k udržení VRE v zažívacím traktu zvířat a jejich okolí (van den Bogaard et al. 1997). Tuto teorii podporuje skutečnost, že ve Spojených státech nebyly VRE nalezeny u zdravých lidí, kteří nebyli nikdy hospitalizováni, ani nebyli ve styku s hospodářskými zvířaty (Coque et al. 1996) a že v Evropě poklesl výskyt VRE mimo klinické prostředí po zákazu používání avoparcinu (Arias & Murray 2012).

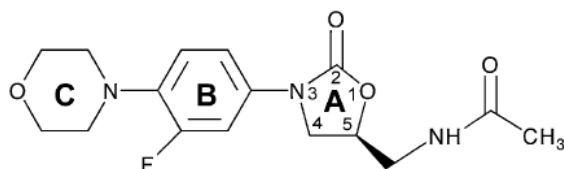
Ve Spojených státech avoparcin ani jiná glykopeptidová antibiotika nebyla pro použití v zemědělství schválena, zřejmě právě proto nejsou VRE nalézány u zvířat ani zdravých osob (Coque et al. 1996). Zato nosokomiální infekce způsobené VRE jsou ve většině nemocnic Spojených států spíše endemického charakteru (Bonten & Willems 2001; Willems et al. 2005).

5. Rezistence k linezolidu

5.1. Charakteristika linezolidu

Linezolid je první antibakteriální látkou z nové třídy syntetických antibiotik oxazolidinonů, schválenou pro klinické využití (Perry & Jarvis 2001). Další dvě antibiotika, radezolid a torezolid, jsou zatím ve fázi klinických studií (Paknikar & Narayana 2012). Linezolid působí *in vitro* i *in vivo* proti široké škále grampozitivních bakterií, které jsou rezistentní k řadě jiných antibiotik včetně vankomycinu. Je určen zejména pro léčbu infekcí VRE a MRSA (Brickner et al. 2008; Rivera & Boucher 2011). Gramnegativní bakterie jsou k linezolidu přirozeně rezistentní kvůli efluxnímu transportu (Eliopoulos 2003).

Molekula linezolidu se skládá ze tří aromatických kruhů a acetamidomethylového řetězce. Kruh A (viz obr. 5.1.) představuje farmakokinetický oxazolidinonový kruh, od kterého je odvozen název této třídy antibiotik.



Obrázek 5.1.: Chemická struktura linezolidu. Převzato z Long & Vester 2011.

5.2. Mechanismus účinku linezolidu

Linezolid inhibuje bakteriální proteinovou syntézu ve fázi iniciaci translace tím, že zabraňuje tvorbě ternárního komplexu N-formylmethionyl-tRNA – ribozom – mRNA, jehož vznik je nezbytný pro začátek translace. Ternární komplex vzniká za účasti iniciačních faktorů IF1, IF2 a IF3. N-formylmethionyl-tRNA je vázána IF2 a přenesena na 30S podjednotku ribozomu, kde jsou navázány IF1, IF3 a mRNA (Swaney et al. 1998).

První přesnější označení vazebného místa linezolidu na ribozomu vzešlo v roce 1999 v souvislosti se studií mutace ve 23S rRNA, která vedla ke vzniku rezistence. Příčinou byla bodová mutace v šesti místech centrální smyčky domény V 23S rRNA, o níž je známo, že je součástí ribozomálního peptidyltransferázového centra (peptidyl transferase center, dále PTC) (Kloss et al. 1999).

PTC se nachází ve středu 50S ribozomální podjednotky ve střední části prostoru, kde se setkávají peptidyl-tRNA a 3' konec aminoacyl-tRNA. Linezolid se váže na PTC do kapsy, kterou tvoří 8 univerzálně konzervovaných nukleotidů 23S rRNA a je umístěn tak, že kruh C

(viz obr. 5.1.) je orientován směrem k rozhraní mezi podjednotkami, zatímco kruh A stejně jako pětiuhlíkatý řetězec vedou do ribozomálního tunelu (Wilson et al. 2008).

V roce 2008 byla určena krystalová struktura ribozomu s navázanou molekulou linezolidu a bylo potvrzeno, že linezolid se váže do A-místa PTC, kde překrývá aminoacylový zbytek v A-místě a blokuje tak přesné polohování tRNA v PTC (Wilson et al. 2008).

5.3. Mechanismus rezistence k linezolidu

Rezistence k linezolidu může být způsobena mutací ve vazebném místě linezolidu (Prystowsky et al. 2001), enzymatickou methylací adeninu v pozici 2503 23S rRNA (Toh et al. 2007) nebo mutací v ribozomálních proteinech L3 nebo L4 (Locke et al. 2009)

První typ rezistence je poměrně rozšířený (Long & Vester 2011). U klinických izolátů rodu *Enterococcus* je obvykle způsoben záměnou guaninu za uracil v nukleotidu 2576 v genu kódujícím doménu V 23S rRNA (číslování 2576 odpovídá analogické nukleotidové pozici v rRNA genech u *E.coli*), což narušuje umístění klíčových nukleotidů ve vazebném místě linezolidu (Prystowsky et al. 2001). Mutace G2576U (event. G2576T) je nejrozšířenější, ve studii z roku 2009 analyzující linezolidovou rezistenci v USA byla nalezena u všech klinických izolátů *Enterococcus* rezistentních k linezolidu (Farrell et al. 2011).

Druhý typ linezolidové rezistence byl objeven roku 2006 u některých klinických izolátů *S. aureus* (Long et al. 2006). Rezistence je podmíněna genem *cfr*, který kóduje methyltransferázu modifikující pozici A2503 23S rRNA (Toh et al. 2007). Tato rezistence je na rozdíl od předchozích dvou typů potenciálně snadno přenosná pomocí plazmidů (Locke et al. 2009). V roce 2011 byl gen *cfr* poprvé identifikován u kmene *E. faecalis* izolovaného ze zvířete, nachází se na plazmidu s IS1216, umožňující šíření genu (Liu et al. 2012).

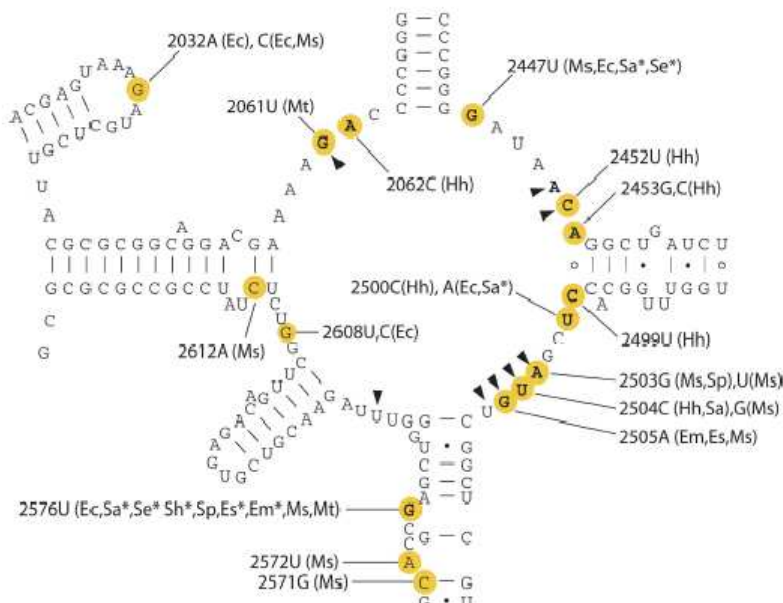
Poslední, nejméně běžný typ rezistence, byl také nalezen u *S. aureus* (Locke et al. 2009) a u *Streptococcus pneumoniae* (Wolter et al. 2005). Mutace v ribozomálních proteinech L3 a L4, které blíže interagují s PTC, narušují strukturu 23S rRNA a negativně ovlivňují vazbu antibiotika (Gregory & Dahlberg 1999).

Kromě těchto známých typů rezistence k linezolidu byla popsána rezistence založená na zvýšeném efluxu antibiotika prostřednictvím znásobení exprese genů ABC transporterů u *Streptococcus pneumoniae* (Feng et al. 2009).

Další mutace v nukleotidech domény V 23S rRNA, které byly objeveny u bakterií rodu *Enterococcus* (G2505A, G2512U, G2513U a C2610G), byly popsány *in vitro* (Prystowsky et

al. 2001); mutace G2505A byla také identifikována v myším izolátu *E. faecalis* (Bourgeois-Nicolaos et al. 2007).

Přestože většina mutací způsobujících rezistenci k linezolidu se týká nukleotidů, které nejsou v přímé interakci s molekulou linezolidu, všechna mutační místa přiléhají alespoň k jednomu z osmi konzervovaných nukleotidů v místě vazby linezolidu (Wilson et al. 2008).



obrázek 5.3.: Sekundární struktura centrální smyčky domény V 23S rRNA. Nukleotidy, které tvoří vazebná místa linezolidu, jsou označeny černými trojúhelníčky. Žlutě zakroužkované nukleotidové pozice jsou ty, jejichž mutace jsou příčinou vzniku rezistence k linezolidu. Mutace tučně označených nukleotidů mají významný efekt na MIC linezolidu (více než čtyřnásobný nárůst MIC). Mutace a související organismy jsou označeny dvoupísmennými zkratkami: Ec (*E. coli*), Sa (*S. aureus*), Se (*S. epidermidis*), Sh (*S. haemolyticus*), Sp (*S. pneumoniae*), Es (*E. faecalis*), Em (*E. faecium*), Ms (*M. smegmatis*), Mt (*M. tuberculosis*) a Hh (*H. halobium*). Hvězdičky značí mutaci nalezenou u klinických izolátů. Převzato z Long & Vester 2011.

E. faecium má šest kopií rRNA genů, *E. faecalis* má čtyři kopie, hladina rezistence koreluje s počtem mutovaných alel (Wilson et al. 2008). Je možné, že ke zvyšování počtu mutovaných rRNA genů napomáhá intracelulární rekombinace mezi genovými kopiemi, bakterie deficientní v rekombináze A vykazují zpoždění v amplifikaci genů (Boumghar-Bourtchai et al. 2009).

Přímý vliv na počet mutovaných rRNA genů a hladinu rezistence má délka trvání léčby. Při podávání antibiotika po dobu 21 dní byla mutace G2576U nalezena u *E. faecalis* ve

všech čtyřech kopiích rRNA genů. U izolátů z myší, které byly linezolidu vystaveny od pěti do osmi dnů, byly mutace pouze ve dvou kopiích genů. Proto je doporučeno redukovat délku léčby linezolidem na co nejkratší možnou dobu (Bourgeios-Nicolaos et al. 2007).

Mnoho mutací stojících za vznikem rezistence k linezolidu je asociováno s rezistencí na řadu jiných antibiotik, jejichž cílovým místem je také PTC, např. anisomycin, chloramfenikol nebo pleuromutiliny. Srovnáním modelů vazby těchto látek na PTC bylo odhaleno, že příčinou je vzájemné překrývání vazebných míst s linezolidem, zejména s oxazolidinovým kruhem (Wilson et al. 2008).

5.4. Vývoj rezistence k linezolidu

Linezolid byl schválen pro klinické použití v roce 2001 (Brauers et al. 2005). Krátce po jeho uvedení do praxe byl pozorován vznik rezistence, nejčastěji u pacientů s VRE, kteří byli linezolidem dlouhodobě léčeni (Pai et al. 2002). Nicméně rezistence k tomuto antibiotiku je stále velmi vzácná, v roce 2010 při testování klinických izolátů v USA byla rezistence k linezolidu nalezena u 0,38 % izolátů mezi veškerými grampozitivními bakteriemi a 0,75 % v rámci rodu *Enterococcus* (Flamm et al. 2012).

Rezistence k linezolidu byla zpočátku nalézána pouze u vankomycin-rezistentních kmenů (Dobbs et al. 2006; Herrero et al. 2002). Také bylo zjištěno, že vankomycin-rezistentní kmeny *E. faecalis* vyvíjejí rezistenci na linezolid rychleji a ve větší míře než *E. faecium* (Prystowsky et al. 2001). První nosokomiální přenos linezolidové rezistence na kmen *E. faecium* citlivý k vankomycinu byl zaznamenán roku 2008 v souvislosti se zvýšením spotřeby linezolidu v klinickém zařízení (Schulte et al. 2008).

Byly dokumentovány ojedinělé případy, kdy vznikla rezistence k linezolidu u pacientů, kteří antibiotikum nikdy neužívali (Arias & Murray 2012; Schulte et al. 2008). Za nejpravděpodobnější příčinu je považován nosokomiální přenos rezistentních kmenů, nelze vyloučit ani spontánní mutaci (Schulte et al. 2008).

Výskyt rezistence k linezolidu a potenciál pro snadný horizontální přenos *cfp* genu přispěly k zájmu o rozšíření spektra oxazolidinonů (Locke et al. 2009). Torezolid, aktivní antibakteriální skupina léčiva prekurzoru torezolid fosfátu, je čtyři- až šestnáctkrát aktivnější než linezolid, působí i na kmeny rezistentní k linezolidu (Livermore et al. 2009) a linezolid-citlivé bakterie k němu rezistenci vyvíjejí hůře než k linezolidu (Locke et al. 2009).

6. Závěr

Enterococcus je oportunní patogen, který je běžně nalézán u zdravých jedinců v mikroflóře trávicího traktu a nepůsobí žádné problémy, ale v případě oslabení imunity nebo narušení střevní mikroflóry může vyvolat infekci.

V posledních letech se významně zvyšuje podíl kmenů rezistentních k používaným antibiotikům a zvláště v nemocničním prostředí narůstá počet rezistentních kmenů *E. faecium* k vankomycinu a začínají se objevovat i kmeny rezistentní k linezolidu, případně k oběma antibiotikům zároveň. Používaný vankomycin je součástí třídy glykopeptidových antibiotik, která inhibují syntézu bakteriální stěny.

Rezistence k vankomycinu je založena na produkci modifikovaných peptidoglykanových prekurzorů, které vážou antibiotikum s výrazně nižší afinitou. Do dnešní doby bylo identifikováno celkem devět fenotypů glykopeptidové rezistence, rozlišených podle typu ligázy, syntetizující prekurzory. Glykopeptidová rezistence se snadno šíří mobilními genetickými elementy, nebezpečné kmeny vznikají zejména při přenosu na více virulentní patogeny než je *Enterococcus*, např. methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*.

VRE se v posledních několika desetiletích staly závažným klinickým problémem po celém světě. Ohniska VRE v klinických zařízeních jsou nejvýraznějším problémem zejména v USA, v Evropě je četnost těchto nosokomiálních infekcí podstatně nižší, ale potenciální hrozbou je široký rezervoár VRE u zdravé veřejnosti a v chovech hospodářských zvířat. Toto rozšíření v Evropě je následkem masivního užívání glykopeptidového antibiotika avoparcinu, které má funkci růstového stimulatoru u hospodářských zvířat. Podoba avoparcinu s vankomycinem způsobila vyselektování VRE, jež se poté rozšířily mezi veřejnost do zdravých jedinců, ze kterých se stali přenašeči.

Působení linezolidu na grampozitivní bakterie je naproti vankomycinu založeno na blokaci iniciaci translace vazbou na PTC na 50S podjednotku ribozomu. Rezistence k linezolidu může být způsobena mutací v nukleotidech, enzymatickou metylací adeninu v pozici 2503 23S rRNA nebo mutací v ribozomálních proteinech L3 nebo L4. U *E. faecium* a *E. faecalis* je nejčastěji nalézána mutace G2576T v PTC.

Linezolid, tigecyklin a daptomycin jsou aktuálně nejvhodnější antibiotika pro léčbu infekcí VRE. Otázkou zůstává, jak dlouho bude trvat, než se rozšíří rezistence i k těmto látkám a zda se podaří najít či vyvinout včas stejně účinnou alternativu.

Současná situace s rezistencemi u bakterií je velmi znepokojivá a zvláště u imunosuprimovaných pacientů může vést k fatálním důsledkům. Proto výzkum sledující

vývoj rezistence u *E. faecium* k těmto dvěma antibiotikům v kontinuálním systému kultivace bakteriální populace může mnohé napovědět.

7. Seznam literary

Abadia-Patino, L., K. Christiansen, et al. (2004). "VanE-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* clinical isolates from Australia." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(12): 4882-4885.

Abadia Patino, L., P. Courvalin, et al. (2002). "vanE gene cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* BM4405." *J Bacteriol* **184**(23): 6457-6464.

Adhikari, L. (2010). "High-level Aminoglycoside Resistance and Reduced Susceptibility to Vancomycin in Nosocomial Enterococci." *J Glob Infect Dis* **2**(3): 231-235.

Alborn, W. E., Jr., N. E. Allen, et al. (1991). "Daptomycin disrupts membrane potential in growing *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* **35**(11): 2282-2287.

Arias, C. A., M. Martin-Martinez, et al. (1999). "Characterization and modelling of VanT: a novel, membrane-bound, serine racemase from vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174." *Mol Microbiol* **31**(6): 1653-1664.

Arthur, M., C. Molinas, et al. (1992). "The VanS-VanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147." *J Bacteriol* **174**(8): 2582-2591.

Arthur, M., C. Molinas, et al. (1993). "Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147." *J Bacteriol* **175**(1): 117-127

Arias, C. A. and B. E. Murray (2008). "Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections." *Expert Rev Anti Infect Ther* **6**(5): 637-655.

Arias, C. A. and B. E. Murray (2012). "The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance." *Nat Rev Microbiol* **10**(4): 266-278.

Arias, C. A., D. Panesso, et al. (2011). "Genetic basis for in vivo daptomycin resistance in enterococci." N Engl J Med **365**(10): 892-900.

Arthur, M., F. Depardieu, et al. (1995). "The vanZ gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin." Gene **154**(1): 87-92.

Arthur, M., F. Depardieu, et al. (1998). "Requirement of the VanY and VanX D,D-peptidases for glycopeptide resistance in enterococci." Mol Microbiol **30**(4): 819-830.

Barry, A. L., P. C. Fuchs, et al. (2001). "In vitro activities of daptomycin against 2,789 clinical isolates from 11 North American medical centers." Antimicrob Agents Chemother **45**(6): 1919-1922.

Bauer, G., C. Berens, et al. (2004). "Comparison of tetracycline and tigecycline binding to ribosomes mapped by dimethylsulphate and drug-directed Fe²⁺ cleavage of 16S rRNA." J Antimicrob Chemother **53**(4): 592-599.

Benyacoub, J., G. L. Czarnecki-Maulden, et al. (2003). "Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs." J Nutr **133**(4): 1158-1162.

Billot-Klein, D., D. Blanot, et al. (1994). "Association constants for the binding of vancomycin and teicoplanin to N-acetyl-D-alanyl-D-alanine and N-acetyl-D-alanyl-D-serine." Biochem J **304** (Pt 3): 1021-1022.

Bonten, M. J., R. Willems, et al. (2001). "Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from?" Lancet Infect Dis **1**(5): 314-325.

Boumghar-Bourtchai, L., A. Dhalluin, et al. (2009). "Influence of recombination on development of mutational resistance to linezolid in *Enterococcus faecalis* JH2-2." Antimicrob Agents Chemother **53**(9): 4007-4009.

Bourgeois-Nicolaos, N., L. Massias, et al. (2007). "Dose dependence of emergence of resistance to linezolid in *Enterococcus faecalis* in vivo." J Infect Dis **195**(10): 1480-1488.

Boyd, D. A. and M. R. Mulvey (2013). "The VanE operon in *Enterococcus faecalis* N00-410 is found on a putative integrative and conjugative element, Tn6202." J Antimicrob Chemother **68**(2): 294-299.

Boyd, D. A., B. M. Willey, et al. (2008). "Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL." Antimicrob Agents Chemother **52**(7): 2667-2672.

Brickner, S. J., M. R. Barbachyn, et al. (2008). "Linezolid (ZYVOX), the first member of a completely new class of antibacterial agents for treatment of serious gram-positive infections." J Med Chem **51**(7): 1981-1990.

Chancey, S. T., D. Zahner, et al. (2012). "Acquired inducible antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria." Future Microbiol **7**(8): 959-978.

Coque, T. M., J. F. Tomayko, et al. (1996). "Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States." Antimicrob Agents Chemother **40**(11): 2605-2609.

Depardieu, F., M. G. Bonora, et al. (2003). "The vanG glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited." Mol Microbiol **50**(3): 931-948.

Depardieu, F., M. Kolbert, et al. (2004). "VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*." Antimicrob Agents Chemother **48**(10): 3892-3904.

Doan, T. L., H. B. Fung, et al. (2006). "Tigecycline: a glycylcycline antimicrobial agent." Clin Ther **28**(8): 1079-1106.

Dobbs, T. E., M. Patel, et al. (2006). "Nosocomial spread of *Enterococcus faecium* resistant to vancomycin and linezolid in a tertiary care medical center." J Clin Microbiol **44**(9): 3368-3370.

Duez, C., W. Zorzi, et al. (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**(Pt 9): 2561-2569.

Eliopoulos, G. M. (2003). "Quinupristin-dalfopristin and linezolid: evidence and opinion." Clin Infect Dis **36**(4): 473-481.

Farrell, D. J., R. E. Mendes, et al. (2011). "LEADER Program results for 2009: an activity and spectrum analysis of linezolid using 6,414 clinical isolates from 56 medical centers in the United States." Antimicrob Agents Chemother **55**(8): 3684-3690.

Feng, J., A. Lupien, et al. (2009). "Genome sequencing of linezolid-resistant *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals novel mechanisms of resistance." Genome Res **19**(7): 1214-1223.

Fines, M., B. Perichon, et al. (1999). "VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405." Antimicrob Agents Chemother **43**(9): 2161-2164.

Flamm, R. K., D. J. Farrell, et al. (2012). "LEADER surveillance program results for 2010: an activity and spectrum analysis of linezolid using 6801 clinical isolates from the United States (61 medical centers)." Diagn Microbiol Infect Dis **74**(1): 54-61.

Fontana, R., M. Aldegheri, et al. (1994). "Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*." Antimicrob Agents Chemother **38**(9): 1980-1983.

Foulquie Moreno, M. R., P. Sarantinopoulos, et al. (2006). "The role and application of enterococci in food and health." Int J Food Microbiol **106**(1): 1-24.

Freitas, A. R., C. Novais, et al. (2013). "Microevolutionary events involving narrow host plasmids influences local fixation of vancomycin-resistance in *Enterococcus* populations." PLoS One **8**(3): e60589.

Gagnon, S., S. Levesque, et al. (2011). "vanA-containing *Enterococcus faecium* susceptible to vancomycin and teicoplanin because of major nucleotide deletions in Tn1546." J Antimicrob Chemother **66**(12): 2758-2762.

Gambarotto, K., M. C. Ploy, et al. (2000). "Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and nonhospitalized controls in a cattle-rearing area of France." J Clin Microbiol **38**(2): 620-624.

Grayson, M. L., G. M. Eliopoulos, et al. (1991). "Increasing resistance to beta-lactam antibiotics among clinical isolates of *Enterococcus faecium*: a 22-year review at one institution." Antimicrob Agents Chemother **35**(11): 2180-2184.

Gregory, S. T. and A. E. Dahlberg (1999). "Erythromycin resistance mutations in ribosomal proteins L22 and L4 perturb the higher order structure of 23 S ribosomal RNA." J Mol Biol **289**(4): 827-834.

Healy, V. L., I. A. Lessard, et al. (2000). "Vancomycin resistance in enterococci: reprogramming of the D-ala-D-Ala ligases in bacterial peptidoglycan biosynthesis." Chem Biol **7**(5): R109-119.

Herrero, I. A., N. C. Issa, et al. (2002). "Nosocomial spread of linezolid-resistant, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*." N Engl J Med **346**(11): 867-869.

Hidron, A. I., J. R. Edwards, et al. (2008). "NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007." Infect Control Hosp Epidemiol **29**(11): 996-1011.

Kaplan, A. H., P. H. Gilligan, et al. (1988). "Recovery of resistant enterococci during vancomycin prophylaxis." J Clin Microbiol **26**(6): 1216-1218.

Kirst, H. A., D. G. Thompson, et al. (1998). "Historical yearly usage of vancomycin." Antimicrob Agents Chemother **42**(5): 1303-1304.

Klare, I., C. Konstabel, et al. (2003). "Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*." Int J Food Microbiol **88**(2-3): 269-290.

Klare, I., W. Witte, et al. (2012). "[Vancomycin-resistant enterococci (VRE). Recent results and trends in development of antibiotic resistance]." Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz **55**(11-12): 1387-1400.

Kloss, P., L. Xiong, et al. (1999). "Resistance mutations in 23 S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center." J Mol Biol **294**(1): 93-101.

Krogstad, D. J., T. R. Korfhagen, et al. (1978). "Plasmid-mediated resistance to antibiotic synergism in enterococci." J Clin Invest **61**(6): 1645-1653.

Kuhn, I., A. Iversen, et al. (2005). "Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions." Appl Environ Microbiol **71**(9): 5383-5390.

Lavery, A., A. S. Rossney, et al. (1997). "Incidence and detection of multi-drug-resistant enterococci in Dublin hospitals." J Med Microbiol **46**(2): 150-156.

Leach KL, et al. (2007). „The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria.“ Mol Cell **26**: 393–402.

Lebreton, F., F. Depardieu, et al. (2011). "D-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*." Antimicrob Agents Chemother **55**(10): 4606-4612.

Leclercq, R., E. Derlot, et al. (1988). "Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*." N Engl J Med **319**(3): 157-161.

Li, X. Z. and H. Nikaido (2009). "Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update." Drugs **69**(12): 1555-1623

Liu, Y., Y. Wang, et al. (2012). "First report of the multidrug resistance gene cfr in *Enterococcus faecalis* of animal origin." Antimicrob Agents Chemother **56**(3): 1650-1654.

Livermore, D. M. (2012). "Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens." Korean J Intern Med **27**(2): 128-142.

Livermore, D. M., S. Mushtaq, et al. (2009). "Activity of oxazolidinone TR-700 against linezolid-susceptible and -resistant staphylococci and enterococci." J Antimicrob Chemother **63**(4): 713-715.

Long, K. S. and B. Vester (2012). "Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome." Antimicrob Agents Chemother **56**(2): 603-612.

Long, K. S., J. Poehlsgaard, et al. (2006). "The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics." Antimicrob Agents Chemother **50**(7): 2500-2505.

Lund, B., C. Edlund, et al. (2000). "Impact on human intestinal microflora of an *Enterococcus faecium* probiotic and vancomycin." Scand J Infect Dis **32**(6): 627-632.

Maki, D. G. and W. A. Agger (1988). "Enterococcal bacteremia: clinical features, the risk of endocarditis, and management." Medicine (Baltimore) **67**(4): 248-269.

McKessar, S. J., A. M. Berry, et al. (2000). "Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*." Antimicrob Agents Chemother **44**(11): 3224-3228.

Meka, V. G. and H. S. Gold (2004). "Antimicrobial resistance to linezolid." Clin Infect Dis **39**(7): 1010-1015.

Mundt, J. O. (1961). "Occurrence of Enterococci: Bud, Blossom, and Soil Studies." Appl Microbiol **9**(6): 541-544.

Murray, B. E. (1990). "The life and times of the Enterococcus." Clin Microbiol Rev **3**(1): 46-65.

Murray, B. E. and B. Mederski-Samaroj (1983). "Transferable beta-lactamase. A new mechanism for in vitro penicillin resistance in Streptococcus faecalis." J Clin Invest **72**(3): 1168-1171.

Navarro, F. and P. Courvalin (1994). "Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in Enterococcus casseliflavus and Enterococcus flavescens." Antimicrob Agents Chemother **38**(8): 1788-1793.

Ono, S., T. Muratani, et al. (2005). "Mechanisms of resistance to imipenem and ampicillin in Enterococcus faecalis." Antimicrob Agents Chemother **49**(7): 2954-2958.

Pai, M. P., K. A. Rodvold, et al. (2002). "Risk factors associated with the development of infection with linezolid- and vancomycin-resistant Enterococcus faecium." Clin Infect Dis **35**(10): 1269-1272.

Paknikar, S. S. and S. Narayana (2012). "Newer antibacterials in therapy and clinical trials." N Am J Med Sci **4**(11): 537-547.

Panesso, D., L. Abadia-Patino, et al. (2005). "Transcriptional analysis of the vanC cluster from Enterococcus gallinarum strains with constitutive and inducible vancomycin resistance." Antimicrob Agents Chemother **49**(3): 1060-1066.

Patterson, J. E., A. H. Sweeney, et al. (1995). "An analysis of 110 serious enterococcal infections. Epidemiology, antibiotic susceptibility, and outcome." Medicine (Baltimore) **74**(4): 191-200.

Perkins, H. R. (1982). "Vancomycin and related antibiotics." Pharmacol Ther **16**(2): 181-197.

Perry, C. M. and B. Jarvis (2001). "Linezolid: a review of its use in the management of serious gram-positive infections." Drugs **61**(4): 525-551.

Prystowsky, J., F. Siddiqui, et al. (2001). "Resistance to linezolid: characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant enterococci." Antimicrob Agents Chemother **45**(7): 2154-2156.

Reynolds, P. E., F. Depardieu, et al. (1994b). "Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon Tn1546 requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine." Mol Microbiol **13**(6): 1065-1070.

Reynolds, P. E., H. A. Snaith, et al. (1994a). "Analysis of peptidoglycan precursors in vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174." Biochem J **301** (Pt1): 5-8.

Ribeiro, T., S. Santos, et al. (2011). "Identification of a new gene, vanV, in vanB operons of *Enterococcus faecalis*." Int J Antimicrob Agents **37**(6): 554-557.

Rivera, A. M. and H. W. Boucher (2011). "Current concepts in antimicrobial therapy against select gram-positive organisms: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, penicillin-resistant pneumococci, and vancomycin-resistant enterococci." Mayo Clin Proc **86**(12): 1230-1243.

Robbins, W. C. and R. Tompsett (1951). "Treatment of enterococcal endocarditis and bacteremia; results of combined therapy with penicillin and streptomycin." Am J Med **10**(3): 278-299.

Ruoff, K. L., L. de la Maza, et al. (1990). "Species identities of enterococci isolated from clinical specimens." J Clin Microbiol **28**(3): 435-437.

Rybkin, T., J. L. Mainardi, et al. (1998). "Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of beta-lactam resistance." J Infect Dis **178**(1): 159-163.

Sader, H. S., R. K. Flamm, et al. (2013). "Antimicrobial activity of daptomycin tested against Gram-positive pathogens collected in Europe, Latin America, and selected countries in the Asia-Pacific Region (2011)." Diagn Microbiol Infect Dis **75**(4): 417-422.

Sawicka-Grzelak, A., A. Rokosz, et al. (2006). "Clinical glycopeptide-resistant enterococci isolated from patients after solid organ transplantation." Transplant Proc **38**(1): 144-146.

Schouten, M. A., J. A. Hoogkamp-Korstanje, et al. (2000). "Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **19**(11): 816-822.

Schulte, B., A. Heining, et al. (2008). "Emergence of increasing linezolid-resistance in enterococci in a post-outbreak situation with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*." Epidemiol Infect **136**(8): 1131-1133.

Sifaoui, F., M. Arthur, et al. (2001). "Role of penicillin-binding protein 5 in expression of ampicillin resistance and peptidoglycan structure in *Enterococcus faecium*." Antimicrob Agents Chemother **45**(9): 2594-2597.

Simjee, S., D. G. White, et al. (2002). "Characterization of Tn1546 in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from canine urinary tract infections: evidence of gene exchange between human and animal enterococci." J Clin Microbiol **40**(12): 4659-4665.

Singh, K. V., G. M. Weinstock, et al. (2002). "An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin." Antimicrob Agents Chemother **46**(6): 1845-1850.

Smith, P. F., B. M. Booker, et al. (2005). "Comparative in vitro activities of daptomycin, linezolid, and quinupristin/dalfopristin against Gram-positive bacterial isolates from a large cancer center." Diagn Microbiol Infect Dis **52**(3): 255-259.

Smith, T. L., M. L. Pearson, et al. (1999). "Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group." N Engl J Med **340**(7): 493-501.

Steenbergen, J. N., J. Alder, et al. (2005). "Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections." J Antimicrob Chemother **55**(3): 283-288.

Stobberingh, E., A. van den Bogaard, et al. (1999). "Enterococci with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmers, turkey slaughterers, and (sub)urban residents in the south of The Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans?" Antimicrob Agents Chemother **43**(9): 2215-2221.

Swaney, S. M., H. Aoki, et al. (1998). "The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria." Antimicrob Agents Chemother **42**(12): 3251-3255.

Toh, S. M., L. Xiong, et al. (2007). "Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid." Mol Microbiol **64**(6): 1506-1514.

Tomasz, A. (1979). "The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria." Annu Rev Microbiol **33**: 113-137.

Top, J., R. Willems, et al. (2008). "Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen." FEMS Immunol Med Microbiol **52**(3): 297-308.

Willems, R. J., J. Top, et al. (2005). "Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex." Emerg Infect Dis **11**(6): 821-828.

Williamson, R., C. le Bouguenec, et al. (1985). "One or two low affinity penicillin-binding proteins may be responsible for the range of susceptibility of *Enterococcus faecium* to benzylpenicillin." J Gen Microbiol **131**(8): 1933-1940.

Wilson, D. N., F. Schluenzen, et al. (2008). "The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(36): 13339-13344.

Witte, W. (2004). "Glycopeptide resistant *Staphylococcus*." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **51**(8-9): 370-373.

Wolter, N., A. M. Smith, et al. (2005). "Novel mechanism of resistance to oxazolidinones, macrolides, and chloramphenicol in ribosomal protein L4 of the pneumococcus." Antimicrob Agents Chemother **49**(8): 3554-3557.

Wright, G. D., T. R. Holman, et al. (1993). "Purification and characterization of VanR and the cytosolic domain of VanS: a two-component regulatory system required for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147." Biochemistry **32**(19): 5057-5063.

Xu, X., D. Lin, et al. (2010). "vanM, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*." Antimicrob Agents Chemother **54**(11): 4643-4647.

Zscheck, K. K., R. Hull, et al. (1988). "Restriction mapping and hybridization studies of a beta-lactamase-encoding fragment from *Streptococcus (Enterococcus) faecalis*." Antimicrob Agents Chemother **32**(5): 768-769.

Zscheck, K. K. and B. E. Murray (1991). "Nucleotide sequence of the beta-lactamase gene from *Enterococcus faecalis* HH22 and its similarity to staphylococcal beta-lactamase genes." Antimicrob Agents Chemother **35**(9): 1736-1740.