

ANALYSIS OF SELECTED GENETIC TRAITS, PHENOTYPES, AND THE EPIDEMIOLOGICAL THREAT OF *ENTEROCOCCUS* BACTERIA RESISTANT TO VANCOMYCIN

Wojciech Rogóż, Daniel Sypniewski*, Ilona Bednarek

Department of Biotechnology and Genetic Engineering, School of Pharmacy with the Division of Laboratory Medicine
in Sosnowiec, Medical University of Silesia, Katowice, Poland

Received in January, accepted in November 2018

Abstract: Enterococci are Gram-positive bacteria that belong to facultative anaerobic cocci. Species belonging to the *Enterococcus* genus generally display little infectious potential, although they can cause serious nosocomial infections. The groups at high risk include patients with proliferative diseases, chronic liver diseases, and graft recipients. Since 1980s infections with enterococci resistant to numerous antibiotics have been observed with increasing frequency. There are two independent ways of developing resistance to vancomycin, connected with the common use of vancomycin for MRSA treatment and the non-medical use of this antibiotic. Nine phenotypes of vancomycin-resistant enterococcal strains can be distinguished: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM, VanN. These phenotypes differ at the molecular level to a different extent. Current treatments of enterococcal infections usually include drugs such as linezolid, quinupristin/dalfopristin, daptomycin, tigecycline, and chloramphenicol. Data available from Europe and other parts of the world indicate a constant increase in the number of emerging VRE isolates, as well as strains resistant to antibiotics other than vancomycin.

1. Introduction. 2. Infections with enterococci. 3. Treatment of enterococcal infections and antimicrobial resistance. 4. Development of VRE phenomenon. 5. Drugs used to control infections with VRE strains. 6. Routes of VRE spread. 7. VRE phenotypes. 8. Molecular characteristics of VRE phenotypes. 9. Epidemiological situation in the world. 10. Epidemiological situation in Poland. 11. Epidemiological situation in Europe. 12. Summary

ANALIZA WYBRANYCH CECH GENETYCZNYCH, FENOTYPÓW I ZAGROŻENIA EPIDEMIOLOGICZNEGO BAKTERIAMI Z RODZAJU *ENTEROCOCCUS* OPORNymi NA WANKOMYCYNĘ

Streszczenie: Enterokoki to bakterie Gram-dodatnie, należące do względnie beztlenowych ziarniaków. Gatunki należące do rodzaju *Enterococcus* na ogół mają niewielki potencjał infekcyjny, jednak mogą wywoływać groźne zakażenia szpitalne. Do grupy podwyższonego ryzyka zalicza się pacjentów z chorobami rozrostowymi, z przewlekłymi chorobami wątroby oraz po przeszczepach. Od lat osiemdziesiątych XX w. obserwuje się pojawiające się coraz częściej zakażenia enterokokami opornymi na liczne antybiotyki. Istnieją dwie, niezależne od siebie drogi rozwoju oporności na wankomycynę, związane z powszechnym leczeniem MRSA przy pomocy wankomycyny oraz jej zastosowaniem pozamedycznym. Wśród opornych na wankomycynę szczepów enterokoków można wyróżnić 9 fenotypów: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM, VanN. Wszystkie te fenotypy różnią się między sobą w większym lub mniejszym stopniu na poziomie molekularnym. Obecnie stosowanymi w leczeniu infekcji wywołanych enterokokami są m. in. linezolid, chinuprystyna/dalfoprystyna, daptomycyna, tigeicyklina i chloramfenikol. Posiadane obecnie dane, zarówno z terenu Europy, jak i całego świata wskazują na stały wzrost ilości pojawiających się izolatów VRE, jak również opornych na antybiotyki inne niż wankomycyna.

1. Wprowadzenie. 2. Zakażenia enterokokami. 3. Leczenie zakażeń enterokokami i antybiotykooporność. 4. Rozwój zjawiska oporności na wankomycynę. 5. Leki stosowane w zwalczaniu zakażeń szczepami opornymi na wankomycynę. 6. Drogi powstawania oporności na wankomycynę. 7. Fenotypy szczepów opornych na wankomycynę. 8. Charakterystyka molekularna fenotypów szczepów opornych na wankomycynę. 9. Sytuacja epidemiologiczna na świecie. 10. Sytuacja epidemiologiczna w Polsce. 11. Sytuacja epidemiologiczna w Europie. 12. Podsumowanie

Key words: antimicrobial resistance, *Enterococcus*, vancomycin, VRE

Słowa kluczowe: antybiotykooporność, *Enterococcus*, wankomycyna, VRE

1. Introduction

Enterococci are Gram-positive bacteria which belong to facultatively anaerobic cocci. They occur mainly in the intestines, where they constitute natural microflora, protecting against pathogens. They generally

have the form of diplococci or short chains. The genus *Enterococcus* is comprised of 38 species, but only some of them are clinically relevant – these include *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* and *E. casseliflavus* [1, 2]. The first species is very often isolated from the digestive system, especially of the large intestine, and

* Corresponding author: Daniel Sypniewski, PhD, Department of Biotechnology and Genetic Engineering Medical University of Silesia, ul. Jedności 8; 41-200 Sosnowiec, Poland; e-mail: dsypniewski@sum.edu.pl

the genitourinary system (approx. 39–95% of clinical trials), just like *E. faecium*, which, however, can be isolated much less frequently (in approx. 3–47% of clinical trials) [1]. Both of these species can be human pathogens. The other two, *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*, despite exhibiting natural resistance to vancomycin, appear sporadically (in about 5% of clinical samples in total) and are generally not pathogenic [3, 4].

Enterococci, in laboratory conditions, can be grown on widely available, non-selective enriched media, such as chocolate agar or blood agar. They also grow in the conditions of high concentrations of sodium chloride and bile salts. They are characterized by high temperature tolerance – they can grow in the range of 10–45°C. Around the colonies of enterococci on agar with sheep blood, haemolysis areas can be observed. In microscopic analysis, it is practically impossible to distinguish them from pneumococci (*Streptococcus pneumoniae*), therefore it is necessary to use biochemical tests. They show resistance to optochin, which is active against pneumococci and, moreover, they are not soluble in bile salts, and the PYR test result (presence of L-pyrrolydonyl arylamidase) is positive [4].

Despite generally small infectious potential, the species belonging to the genus *Enterococcus* may be the cause of dangerous nosocomial infections [4]. In the United States, they are one of the most frequently isolated micro-organisms from the gastrointestinal tract and wounds [3]. They do not form strong bacterial toxins, but possess many other virulence factors, which include:

- i surface adhesins, such as: a) ESP protein (enterococcal surface protein), whose task is to bind collagen to the surface of a bacterial cell. It occurs in *E. faecalis* and *E. raffinosus*. In the former species it is composed of 1972 amino acids and in the latter of 2311; it is encoded by *esp* gene [1, 4–6]. It is also a potential virulence factor in *E. faecium* [1]; b) polysaccharide glycolyx, which mediates binding to host cells, such as epithelial cells lining the surface of the vagina or intestine [4]; c) the aggregating substance (AS) present in the cell membrane. It enables bacterial cells to aggregate, bind to host cells, and also contributes to the horizontal transfer of plasmid DNA [4]. It is encoded by, for example, the *agg* gene or the *asa1* gene [7, 8].
- ii extracellular proteins such as: a) gelatinase and serine protease, which exhibit proteolytic activity against gelatine, haemoglobin, collagen and other proteins [4]; b) cytolysin exhibiting haemolytic activity and inhibiting the growth of Gram-positive bacteria; it may also contribute to local tissue damage [4]; it is composed of larger and smaller subunits, encoded by *cyl-L* and *cyl-S* genes [7] respectively; c) hyaluronidase, secreted by *E. faecium* strains from the CC17 clonal complex, occurring all over the world (including Poland); it is encoded by the gen *hyl_{Efm}* [1];

The virulence factors characteristic of *E. faecalis* are: cytolysin, gelatinase, hyaluronidase, suboxides, aggregating substance and surface adhesins, such as the Esp protein [9]. In the genome of *E. faecalis* *asa1* and *gelE* genes occur much more often than in *E. faecium*. *E. faecalis* produces particles enabling biofilm formation much more often than *E. faecium* [8].

2. Infections with enterococci

The high probability of infection with these pathogens is primarily associated with the usage of antibiotics with a broad spectrum of action [4]. The group of elevated risk includes patients with proliferative diseases, chronic liver diseases and recipients of transplanted organs. Due to the high resistance of enterococci to disinfectants and antiseptics, these bacteria are most often transported on the surface of the hands of medical personnel in hospitals [1]. Of great significance is the fact that *Enterococcus* bacteria can survive on hands for even up to 60 minutes [10]. The transfer of bacteria carrying genes which are resistant to vancomycin between animals and humans is possible. This phenomenon has been documented in the case of *E. faecium* and *E. faecalis* strains [11]. Under specific circumstances, enterococci may develop in other locations in the organism than their typical locations, for example in the respiratory system [4].

Bacteria of the genus *Enterococcus* are etiological factors of diseases such as endocarditis, sepsis, peritonitis, intra-abdominal abscesses, cholangitis or burn wounds [1]. Bacteria of the genus *Enterococcus*, which show presence of significant virulence factors, enabling the induction of infections difficult to treat (mainly in hospitals), can be classified as representatives of completely different clonal complexes. The clonal complex (CC – Clonal Complexes) is a group of bacterial clones whose representatives originate from a common ancestor and show mutual similarity at the molecular level, and sometimes also in terms of certain phenotypic traits, e.g. possession of virulence factors [12]. Clonal complexes are distinguished by means of the MLST molecular technique (MultiLocus Sequence Typing), in which the sequences of several gene alleles, encoding primary metabolism proteins, are analysed. These genes are expressed in all representatives of a given species at a similar level – for this reason they are called constitutive genes. In the *E. faecium* analysis carried out by Homan et al. [13], the following genes were considered: *adk* (gene encoding adenylate kinase), *atpA* (ATP alpha synthase gene coding), *ddl* (gene coding for D-alanine:D-alanine ligase), *gyd* (gene coding for 3-phosphoglyceric aldehyde dehydrogenase), *gdh* (gene encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase),

pstS (gene encoding ABC family transporter) and gene encoding the phosphoribosylaminoimidazole ATPase subunit [10, 12, 13].

The basic clonal complex of the species *E. faecium* is CC-17 popular in Europe and worldwide. Representatives of the CC-17 complex in the majority of cases show resistance to vancomycin (VER – *Vancomycin-Resistant Enterococcus*) [10]. The strains of this complex show presence of Esp protein and ability to produce hyaluronidase and the collagen-binding Acm protein. They are also resistant not only to vancomycin, but also to ampicillin and quinolones, such as ciprofloxacin [14, 15]. Due to the prevalence of CC-17, they are a significant problem both in Poland, in the USA and globally. The analysis carried out by Top et al. [16] shows that out of 217 VR *E. faecium* isolates, 97% (i.e. 211 isolates) were representatives of this clonal complex. CC-5, being popular in Europe, belongs to other clonal complexes of the species *E. faecium* and in the case of *E. faecalis* these are CC-2 and CC-9 [11, 17]. A team of researchers led by M. Kawalec, studying cloning complexes of isolates obtained from Polish hospitals until 2007, determined that in addition to the worldwide known CC-2 and CC-9, there have also occurred new groups of clones: CC-87 and CC-21. The first of them was responsible for the creation of four VRE foci, three of which were associated with the VanA phenotype, and one with VanB. The strains belonging to this clone demonstrated the ability to conduct a haemolysis process, but were not able to produce gelatinase [17].

3. Treatment of enterococcal infections and antimicrobial resistance

Standard treatment of enterococcal infections involves applying a combination of aminoglycoside with vancomycin or ampicillin [4]. The main problem in the treatment of enterococcal infections, however, is the high resistance of these bacteria to antibiotics [18]. It can be both innate and acquired. *E. faecium* exhibits its natural resistance to cephalosporins, lincosamides (e.g. clindamycin), trimethoprim with sulfamethoxazole, as well as to low concentrations of aminoglycosides [1, 4, 18]. The reason for this phenomenon is the low level of penetration of aminoglycosides into cells. This is the reason for combining the representatives of this group of antibiotics with drugs inhibiting cell wall synthesis – mainly ampicillin [19]. In addition, enterococci have naturally increased resistance to penicillins – in comparison to streptococci, they are from 10 to even 100 times less sensitive to β -lactam antibiotics (*E. faecalis*), while *E. faecium* is 4–16 times less sensitive than *E. faecalis* [1, 4, 19]. This is associated with the overexpression of PBP5 proteins (penicillin bind-

ing proteins), very often found in *E. faecium*, and much less frequently in the case of *E. faecalis*, and, to a much lesser extent, with the production of β -lactamases – this mechanism (conditioned by the plasmid gene) occurs, on the other hand, in enterococci very rarely [19]. Currently, it is assumed that 25% of enterococci strains, both *E. faecium* and *E. faecalis*, are resistant to high concentrations of aminoglycosides – such strains are called HLAR (High Level Aminoglycoside Resistance) [1, 4]. Resistance to gentamycin was first observed in the United States in 1979, in both *E. faecium* and *E. faecalis*, as well as gentamycin, tobramycin, amikacin, kanamycin and streptomycin in 1983 [20, 21]. The reason of this resistance may stem either from the enzymatic modification or degradation of the antibiotic (in the course of research on the mentioned samples from 1983, numerous enzymes have been detected, for example 3'-phosphotransferase, 2'-phosphotransferase or 6'-acetyltransferase [18, 21]), or from changing the structure of the site of antibiotic attachment to ribosomes [17]. The vast majority of *E. faecium* strains are resistant to ampicillin [4, 18].

4. Development of VRE phenomenon

The first reports on the emergence of vancomycin resistance in infections with the bacteria of the genus *Enterococcus*, i.e. occurrence of VRE strains, appeared in Europe, in Great Britain in 1988 (*E. faecalis* and *E. faecium*), and a year later in the United States [1, 22]. Very important from the epidemiological point of view was also the year 2002, during which the first case was recorded, when, through the horizontal transfer of genomes, the translocation of the *vanA* operon occurred between a representative of the genus *Enterococcus* with VanA phenotype and the bacterium *Staphylococcus aureus*, resistant to methicillin, i.e. between VRE and MRSA strains, resulting in the formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, insensitive to both methicillin and teicoplanin, i.e. the VRSA strain [1]. It is important that the strains classified as VRE are classified as XDR (eXtensively Drug Resistant). Belonging to this group means that the bacterium is currently only sensitive to one antibiotic from one or two groups which are intended to fight the representatives of its species [23].

5. Drugs used to control infections with VRE strains

In order to be able to cure the cases of VRE, it is necessary to use the latest antibacterial drugs, which unfortunately are not free of defects. The basic medicines used to treat VRE include linezolid. This antibiotic is one of

the oxazolidinone derivatives. The FDA recommends its use in case of infection with VRE *E. faecium*, but also for the control of MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) or penicillin-sensitive strains of *S. pneumoniae*. The mechanism of action of linezolid consists in inhibiting protein synthesis by interacting with the mRNA-tRNA complex and ribosome. This disrupts the formation of the initiation complex by binding the ribosomal 50S subunit and preventing the attachment of tRNA [4]. This antibiotic is effective mainly against Gram-positive aerobic and anaerobic bacteria [24]. Resistance to linezolid may be quite rare, but among the VRE it is perceivable. The first cases were reported in 2001 in 5 patients treated with linezolid [25]. Also in 2001, the first cases of resistance to the mentioned antibiotic were recorded in Great Britain (two isolates of *E. faecium* and one of *E. faecalis*) [26]. A point mutation was detected in the 23S rDNA encoding gene (G2576T mutation in nucleotide 2576), whose occurrence is correlated with the ineffectiveness of therapy, and thus may constitute one of the markers of linezolid resistance to linezolid with unknown mechanism [27].

Another medication treated as the so-called “last resort” drug is a mixture of quinupristin/dalfopristin. It is, however, ineffective in the case of *E. faecalis* infections. Fluoroquinolones inhibiting the synthesis of nucleic acids are also used, but unfortunately, are not very active in relation to vancomycin-resistant strains [4]. According to Leavis et al., the *parC*, *gyrA*, *parB* and *GyrE* genes are responsible for the resistance of VRE to fluoroquinolones, such as ciprofloxacin. Especially the mutations in the first two genes make the bacteria highly resistant to ciprofloxacin [28]. Next, it is worth paying attention to daptomycin. It is a cyclic peptide antibiotic used in therapy in the USA since 2003 [29]. However, as early as in 2005, the first report appeared on the occurrence of infection with a VRE strain of *E. faecium*, which was also insensitive to this antibiotic. Only replacing it with the combined administration of linezolid and doxycycline led to curing the patient [29–30].

Another example of the medication used to treat VRE is tigecycline. This semi-synthetic antibiotic, included in the glycylcycline group, exhibits bacteriostatic activity by disrupting the binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the bacterial ribosome as a result of binding to the 30S subunit. Although this is a highly modified tetracycline derivative, tigecycline is also active against non-resistant strains [31]. Tigecycline is also generally effective in the control of both MRSA, VRE and many *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemase [32]. It is used in accordance with the recommendation of KORLD (Polish acronym for: National Reference Centre for Antimicrobial Susceptibility), for the treatment of severe skin infections, subcutaneous tissues and abdominal cavity [33]. As with all available

drugs, resistance thereto has also been developed. In 2008, a patient was reported from an intensive care unit from a hospital in Germany, from whom a tigecycline-resistant *E. faecalis* strain was isolated [31].

Other sources suggest that chloramphenicol may be used to combat infections with VRE [34]. This drug induces inhibition of transpeptidation on bacterial ribosomes as a result of binding to their 50S subunit. Its spectrum of activity includes aerobic and anaerobic Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as rickettsiae. In general, it exhibits bacteriostatic activity. It is recommended that it should be used only in the most severe cases, due to numerous strong side effects. It causes strong suppression of the bone marrow, and can contribute to the occurrence of the grey syndrome in new-borns. It also adversely affects normal intestinal microflora [35]. During the years 2006–2007, VRE resistant to this drug strain was isolated from three patients in the University Hospital in Bydgoszcz [36].

6. Routes of VRE spread

Two different and independent patterns can be distinguished, according to which resistance to vancomycin was formed among the bacteria of the genus *Enterococcus*. One of the schemes took place in the USA, where vancomycin was an antibiotic commonly used during the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), as well as during the treatment of antibiotic diarrhoea induced by *Clostridium difficile*. The second scheme was observed in Europe, where, as a result of feeding farmed animals with feed enriched with the glycopeptide avoparcin, there occurred a transfer of VRE between animals and humans [1]. The US and Canada were the only major countries that had not introduced avoparcin in agricultural applications. Most probably, this is the reason for the fact that until 2008, the VRE strain was not isolated from any analysed sample from livestock in these countries. In Europe, however, in the 1990s, the presence of vancomycin-resistant *Enterococcus* in the intestinal microbiota of farm animals was common. The use of this antibiotic as a growth stimulant began in 1975. It was most often administered to pigs, turkeys and calves. The scale of the phenomenon is best illustrated by the fact that in 1994, in Denmark alone, about 24 kg of vancomycin was used in human therapy, and about 24.000 kg of avoparcin was used as a growth stimulant in agriculture. The first country to forbid the use of the aforementioned antibiotic was Sweden. This resulted in an avalanche of similar decisions, ended with EU Directive 97/6/EC, prohibiting the use of avoparcin in agriculture [14]. Unfortunately, such accidents did not end with the avoparcin incident. Still in 2000, it was reported that

antibiotics, identical to those used in clinical therapy, were commonly used in agriculture in Russia. Antibiotics are still used in a completely uncontrolled way in many countries around the world. The best example is shrimp farming in Asia [37]. Noteworthy is the phenomenon called the “the Swedish paradox”. It is manifested by the fact that despite a very short (especially compared to other European countries) duration of avoparcin application in this country – for less than 10 years, until 1984 – the incidence of VRE was very high there. It continued for just as long after the end of its application, although in other countries the number of isolated VREs decreased [14]. There were other VRE reservoirs on both continents. In the United States, these were hospitals and no strains outside the hospital environment were observed, while in Europe, animals were the reservoir [1].

7. VRE phenotypes

Among the strains of vancomycin-resistant enterococci, nine phenotypes can be distinguished. These are: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM, VanN [1]. One of them, VanC, is an example of natural (species-specific) resistance. It is a feature of species that do not pose a significant clinical threat: *E. gallinarum* (vanC1), *E. casseliflavus* (vanC2 and vanC4) and *E. faecescens* (vanC3). It is generally associated with a constitutive mechanism of resistance. Bacteria of the VanC phenotype exhibit low resistance to vancomycin and are at the same time sensitive to teicoplanin. The genes determining this phenotype are localised in the chromosomal DNA of bacteria and never undergo horizontal transfer [38–40]. Other phenotypes are an example of acquired resistance to glycopeptides [1]. The VanA,

VanB, VanD and VanM phenotypes are characterised by the modified structure of the murein precursor in which the D-Ala-D-Ala sequence in the final pentapeptide is replaced by the D-Ala-D-Lac depsipeptide [40]. In other phenotypes, i.e. VanC, VanE, VanG, VanL and VanN, the terminal sequence of the pentapeptide takes the form of: D-Ala-D-Ser [40]. Due to the fact that gene clusters conditioning the VanA and VanB phenotypes are located on mobile genome elements, such as transposons and plasmids, they are of greatest clinical significance. The most noticeable difference between these phenotypes is that VanA strains are resistant to both vancomycin and teicoplanin, and VanB only to vancomycin. There are three subtypes – VanB1, VanB2 and VanB3 – identified by the genetic differences between them. On the other hand, only a few *E. faecalis* strains, in which VanG and VanE phenotypes have been described, have shown full sensitivity to teicoplanin and resistance to vancomycin only at low concentrations [38]. In most countries around the world, especially in Europe, USA and South Korea, the VanA phenotype dominates, while VanB is more popular in Australia and Singapore [10]. In Poland, no phenotypes other than VanA, VanB and VanC have been detected, and the most frequently isolated strains have exhibited the VanA phenotype [1, 10]. Table I presents a summary of the most important features that differentiate the phenotypes of vancomycin-resistant enterococci.

8. Molecular characteristics of VRE phenotypes

There exists a set of genes which determine the VanA phenotype. They include *vanY*, *vanZ*, *ORF1*, *ORF2* (the latter two are not related to resistance, but enable the transposition to occur) and genes forming the *van* operon: *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanR* and *vanS* [3, 41].

Table I
Characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus* phenotypes

Phenotype	Vancomycin MIC (mg/L)	Teicoplanin MIC (mg/L)	Modification	Localization	Transfer capability	Expression	Major species
VanA	64–1000	16–512	d-Ala-d-Lac	Plasmid or chromosome	yes	induced	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
VanB	4–1000	0.5–1	d-Ala-d-Lac	Plasmid or chromosome	yes	induced	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
VanC	2–32	0.5–1	d-Ala-d-Ser	chromosome	no	Constitutive or induced	<i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>
VanD	64–128	4–64	d-Ala-d-Lac	Plasmid or chromosome	no	Constitutive or induced	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
VanE	8–32	0.5	d-Ala-d-Ser	chromosome	no	induced	<i>E. faecalis</i>
VanG	≤ 16	wrażliwy	d-Ala-d-Ser	chromosome	yes	induced	<i>E. faecalis</i>
VanL	8	≤ 0.5	d-Ala-d-Ser	chromosome	no	induced	<i>E. faecalis</i>
VanM	> 256	96	d-Ala-d-Lac	Plasmid or chromosome	yes	induced	<i>E. faecium</i>
VanN	16	≤ 0.5	d-Ala-d-Ser	plasmid	yes	constitutive	<i>E. faecium</i>

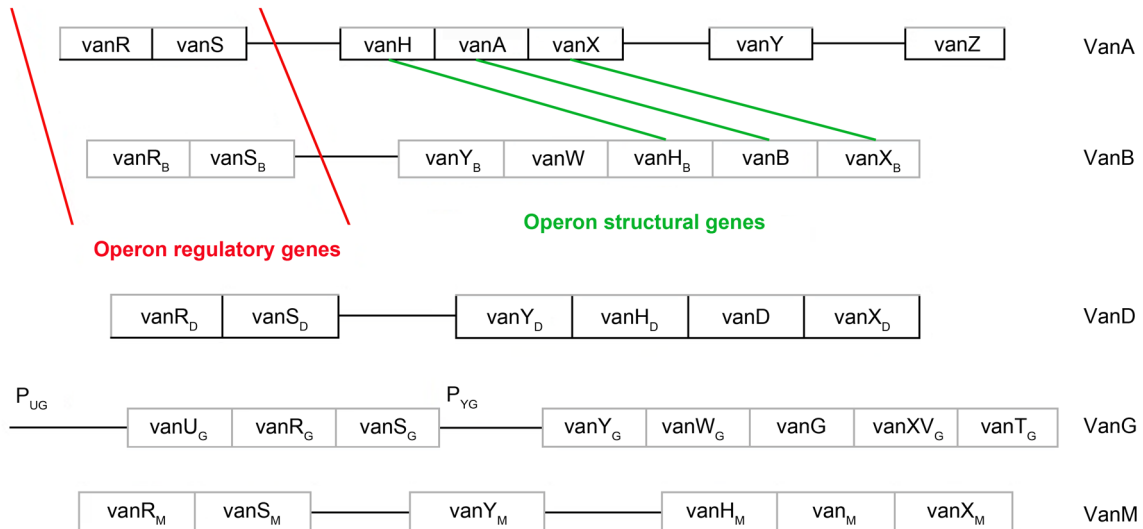


Fig. 1. The scheme of the gene cluster structure determining phenotypes VanA, VanB, VanD, VanG i VanM (based on [41, 47, 49, 52]).

They occur in the transposon Tn1546, located in plasmids pIP816. The genes associated with the VanA phenotype can also be found on numerous other plasmids, for example on pRUM, pS177, pWZ909, pLG1, Inc18, pSL1, pSL2, pIP816 [42–46]. The *vanY* and *vanZ* genes are not necessary for resistance, but they either increase its level (*vanY*) or impact the resistance to low concentrations of teicoplanin (*vanZ*). The van operon, in turn, is created by the structural genes (*vanH*, *vanA* and *vanX* – called the VanHAX protein genes) and the regulatory genes (*vanR* and *vanS*). The *vanA* gene encodes a D-dipeptide ligase that catalyses the formation of the D-Ala-D-Lac dipeptide. It is later integrated into the murein precursors in the cytoplasm instead of D-Ala-D-Ala. However, this will require generating D-lactate (D-Lac) – this is enabled by the dehydrogenase of the D-hydroxy acid, encoded by the *vanH* gene. In order for D-Ala-D-Ala moiety not to be formed parallel to D-Ala-D-Lac in the cell, the hydrolysis of the amide bond present therein is necessary. This reaction is catalysed by the DD-dipeptidase encoded by the *vanX* gene [3, 41, 47]. Regulatory genes, present in the operon, are in charge of initiating the transcription of the VanHAX protein complex, according to an induced mechanism. The appearance of vancomycin or teicoplanin in the environment stimulates autophosphorylation of the histidine kinase (phosphorylation of the His164 residue), which is a cell membrane protein, which in turn is a product of the expression of the *vanS* gene [48]. This enzyme, after autophosphorylation, catalyses the phosphorylation of Asp53 in the second element of the regulation system, i.e. the VanR protein. It is a transcription factor present in the cytoplasm, which as a result binds to the van operon promoter in a phosphorylated form, activating its transcription [3, 48]. Figure 1 shows the

pattern of the gene structure forming the VanA, VanB, VanD, VanG and VanM operons.

The strains belonging to the VanB phenotype have a set of genes with functions analogous to those of VanA. Therefore, the operon structure genes have been described as *vanB* and *vanX_B*, and regulatory genes have been described as *vanR_B* and *vanS_B*. There are also *vanY_B* and *vanW* genes – the latter is the only one that has no equivalent in the case of the VanA phenotype [47]. The genes affecting the VanB phenotype can be located in transposons Tn1549, Tn1547 and Tn5382 (the latter also contains a gene encoding an enzyme called Ant(3^{''})-Ia, affecting the resistance to aminoglycosides in enterococci). Their movement between bacterial chromosomes may occur [38].

The VanC and VanE phenotypes are genetically very similar. They contain operons formed from *vanC* or *vanE* (encoding the D-dipeptide ligase, which forms D-Ala-D-Ser) and *vanXY* (encoding D,D-dipeptidase-D,D-carboxypeptidase), *vanT* (encoding serine racemase, which enables the conversion of the L-serine available in the cell to D-serine) *vanR* and *vanS* encoding the operon regulatory protein and histidine kinase, respectively. The VanD phenotype is associated with an average level of resistance to vancomycin and teicoplanin. The genes affecting this phenotype occur in chromosomal DNA and so far there have been no reports stating that they can undergo transfer [38]. In the operon of this phenotype, there are also genes analogous to the those mentioned above: *vanR_D*, *vanS_D*, *vanY_D*, *vanH_D*, *vanD* and *vanX_D*. It has been confirmed that the genes affecting the VanD phenotype may be located, among others, on the Tn1546 transposon [49–50].

There are some differences in the operon of the VanG phenotype, where the whole structure is pre-

ceded by a three-element regulatory sequence (*vanU*). Next there are *vanR_G*, *vanS_G* (encoding the proteins mentioned above), *vanY_G* (encoding D,D-carboxypeptidase), *vanW* (of unknown function), followed by *vanG*, *vanXY_G* and *vanT_G* [51].

Recently described in more detail, the VanL phenotype has many features in common with the VanC and VanE phenotypes, but its serine racemase is encoded by two genes: *vanTm_L* and *vanTr_L*. Their similarity with *vanT* in the VanC phenotype is 51% and 49%, respectively. The VanN phenotype, like the two above, exhibits susceptibility to low concentrations of vancomycin and sensitivity to teicoplanin. There occurs an operon therein, containing the *vanN* gene, characteristic of it, which encodes the ligase and the *vanXY_N*, *vanT_N*, *vanR_N* and *vanS_N* genes with analogous functions as in the VanC and VanE phenotypes [50]. The VanM phenotype, discovered in *E. faecium* in 2010, is particularly interesting [52]. Characteristic of this phenotype is the occurrence of VanM ligase composed of 343 amino acids and conditioning resistance to vancomycin and teicoplanin. The similarity of the protein product of the *vanM* gene to the products of the expression of the genes *vanA*, *vanB*, *vanD* and *vanF* is on the following level, respectively: 79.9; 70.8; 66.3 and 78.8%. Secondly, the operon is created by *vanR_M*, *vanS_M*, *vanY_M*, *vanH_M*, *vanM* and *vanX_M* genes. In general, the structure of the operon is the most similar to that found in the VanD phenotype [52].

9. Epidemiological situation in the world

In 2003, researchers from Texas led by J.H. Jorgensen undertook research into the effectiveness of other antibiotics used in the fight against VRE. 156 isolates

were collected from 7 different facilities. Among them were 126 *E. faecium* isolates (VanA and VanB phenotypes numbering 109 and 17, respectively), 5 *E. faecalis* isolates (3 *vanA* and 2 *vanV*), 2 *E. avium* isolates (*vanA*), 1 *E. durans* isolate (*vanA*), 10 isolates of *E. gallinarum* (*vanC1*) and 12 isolates of *E. casseliflavus* (*vanC2*) [53]. The results of the team's research are summarized in Table II.

As presented in Table II, among the tested VRE strains with clinically significant phenotypes, the most samples showed resistance to ampicillin and doxycycline, with the lowest number to quinupristin/dalfopristin and linezolid. For these drugs, also the MIC50% and MIC90% figures were the lowest. Among the less clinically relevant VRE strains, the level of resistance is significantly lower. Interestingly, in the course of the analysis of the effect of daptomycin on VRE, it was established that the occurrence of the VanA or VanB phenotype does not significantly affect the effectiveness of the antibiotic [53].

Simner et al. analysed 2927 isolates of enterococci collected in Canada over the course of 6 years, until 2013. Only 4.2% showed resistance to vancomycin. All examined VREs belonged to *E. faecium*, and 90% of them displayed the VanA phenotype. During the analysed period, the incidence of VRE infections in hospitals had tripled [54]. In general, in the United States, the level of resistance to vancomycin among enterococci is much higher (approx. 33% of the tested *Enterococcus* isolates do not exhibit susceptibility to vancomycin) than in Canada (where VREs are below 10%) [55].

It is also worth paying attention to the epidemiological situation in other regions of the world. D. Ravi's team analysed the isolates of *Enterococcus* obtained from a hospital in Chennai, India between February 2013 and

Table II
Resistance to the selected antibiotics of VRE isolates collected from 7 different hospitals

Enterococci strains	Drug used	MIC (µg/ml)		% of resistant isolates
		50%	90%	
VanA and VanB strains	Daptomycin	4	8	Not determined
	Linezolid	2	2	1.5
	Quinupristin/dalfopristin	0.5	1	6.0
	Ampicillin	64	128	93.2
	Doxycycline	4	16	14.2
	Vancomycin	> 128	> 128	100
VanC1 and VanC2 strains	Daptomycin	1	2	Not determined
	Linezolid	2	2	0
	Quinupristin/dalfopristin	2	2	0
	Ampicillin	0.5	1	0
	Doxycycline	≤ 0.25	≤ 0.25	4.5
	Vancomycin	4	4	0

Based on the data from [53]

January 2014, from patients from different departments and age groups [56]. Out of the 200 samples included, the majority were representatives of *E. faecalis* (55%). The vast minority were other species: *E. faecium*, *E. avium*, *E. hirae*, *E. casseliflavus*, *E. durans* and *E. gallinarum*, representing, successively 29%; 10.5%; 3%; 1%; 1% and 0.5%. Only 2.5% of the isolates showed resistance to vancomycin. The same number was resistant to teicoplanin. Surprisingly, as many as 5% of enterococci strains were resistant to linezolid. Definitely the most of them were resistant to tetracycline and ciprofloxacin (47% of strains) and erythromycin (73% of strains) [56].

Japan is a country where VREs constitute a very small percentage of all enterococci. According to Suzuki et al., only 20 cases of VREs appeared in the Tokyo University hospital within 20 years until 2010. However, between 2011 and 2012, as many as nine isolates were detected in this facility, all of which exhibited the phenotype of VanB. The presence of the transposon Tn 5382, containing the genes determining this phenotype, was found in the analysed material [57].

The results of the analysis of spring and mineral water pollution, which was carried out between January 2013 and February 2014 in China, are interesting. 314 samples taken from 101 bottled water factories from ten different provinces of the Middle Kingdom were tested. 48 of them were contaminated with *E. faecalis*, but none of the detected strains were resistant to vancomycin nor to any of the other 11 antibiotics that were considered. On the other hand, several virulence genes were detected in the analysed bacteria: *asa1* (79.3% of strains, encoding a factor allowing attachment to eukaryotic cells), *ace* (39.3% of strains, encoding an adhesive protein which binds collagen, whereby it may limit the effectiveness of the immune system), or *gelE*, which was possessed by all the tested strains [58]. According to a study by Sun et al., in China the dominant VRE species is *E. faecium* and the phenotype VanA. Out of the 101 samples analysed, coming from 12 different hospitals, *E. faecium* constituted as many as 96 with the remaining 5 being *E. faecalis*. Almost all isolates (except for individual cases) exhibited the VanA phenotype. Among *E. faecium*, the vast majority was the clonal complex CC17, while in the case of *E. faecalis* it was CC4 [59]. Lai et al. demonstrated that there is a close, positive correlation between using teicoplanin and tigecycline to the incidence of VRE related infections related to healthcare in Taiwan [60].

Researchers from Brazil examined 93 VRE isolates (*E. faecium*) originating from 13 different hospitals. All strains were identified as having the VanA phenotype, due to the detected *vanA* gene. Only 6.5% of the isolates displayed the ability to form biofilms [61]. In another study conducted in the same country at Londrina University Hospital, the presence of four potential

virulence genes, present in isolated VRE strains, was verified. 40 isolates were tested for the presence of the following genes: *esp* (gene encoding the Esp protein), *gelE*, *efaA* and *cylA*. All the strains were resistant to vancomycin and teicoplanin. In each of the strains, at least one of the virulence genes mentioned above was confirmed. The presence of the *esp* gene (87.5% of strains) and the *efaA* gene (82.5% of strains) was established with the greatest frequency; *gelE* (70% of strains) and *cylA* (65% of strains) genes were less frequently detected. In 32.5% of isolates, all 4 genes were found to be present. Interesting is the fact that whenever the presence of the *efaA* gene was detected in the strain, it also had the *esp* gene [62].

Considering the participation of livestock in the transmission of drug-resistant microbial strains, alarming reports are coming from South Africa. In 2014, 400 samples of cows faeces from two remote farms were analysed there. Noteworthy is the fact that all animals had frequent contact with antibiotics from the group of penicillins (ampicillin, penicillin G), macrolides (tylosin: a commonly used antibiotic for the treatment of chickens and cattle, also available in Poland), as well as with quinolones (danofloxacin, used in agriculture to treat cattle as Advocin [63]). In 341 samples, strains of the genus *Enterococcus* were detected. Most of them were *E. faecium* (52.94% of isolates) and *E. durans* (23.53% of isolates). The remaining species were in definite minority. All the detected strains of enterococci were resistant to vancomycin (VRE) and cloxacillin. For other antibiotics: amikacin, cefalotin, streptomycin, penicillin G, clindamycin, neomycin and erythromycin, the percentage of resistant strains was 74%, 88%, 94%, 91%, 97%, 91% and 99% respectively. Antibiotics with the lowest resistance were successively: ciprofloxacin (12% strains), amoxicillin/clavulanic acid (8% strains) and imipenem (0.6% strains). No strain sensitive to all antibiotics was found, while two of the isolates were resistant to all 12 tested drugs, and other 7 strains were susceptible to only one of them. Molecular analysis showed the presence of the following virulence genes: *gelE* (97% of strains), *asa1* (94.11% of strains) and *esp* (79.4% of strains). At the same time, it was found that 65.29% of strains showed the presence of *vanC* genes, and 19.7% of strains displayed the presence of *vanB* genes. The presence of the *vanA* gene was not detected [64].

The next region covered by the VRE research was the Caribbean. Akpaka et al. collected 45 VRE samples from hospitals in Trinidad and Tobago. All the isolates were derived from patients after prolonged hospitalization with nosocomial infections. 84% of the strains were *E. faecium* containing the *vanA* gene, and the remaining 16% were *E. faecalis*, in whose DNA the presence of the *vanB* gene was detected. All strains were sensitive to linezolid, but at the same time 100% *E. faecalis* were resistant

to levofloxacin, ciprofloxacin, erythromycin and quinupristin/dalfopristin. Similarly, all *E. faecium* strains were resistant to levofloxacin, ciprofloxacin and erythromycin, but as many as 82% of the strains of this species were sensitive to quinupristin/dalfopristine. The analysed virulence factors in the bacteria under test were the genes: *esp*, detected in all isolates, which is often present in bacteria isolated from healthy carriers, and the *hyl* gene encoding hyaluronidase, the presence of which significantly increases the invasiveness of enterococci [65].

However, from the studies by Somily et al. investigating the incidence of VRE in Saudi Arabia, it appears that out of the 378 isolates of enterococci, only 17 showed resistance to vancomycin. 76% of them were members of the *E. faecium* species and the remaining 24% belonged to *E. gallinarum*. The VanA phenotype was exhibited by all VREs from the species *E. gallinarum* and most of the *E. faecium* [66].

10. Epidemiological situation in Poland

As can be seen in the graph shown in Fig. 2 in Poland over the years 2010–2015 there is a disturbing growth trend in both the number of *E. faecium* and *E. faecalis* strains resistant to vancomycin, isolated from the blood of patients (data from KORLD [67]). The percentage of the resistant strains of *E. faecium* is definitely higher (in 2014 they accounted for almost 20% of all isolates of this species) than vancomycin-resistant *E. faecalis*, whose largest percentage share occurred in 2015 (2.8%) [67]. Summing up the above data, it can be concluded that despite the much less frequent occurrence of *E. faecium* in the population as compared to *E. faecalis*, *E. faecium* is a key problem due to its frequently occurring vancomycin-resistant strains [1, 67].

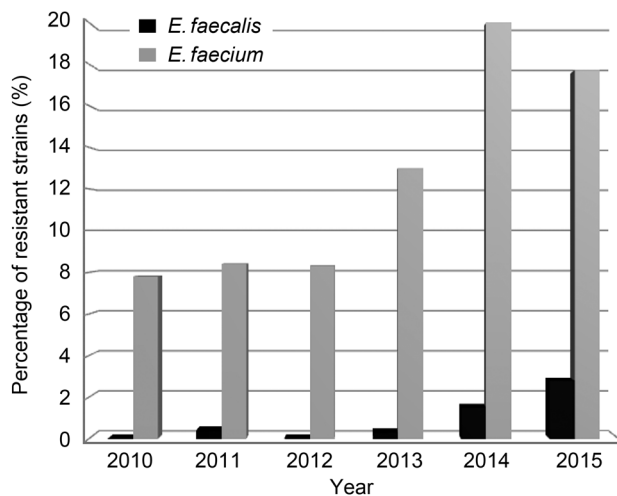


Fig. 2. Vancomycin resistance among *E. faecium* and *E. faecalis* strains isolated from blood samples of the Polish patients between 2010 and 2015 [67].

Talaga et al. analyzed 154 samples of enterococci from 4 different hospitals from the Lesser Poland region, collected over one year. The team's research points to the conclusion that vancomycin-resistant *Enterococcus* strains hold a small share in the total pool of bacteria tested. All of the *E. faecalis* strains showed sensitivity to the analysed antibiotics, including vancomycin. It was established that despite the general tendency of the VanA phenotype to dominate, in the Lesser Poland, *E. faecium* with the VanB phenotype has a larger percentage share in the VRE population than *E. faecium* with the VanA phenotype. All of the *E. faecium* isolates, including VREs, were sensitive to quinupristin/dalfopristin [68].

For the first time in Poland, VRE strains appeared in Gdańsk in 1999. It was *E. faecium* of the VanA phenotype. In the same year, for the first time, there also appeared a VRE isolate with the VanB phenotype (in Warsaw). Since then, isolated cases of local outbreaks have been reported every year. Among all the alarming factors reported in Polish hospitals, the percentage of VREs is relatively low – over the years 2012–2014 it fluctuated around 1–2% [1]. Although there are VREs in Poland both with the VanA and VanB phenotypes, VanA cases are much more common [1, 7, 66, 67]. Research in this field was conducted by, among others, the teams of Grzybowska et al., from the Transplantation Institute [69], and by Talaga-Ćwiertnia et al. [70]. As presented in Table III, the cases of VRE are relatively few compared to other alarming factors. Their number in successive years gradually increases. At the same time in 2014 it was noted that three groups of alarming factors were responsible for infections of surgery sites in hospitals only in 4.5%: MRSA, VRE and ESBL [71].

Despite the dominance of the bacteria of the VanA phenotype, pathogens with the VanB phenotype may become a considerable threat. Sadowy et al. analysed 278 VRE isolates with the VanB phenotype, collected over 11 years (1999–2010) in 22 Polish cities. It was found that the genes conditioning this phenotype are most often located in the *Tn1549* transposon – within the bacterial chromosome (81.65%) or in a plasmid

Table III

The specification of VRE isolates number and the percentages of all alarming factors at 195 Polish hospitals between 2012 and 2016 (data according to [71])

Year	No. of isolates	Percentage of all alarming factors
2016	50	1.14%
2015	34	0.81%
2014	No data	No data
2013	18	0.44%
2012	11	0.33%

(18%). Only in one case was it observed that the plasmid containing *Tn1549* was integrated into the bacterial chromosome. By 2006, the genes determining the VanB phenotype had been localized in plasmids, and in subsequent years they were found mainly in the bacterial chromosome [72]. Interesting research was carried out on samples classified as VRE, obtained from patients of the University Hospital in Bydgoszcz in 2005–2009. Kozusko et al. analysed the species composition of VREs and the effectiveness of various antibiotics in combating them. It was found that for 159 vancomycin-resistant strains, 133 belonged to *E. faecium* and only 26 to *E. faecalis*. In each consecutive year, the number of such isolates was greater. None of the isolates exhibited resistance to linezolid, only a very small number to chloramphenicol (3) and quinupristin/dalfopristine (1). Almost all the strains showed resistance to rifampicin and ciprofloxacin, and the level of resistance to gentamicin, ampicillin and penicillin was also very high (in none of the cases was it lower than 74%). The number of strains resistant to streptomycin in subsequent years decreased, reaching 25.8% in 2009, and the ones resistant to tetracycline oscillated between 20–30%. In the following years, the level of resistance to teicoplanin increased strongly (by 20% over 4 years), which indicates a steady increase in the share of strains with the VanA phenotype in the VRE population [36].

Relevant data on the genetic features of VRE *E. faecalis* are provided by the work of Łysakowska's team [7]. The authors investigated the presence of virulence genes among 161 strains from surgical wards of two hospitals in Łódź during the years 2005–2006. The affiliation of the strains to the analysed species was confirmed by detecting the D-alanine-D-alanyl ligase gene in the PCR reaction. The virulence genes being the object of search were: *agg*, *cyl-L* and *cyl-S*, *esp*, *gelE* and *sprE* gene. Only three strains did not show the presence of the analysed virulence genes. The *cyl-L* gene was identified in 52.2% of strains, the *agg* gene in 62.73% and the *esp* gene in 71.2% of *E. faecalis* strains. Over 80% of the strains possessed *gelE* and *sprE* genes (85.1% and 82.6% respectively). These were genes from the pool under test, most often present in the analysed strains. It is extremely important that the strains which were resistant to ampicillin (only 6.8%) possessed minimum three virulence genes at the same time. As many as 99 strains (or 61.49%) had four or more virulence genes [7].

The aim of the research conducted by Młynarczyk et al. was to examine the level of genetic similarity of 20 VRE strains isolated in 2005–2008 from samples of patients from three wards of the Infant Jesus Clinical Hospital in Warsaw. The phenotype of the tested VRE strains *E. faecium* was determined by means of a PCR reaction in which primers complementary to the DNA

of the genes encoding D-dipeptide ligase were used: *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* and *vanG*. Their presence confirms the occurrence of an appropriate phenotype (VanA, VanB, VanD, VanE and VanG). It was observed that all *E. faecium* isolates had the *vanA* ligase gene, and none of them had other searched-for genes. This confirmed that all VRE strains exhibited the VanA phenotype. The analysed strains exhibited a high diversity at the genome level. 12 of them came from patients treated in the same Intensive Care Unit [40]. At the same hospital, the number of VRE infections was analysed over the years 1998–2005, which marks the very beginning of the history of VRE presence in Poland. Over the years, the number of *Enterococcus*-type infections steadily grew (from 293 isolates in 1998 to 1185 isolates in 2005), but cases of VRE began to appear from 2003, when 11 isolates were obtained. In the following year there were 13, and in 2005 as many as 64 isolates. This means a steady upward trend [40, 73].

Additionally, 195 isolates of the bacteria of the genus *Enterococcus* bacteria originating from industrial pig farms in the Kuyavian-Pomeranian Province were tested. Skowron et al. established that the dominant species was *E. hirae* (68%), while the remaining species had a significantly smaller share in the population (*E. faecalis* 21%, *E. faecium* 3%). Only 2 isolates, with the VanC phenotype [74], exhibited resistance to vancomycin.

11. Epidemiological situation in Europe

The study by Orsi et al. points to the conclusion that there is a great diversity in the frequency of VRE occurrence in Europe. VREs are definitely more common in the south of Europe than in the north [75]. Schouten et al. carried out an analysis of VRE cases in Europe. Thanks to the cooperation of 49 laboratories from 27 European countries, 4208 isolates of *Enterococcus* were collected from clinical trials. It was found that among them there were 18 VRE cases with the VanA phenotype and 5 with the VanB phenotype. In turn, there were 71 isolates featuring the VanC phenotype. The VanA phenotype was most frequently found in the tests from Great Britain (2.7%), and VanB in isolates from Slovenia (2%). The VanC phenotype was most prevalent in the isolates from Latvia (14.3%) and Turkey (11.7%). Among these samples, *E. gallinarum* dominated over *E. casseliflavus*. Based on these data, it can be concluded that in Europe the occurrence frequency of VREs possessing the most dangerous phenotypes is relatively low [76]. When analysing the level of threat from antibiotic resistant strains of bacteria in the Old Continent, it is advisable to pay attention to EARS-Net network reports. According to these reports, in all

countries except Greece, VRE *E. faecalis* infections are not a clinically significant problem, as opposed to VRE *E. faecium*. Until 2009, Poland looked very favourable, compared to other European countries, as infections with the aetiology of *E. faecium* VRE represented no more than 5% of all those caused by this bacterium. Unfortunately, in 2012, Poland was included in the group, where this figure is between 5 and 10%, and in 2015 it was moved to the group in which this parameter fluctuates between 10 and 25% [1, 77].

The reason for these alarming changes may be the fact that Poland shares its borders with countries where this ratio had been higher much earlier (Czech Republic, Germany, Lithuania). The level of this ratio in the countries which Poles deem interesting as holiday resorts (Greece, Italy), or as the destination of their economic emigration (Ireland, Great Britain) is of considerable significance too [77]. One of the reasons for the observed distribution of VREs in Europe may be different guidelines on the use of antibiotics, or information campaigns and the education level of the public. Animals can also be a vector for enterococci, e.g. dogs. Kubašová et al. analysed 160 samples of enterococci derived from 105 animals in eastern Slovakia. *E. faecium* was found in 57.5% of them, *E. faecalis* in 21.9%, *E. hirae* in 17.5%, and the remaining species were few. As many as 71.9% of the strains showed resistance to teicoplanin. However, what is most puzzling is the fact that 9 strains of *E. faecium* had a marker specific to nosocomial infections [78].

According to the analysis of Remschmidt et al., in Germany the threat from the VRE is on the rise. The percentage of VREs among enterococci varies widely between individual federal states: the highest one is in central Germany (Berlin, North Rhine-Westphalia, Hesse, Saarland, Saxony-Anhalt, Saxony and Thuringia), where VREs are above 10% of all enterococci,

and the lowest one occurs in the north. This tendency did not change over the years 2007–2016. 12,659 isolates of enterococci from hospital samples were recorded, and 833 of them showed resistance to vancomycin [79]. In turn, Gastmeier et al. demonstrated that in Germany, over the period of 2007–2012, the rate of VRE infections increased from 0.87% to 4.58% in the case of postoperative wounds and from 4.91% to 12.99% in the case of blood infections [80].

An interesting analysis of VRE strains from the *E. faecium* species was carried out by researchers from Turkey. They tested 55 isolates containing vancomycin-resistant bacteria. All the strains were resistant to penicillin G, ampicillin and gentamycin. At the same time, they were sensitive to linezolid and quinupristin/dalfopristine. 22 isolates that were obtained from patients showing symptoms of infection were considered invasive, and the remaining 33, which came from the colonized rectum of patients without symptoms of bacterial infection, were considered non-invasive. In all the strains the presence of the *vanA* gene was demonstrated. No virulence genes were detected in 14 isolates. One such gene, *esp*, was present in 39 isolates, two genes in one isolate (*esp* and *ebpA*; the latter encoding the peptide A subunit associated with biofilm formation in endocarditis [81]) – as well as 5 additional genes: *esp*; *ebpA*; *asa1*; *gelE* and *cpd*. There was a noticeable tendency whereby among the invasive strains, the presence of virulence genes was low [82].

Pinholt et al. analysed 495 VRE *E. faecium* samples from several hospitals in Denmark over the years 2012–2014. It was established that at the beginning of the study, the majority of the VRE population consisted of four large groups of bacteria with close phylogenetic relationships within the groups. As time passed, there was a steady increase in the diversity of microorganisms; new, less numerous groups were formed. Some

Table IV
Percentages of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in the European countries between 2012 and 2015 (data according to [77])

Percentages of vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecium</i> isolates	2012	2015
Below 1%	Iceland, Norway, Sweden, Finland, Estonia, the Netherlands, France, Slovenia, Croatia, Bulgaria	Iceland, Norway, Sweden, Finland, Estonia, France, Belgium
1–5%	Spain, Belgium, Denmark, Austria, Slovakia, Hungary, Romania	Spain, Denmark, the Netherlands, Austria, Slovenia
5–10%	Latvia, Lithuania, Poland, Italy	Czechia (Czech Republic)
10–25%	Great Britain, Portugal, Germany, Czechia (Czech Republic), Greece, Cyprus	Great Britain, Portugal, Germany, Poland, Latvia, Lithuania, Slovakia, Hungary, Italy, Bulgaria, Greece
25–50%	Ireland	Ireland, Croatia, Romania, Cyprus
over 50%	–	–

of them caused the epidemic and disappeared, while others were present in several different locations throughout the duration of the study [83].

12. Summary

Antibiotic resistance among the bacteria which are representatives of the genus *Enterococcus* is becoming an increasingly important problem for modern health care. Years of negligence associated with the reckless use of antibiotics have resulted in a growing number of strains resistant not only to standard pharmacological agents intended for their control, but also to the “last resort” drugs. Understanding the molecular determinants of resistance mechanisms may be one of the ways to reduce the threat posed by antibiotic-resistant enterococci.

Acknowledgements

The article was translated by EURO-ALPHABET from Polish into English under agreement 659/P-DUN/2018 and funded by the Ministry of Science and Higher Education.

Bibliography

- Talaga K., Bulanda M.: Czy enterokoki odporne na wankomycynę stanowią problem w polskich szpitalach? *Przegl. Epidemiol.* **69**, 861–864 (2015)
- Mutters N.T., Mersch-Sundermann V., Mutters R., Brandt C., Schneider-Brachert W., Frank U.: Control of the spread of vancomycin-resistant enterococci in hospitals: epidemiology and clinical relevance. *Dtsch. Arztebl. Int.* **110**, 725–731 (2013)
- Cetinkaya Y., Falk P., Mayhall C.G.: Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 686–707 (2000)
- Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A.: *Mikrobiologia*. Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2011, s. 237–240.
- Surface protein ESP [*Enterococcus faecium*], https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_016252734.1 (29.12.2017)
- Surface protein ESP [*Enterococcus raffinosus*], https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_016250137.1 (29.12.2017)
- Łysakowska M.E., Śmigielski J., Denys A.: Występowanie genów zjadliwości wśród szczepów *Enterococcus faecalis* izolowanych od pacjentów i ze środowiska szpitalnego. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **61**, 125–132 (2009)
- Comerlato C.B., de Resende M. C.C., Caierão J., d' Azevedo P.A.: Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz.* **108**, 590–595 (2013)
- Kayaoglu G., Ørstavik D.: Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, **15**, 308–320 (2004)
- Szczypta A., Talaga K., Bulanda M.: Enterokoki odporne na wankomycynę jako czynniki etiologiczne zakażeń związanych z opieką zdrowotną – chorobotwórczość i metody kontroli. *Hygeia Public Health*, **51**, 134–140 (2016)
- Freitas A.R., Peixe L. i wsp.: Human and swine hosts share vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* CC17 and CC5 and *Enterococcus faecalis* CC2 clonal clusters harboring Tn1546 on indistinguishable plasmids. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 925–931 (2011)
- Szczypta K., Wilemska J., Hryniewicz W., Sitkiewicz I.: Epidemiologia zakażeń *Streptococcus pyogenes*, struktura klonalna populacji, antybiotykooporność. *Post. Mikrobiol.* **52**, 223–232 (2013)
- Homan W.L., Tribe D., Poznanski S., Li M., Hogg G., Spalburg E., van Embden J.D., Willems R.J.: Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1963–1971 (2002)
- Nilsson O.: Vancomycin resistant enterococci in farm animals – occurrence and importance. *Infect. Ecol. Epidemiol.* DOI: 10.3402/iee.v2i0.16959 (2012)
- Top J., Willems R., van der Velden S., Asbroek M., Bonten M.: Emergence of clonal complex 17 *Enterococcus faecium* in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 214–219 (2008)
- Top J., Willems R., Blok H., de Regt M., Jalink K., Troelstra A., Goorhuis B., Bonten M.: Ecological replacement of *Enterococcus faecalis* by multiresistant clonal complex 17 *Enterococcus faecium*. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 316–319 (2007)
- Kawalec M., Pietras Z., Daniłowicz E., Jakubczak A., Gniadkowski M., Hryniewicz W., Willems R.J.: Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish hospitals: characterization of epidemic clones. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 147–153 (2007)
- Miller W.R., Munita J.M., Arias C.A.: Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **12**, 1221–1236 (2014)
- O’Driscoll T., Crank C.W.: Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect. Drug Resist.* **8**, 217–230 (2015)
- Horodniceanu T., Bougueleret L., El-Solh N., Bieth G., Delbos F.: High-level, plasmid-borne resistance to gentamicin in *Streptococcus faecalis* subsp. *zymogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**, 686–689 (1979)
- Mederski-Samoraj B.D., Murray B.E.: High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of enterococci. *J. Infect. Dis.* **147**, 751–757 (1983)
- Uttley A.H., Collins C.H., Naidoo J., George R.C.: Vancomycin-resistant *Enterococci*. *Lancet*, **332**, 57–58 (1988)
- Żabicka D., Literacka E., Bojarska K.: MDR, XDR, PDR – jednolite, międzynarodowe definicje nabytej oporności drobnoustrojów na antybiotyki. Aktualności Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków, 3 (2012), http://www.antybiotyki.edu.pl/pdf/biuletyn/biuletyn_npoa_3-2012.pdf (29.12.2017)
- Tomczak S., Dettlaff K., Jelińska A.: Linezolid i jego analogi – perspektywy i ograniczenia terapii. *Farm. Współcz.* **8**, 227–234 (2015)
- Gonzales R.D., DaPaul M., Schreckenberger C., Graham M.B., Swathi-Kelkar D., Besten K.D., Quinn J.P.: Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet*, **357**, 1179 (2001)
- Auckland C., Teare L., Cooke F., Kaufmann M.E., Warner M., Jones G., Bamford K., Ayles H., Johnson A.P.: Linezolid-resistant *Enterococci*: report of the first isolates in the United Kingdom. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 743–746 (2002)
- Herrero I.A., Inmaculada A., Issa N.C., Patel R.: Nosocomial spread of linezolid-resistant, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *New Engl. J. Med.* **346**, 867–869 (2002)
- Leavis H.L., Willems R.J., Top J., Bonten M.J.: High-level ciprofloxacin resistance from point mutations in *gyrA* and *parC* confined to global hospital-adapted clonal lineage CC17 of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1059–1064 (2006)
- Lewis J.S., Owens A., Cadena J., Sabol K., Patterson J.E., Jorgensen J.H.: Emergence of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1664–1665 (2005)
- Montero C.I., Stock F., Murray P.R.: Mechanisms of resistance to daptomycin in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1167–1170 (2008)

31. Guido W., Gfrörer S., Fleige C., Witte W., Klare I.: Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from a German intensive care unit patient. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 1182–1183 (2008)
32. Cordina C., Hill R., Deshpande A., Hood J., Inkster T.: Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* associated with omeprazole use in a surgical patient. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 1806–1807 (2012)
33. Żabicka D., Stefaniuk E., Hryniewicz W.: Tigecyklina – aktywność wobec *Acinetobacter* ssp. http://www.korld.edu.pl/pdf/TIGECYKLINA_opracowanie_wer_ost.pdf (29.12.2017)
34. Ricaurte J.C., Boucher H.W., Turett G.S., Moellering R.C., Labombardi V.J., Kislak J.W.: Chloramphenicol treatment for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**, 17–21 (2001)
35. Eliakim-Raz N., Lador A., Leibovici-Weissman Y., Elbaz M., Paul M., Leibovici L. Efficacy and safety of chloramphenicol: joining the revival of old antibiotics? Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 979–996 (2015)
36. Kożuszek S., Bogiel T., Gospodarek E.: *Enterococcus* sp. odporne na wankomycynę. *Dośw. Mikrobiol.* **61**, 351–357 (2009)
37. Holmström K., Gräslund S., Wahlström A., Pongshompoo S., Bengtsson B., Kautsky N.: Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental and human health. *Int. J. Food Sci. Technol.* **38**, 255–266 (2003).
38. Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Łaniewska-Trokenheim Ł.: Oporność na antybiotyki bakterii z rodzaju *Enterococcus* występujących w żywności. *Kosmos*, **66**, 67–79 (2017)
39. Kuch A., Żabicka D., Hryniewicz W.: Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2009. Oznaczanie wrażliwości *Enterococcus* spp. Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów. <http://www.korld.edu.pl/pdf/04-Rek2009-Enterokoki.pdf> (29.12.2017)
40. Młynarczyk A., Grzybowska W., Mrówka A., Tyski S., Młynarczyk G.: Genetyczne podobieństwo opornych na wankomycynę szczepów *Enterococcus faecium* izolowanych z materiału klinicznego. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **62**, 297–302 (2010)
41. Lebreton F., Depardieu F., Bourdon N., Fines-Guyon M., Berger P., Camiade S., Leclercq R., Courvalin P., Cattoir V.: d-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4606–4612 (2011)
42. Zhu W., Murray P.R., Huskins W.C., Jernigan J.A., McDonald L.C., Clark N.C., Anderson K.F., McDougal L.K., Hageman J.C., Olsen-Rasmussen M., Frace M., Alangaden G.J., Chenoweth C., Zervos M.J., Robinson-Dunn B., Schreckenberger P.C., Reller L.B., Rudrik J.T., Patell J.B.: Dissemination of an *Enterococcus* Inc18-Like vanA Plasmid Associated with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **54**, 4314–4320 (2010)
43. Wardal E., Markowska K., Żabicka D., Wróblewska M., Giemza M., Mik E., Połowniak-Pracka H., Woźniak A., Hryniewicz W., Sadowy E.: Molecular Analysis of VanA Outbreak of *Enterococcus faecium* in Two Warsaw Hospitals: The Importance of Mobile Genetic Elements. *Biomed Res Int.* **2014**: 575367 (2014)
44. Freitas A.R., Novais C., Tedim A.P., Francia M.V., Baquero F., Peixe L., Coque T.M.: Microevolutionary Events Involving Narrow Host Plasmids Influences Local Fixation of Vancomycin-Resistance in *Enterococcus* Populations. *PLoS One*. **8**, e60589 (2013)
45. Lim S.K., Tanimoto K., Tomita H., Ike Y.: Pheromone-responsive conjugative vancomycin resistance plasmids in *Enterococcus faecalis* isolates from humans and chicken feces. *Appl Environ Microbiol.* **72**, 6544–53 (2006)
46. Kelli L. Palmer K.L., Veronica N. Kos V.N., Gilmore M.S.: Horizontal Gene Transfer and the Genomics of Enterococcal Antibiotic Resistance. *Current Opinion in Microbiology* **13**, 632–639 (2010)
47. Faron M.L., Ledebouer N.A., Buchana B.W.: Resistance mechanisms, epidemiology, and approaches to screening for vancomycin-resistant *Enterococcus* in the health care setting. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 2436–2447 (2016)
48. Hasman H., Aarestrup F.M., Dalsgaard A., Guardabassi L.: Heterologous expression of glycopeptide resistance vanHAX gene cluster from soil bacteria in *Enterococcus faecalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 648–653 (2006)
49. Depardieu F., Reynolds P.E., Courvalin P.: VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* 10/96A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 7–18 (2003)
50. Lebel S., Bouttier S., Lambert T.: The *cme* gene of *Clostridium difficile* confers multidrug resistance in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **238**, 93–100 (2004)
51. Boyd D.A., Willey B.M., Fawcett D., Gillani N., Mulvey M.R.: 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**, 2667–2672 (2008)
52. Xu X., Wang M. i wsp.: vanM, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4643–4647 (2010)
53. Jorgensen J.H., Crawford S.A., Kelly C.C., Patterson J.E.: In vitro activity of daptomycin against vancomycin-resistant enterococci of various Van types and comparison of susceptibility testing methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3760–3763 (2003)
54. Simner P. J., Zhanel G.G. i wsp.: Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in Canadian hospitals (CANWARD study, 2007 to 2013). *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 4315–4317 (2015)
55. Zhanel G.G., Hoban D.J. i wsp.: Antimicrobial-resistant pathogens in intensive care units in Canada: results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) study, 2005–2006. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1430–1437 (2008)
56. Ravi D., Rompicherla V., Govindan G., Shanmugam P.: Speciation of enterococcal isolates in a tertiary care hospital and molecular characterisation of vancomycin resistant enterococci (VRE). *Ind. J. Microbiol. Res.* **3**, 77–81 (2016)
57. Suzuki M., Koyano S., Okugawa S., Okazaki M., Seki G., Moriya K.: Diversity of vancomycin-resistant enterococci in a low endemicity area. *J. Glob. Antimicrob. Res.* **2**, 115–118 (2014)
58. Wei L., Wu Q., Jumei Z., Weipeng G., Moutong C., Liang X., Juan W., Lianying M.: Prevalence and genetic diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from mineral water and spring water in China. *Front. Microbiol.* DOI: 10.3389/fmicb.2017.01109 (2017)
59. Sun H., Wang H., Xu Y., Jones R.N., Costello A.J., Liu Y., Li G., Chen M., Mendes R.E.: Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. clinical isolates recovered from hospitalized patients among several medical institutions in China. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **74**, 399–403 (2012)
60. Lai Ch.Ch., Chub Ch-Ch., Cheng A., Huang Y.T., Hsuehd P.R.: Correlation between antimicrobial consumption and incidence of health-care-associated infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci at a university hospital in Taiwan from 2000 to 2010. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **48**, 431–436 (2015)
61. Alves G.D.S., Pereira M.F., Bride L.L., Nunes A.P.F., Schuenck R.P.: Clonal dissemination of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST412 in a Brazilian region. *Braz. J. Infect. Dis.* DOI: 10.1016/j.bjid.2017.07.001 (2017)
62. Ruzon F.I., de Paula S.B., Kanoshiki R.L., Pereira-Santos J., Kerbaux G., Kobayashi R.K., Yamada-Ogatta S.F.: Virulence

- determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* vanA isolated from different sources at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. *J. Microbiol.* **48**, 814–821 (2010)
63. Charakterystyka produktu leczniczego weterynaryjnego (Advocin 180), http://www.zoetis.com.pl/global-assets/private/zoetis_com_pl_advocin_180_2013_06.pdf (29.12.2017)
 64. Iweriebor B.C., Obi L.C., Okoh A.I.: Macrolide, glycopeptide resistance and virulence genes in *Enterococcus* species isolates from dairy cattle. *J. Med. Microbiol.* **65**, 641–648 (2016)
 65. Akpaka P.E., Kissoon S., Jayaratne P.: Molecular analysis of vancomycin-resistant enterococci isolated from regional hospitals in Trinidad and Tobago. *Adv. Med.* DOI: 10.1155/2016/8762691 (2016)
 66. Somily A.M., Al-Mohizea M.M., Absar M.M., Fatani A.J., Ridha A.M., Al-Ahdal M.N., Senok A.C., Al-Qahtani A.A.: Molecular epidemiology of vancomycin resistant enterococci in a tertiary care hospital in Saudi Arabia. *Microb. Pathog.* **97**, 79–83 (2016)
 67. Żabicka D.: Monitorowanie oporności w Polsce – dane sieci EARS-Net. http://www.korld.edu.pl/pdf/Monitorowanie_dane_2016_strona_KORLD.pdf (29.12.2017)
 68. Talaga K., Odrowąż-Konduracka D., Paradowska B., Jagiencarz-Starzec B., Wolak Z., Bulanda M., Szczypka A.: Typing of *Enterococcus* spp. strains in 4 hospitals in the Małopolska region in Poland. *Adv. Clin. Exp. Med.* **27**, 111–117 (2018)
 69. Grzybowska W., Młynarczyk G. et al.: Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* among patients of transplantology wards. *Transplant. Proceed.* **41**, 3256–3257 (2009)
 70. Talaga-Ćwiertnia K., Bulanda M.: Analiza sytuacji epidemiologicznej zakażeń wankomycynoopornymi *Enterococcus faecium* na świecie, z uwzględnieniem obecnej sytuacji w Polsce *Przeegl. Epidemiol* **72**, 3–15 (2018)
 71. Kucharska I., Rychlewska A.: Szpitalne ogniska epidemiczne w Polsce w 2014 roku. Warszawa 21 września 2015 r., <http://www.antybiotyki.edu.pl/pdf/ogniskaepid3.pdf> (29.12.2017)
 72. Sadowy E., Gawryszewska I., Kuch A., Żabicka D., Hrynkiewicz W.: The changing epidemiology of VanB *Enterococcus faecium* in Poland. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **37**, 927–936 (2018)
 73. Młynarczyk G., Młynarczyk A., Brzuskiewicz E., Łuczak M.: Oporność na antybiotyki glikopeptydowe szczepów z rodzaju *Enterococcus* izolowanych w latach 1997–2000 w szpitalu klinicznym w Warszawie. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **53**, 321–330 (2001)
 74. Skowron K., Jeleńska A., Paluszak Z., Szala B.: Prevalence and distribution of VRE (vancomycin resistant enterococci) and VSE (vancomycin susceptible enterococci) strains in the breeding environment *Ann. Agric. Environ. Med.* **23**, 231–236 (2016)
 75. Orsi G.B., Ciorba V.: Vancomycin resistant enterococci health-care associated infections. *Ann. Ig.* **25**, 485–492 (2013)
 76. Schouten M.A., Hoogkamp-Korstanje J.A., Meis J.F., Voss A., European VRE Study Group: Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**, 816–822 (2000)
 77. Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union, EARS-Net surveillance data, November 2016, https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/antibiotics-EARS-Net-summary-2016_0.pdf (29.12.2017)
 78. Kubašová I., Stropfiová V., Lauková A.: Safety assessment of commensal enterococci from dogs. *Folia Microbiol. (Praha)*, DOI: 10.1007/s12223-017-0521-z (2017).
 79. Remschmidt C., Schröder C., Behnke M., Gastmeier P., Geffers C., Kramer T.S.: Continuous increase of vancomycin resistance in enterococci causing nosocomial infections in Germany – 10 years of surveillance. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, **7**, 54 (2018)
 80. Gastmeier P., Schro C., Behnke M., Meyer E., Geffers C.: Dramatic increase in vancomycin-resistant enterococci in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 1660–1664 (2014)
 81. Endocarditis and biofilm-associated pilus subunit A [*Enterococcus faecalis* 62], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/323480330> (29.12.2017)
 82. Gozalan A., Durmaz R. i wsp.: Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains isolated from carriage and clinical samples in a tertiary hospital, Turkey. *J. Med. Microbiol.* **64**, 759–766 (2015)
 83. Pinholt M., Gumpert H., Bayliss S., Nielsen J.B., Vorobieva V., Pedersen M., Feiln E., Worning P., Westh H.: Genomic analysis of 495 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* reveals broad dissemination of a vanA plasmid in more than 19 clones from Copenhagen, Denmark. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 40–47 (2017)

ANALIZA WYBRANYCH CECH GENETYCZNYCH, FENOTYPÓW I ZAGROŻENIA EPIDEMIOLOGICZNEGO BAKTERIAMI Z RODZAJU *ENTEROCOCCUS* OPORNymi NA WANKOMYCYNĘ

Wojciech Rogóż, Daniel Sypniewski*, Ilona Bednarek

Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, Wydział Farmaceutyczny
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Wpłynęło w styczniu, zaakceptowano w listopadzie 2018 r.

Streszczenie: Enterokoki to bakterie Gram-dodatnie, należące do względnie beztlenowych ziarniaków. Gatunki należące do rodzaju *Enterococcus* na ogół mają niewielki potencjał infekcyjny, jednak mogą wywoływać groźne zakażenia szpitalne. Do grupy podwyższonego ryzyka zalicza się pacjentów z chorobami rozrostowymi, z przewlekłymi chorobami wątroby oraz po przeszczepach. Od lat osiemdziesiątych XX w. obserwuje się pojawiające się coraz częściej zakażenia enterokokami opornymi na liczne antybiotyki. Istnieją dwie, niezależne od siebie drogi rozwoju oporności na wankomycynę, związane z powszechnym leczeniem MRSA przy pomocy wankomycyny oraz jej zastosowaniem pozamedycznym. Wśród opornych na wankomycynę szczepów enterokoków można wyróżnić 9 fenotypów: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM, VanN. Wszystkie te fenotypy różnią się między sobą w większym lub mniejszym stopniu na poziomie molekularnym. Obecnie lekami stosowanymi w leczeniu infekcji wywołanych enterokokami są m. in. linezolid, chinuprystyna/dalfoprystyna, daptomycyna, tigecyklina i chloramfenikol. Posiadane obecnie dane, zarówno z terenu Europy, jak i całego świata wskazują na stały wzrost ilości pojawiających się izolatów VRE, jak również opornych na antybiotyki inne niż wankomycyna.

1. Wprowadzenie. 2. Zakażenia enterokokami. 3. Leczenie zakażeń enterokokami i antybiotykooporność. 4. Rozwój zjawiska oporności na wankomycynę. 5. Leki stosowane w zwalczaniu zakażeń szczepami opornymi na wankomycynę. 6. Drogi powstawania oporności na wankomycynę. 7. Fenotypy szczepów opornych na wankomycynę. 8. Charakterystyka molekularna fenotypów szczepów opornych na wankomycynę. 9. Sytuacja epidemiologiczna na świecie. 10. Sytuacja epidemiologiczna w Polsce. 11. Sytuacja epidemiologiczna w Europie. 12. Podsumowanie

ANALYSIS OF SELECTED GENETIC TRAITS, PHENOTYPES, AND EPIDEMIOLOGICAL THREAT OF *ENTEROCOCCUS* BACTERIA RESISTANT TO VANCOMYCIN

Abstract: Enterococci are Gram-positive bacteria that belong to facultative anaerobic cocci. Species belonging to the genus *Enterococcus* generally display little infectious potential, however, they can cause serious nosocomial infections. The groups of high risk include patients with proliferative diseases, chronic liver diseases, and graft recipients. Since 1980s more and more frequently infections with enterococci resistant to numerous antibiotics are being observed. There are two independent ways of development resistance to vancomycin, connected with common use of vancomycin for MRSA treatment and non-medical use of this antibiotic. Nine phenotypes of vancomycin-resistant enterococcal strains can be distinguished: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM, VanN. These phenotypes differ to a different extent at the molecular level. Current treatments of enterococcal infections usually include drugs such as linezolid, quinupristin/dalfopristin, daptomycin, tigecycline, and chloramphenicol. Data available from Europe and other parts of the world indicate a constant increase in the number of emerging VRE isolates, as well as strains resistant to antibiotics other than vancomycin.

1. Introduction. 2. Infections with enterococci. 3. Treatment of enterococcal infections and antimicrobial resistance. 4. Development of VRE phenomenon. 5. Drugs used to control infections with VRE strains. 6. Routes of VRE spread. 7. VRE phenotypes. 8. Molecular characteristics of VRE phenotypes. 9. Epidemiological situation in the world. 10. Epidemiological situation in Poland. 11. Epidemiological situation in Europe. 12. Summary

Słowa kluczowe: antybiotykooporność, *Enterococcus*, VRE, wankomycyna

Key words: antimicrobial resistance, *Enterococcus*, vancomycin, VRE

1. Wprowadzenie

Enterokoki to bakterie Gram-dodatnie, należące do względnie beztlenowych ziarniaków. Występują głównie w jelitach, gdzie stanowią naturalną mikroflorę, chroniącą przed patogenami. Na ogół mają postać dwoinek

lub krótkich łańcuchów. Rodzaj *Enterococcus* tworzy 38 gatunków, ale tylko niektóre z nich są istotne z klinicznego punktu widzenia – należą do nich *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* oraz *E. casseliflavus* [1, 2]. Pierwszy z gatunków jest bardzo często izolowany z układu pokarmowego, zwłaszcza jelita rubego,

* Autor korespondencyjny: dr n. farm. Daniel Sypniewski, Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec; tel. 32 364 12 74; e-mail: dsypniewski@sum.edu.pl

i układu moczowo-płciowego (ok. 39–95% prób klinicznych), podobnie jak *E. faecium*, który jednak można wyizolować zdecydowanie rzadziej (ok. 3–47% prób klinicznych) [1]. Oba te gatunki mogą być patogenami człowieka. Dwa pozostałe, *E. gallinarum* i *E. casseliflavus*, mimo że wykazują naturalną oporność na wankomycynę, pojawiają się sporadycznie (łącznie około 5% próbek klinicznych) i na ogół nie są patogenne [3, 4].

Enterokoki w warunkach laboratoryjnych można hodować na powszechnie dostępnych, nieselektywnych podłożach wzbogaconych, takich jak agar czekoladowy czy agar krwawy. Wzrastają również w warunkach wysokiego stężenia chlorku sodu i soli żółciowych. Charakteryzują się dużą tolerancją temperaturową – mogą wzrastać w zakresie 10–45°C. Wokół kolonii enterokoków na agarze z krwią baranią można zaobserwować obszary hemolizy. W analizie mikroskopowej praktycznie nie da się ich odróżnić od pneumokoków (*Streptococcus pneumoniae*), dlatego konieczne jest zastosowanie testów biochemicznych. Wykazują oporność na optochinę, która aktywna jest wobec pneumokoków, a ponadto nie rozpuszczają się w solach kwasów żółciowych, a wynik testu PYR (obecność L-pirolidonyloaryloamidazy) jest pozytywny [4].

Pomimo ogólnie niewielkiego potencjału infekcyjnego gatunki zaliczane do rodzaju *Enterococcus* mogą być przyczyną niebezpiecznych zakażeń szpitalnych [4]. W Stanach Zjednoczonych stanowią jeden z najczęściej izolowanych mikroorganizmów z przewodu pokarmowego i ran [3]. Nie tworzą silnych toksyn bakteryjnych, ale posiadają wiele innych czynników zjadliwości, do których zalicza się:

i adhezyny powierzchniowe, takie jak:

- a) białko ESP (enterokokowe białko powierzchniowe), którego zadanie polega na wiązaniu kolagenu do powierzchni komórki bakteryjnej. Występuje u *E. faecalis* i *E. raffinosus*. U pierwszego z gatunków zbudowane jest z 1972 aminokwasów, a u drugiego z 2311; kodowane jest przez gen *esp* [1, 4–6]. Stanowi też potencjalny czynnik wirulencji u *E. faecium* [1];
- b) glikokaliks polisacharydowy, pośredniczący w wiązaniu do komórek gospodarza, takich jak komórki nabłonka wyściełającego powierzchnię pochwy lub jelita [4];
- c) substancja agregująca (AS), obecna w błonie komórkowej. Umożliwia komórkom bakteryjnym agregację, wiązanie do komórek gospodarza, a także udział w horyzontalnym transferze plazmidowego DNA [4]. Jest kodowana np. przez gen *agg* lub gen *asa1* [7; 8].

ii białka wydzielane poza komórkę, takie jak:

- a) żelatynaza i proteaza serynowa, które wykazują aktywność proteolityczną względem żelatyny, hemoglobiny, kolagenu i innych białek [4];

- b) cytolizyna wykazująca aktywność hemolityczną i hamująca wzrost bakterii Gram-dodatnich; może się też przyczyniać do lokalnego uszkodzenia tkanki [4]; zbudowana jest z podjednostek większej i mniejszej, kodowanych przez odpowiednio geny *cyl-L* i *cyl-S* [7];

- c) hialuronidaza, wydzielana przez szczepy *E. faecium* z kompleksu klonalnego CC17, występującego na całym świecie (w tym w Polsce); kodowana jest przez gen *hyl_{Efm}* [1];

Dla *E. faecalis* charakterystycznymi czynnikami zjadliwości są: cytolizyna, żelatynaza, hialuronidaza, podtlenki, substancja agregująca oraz adhezyny powierzchniowe, takie jak białko Esp [9]. W genomie *E. faecalis* zdecydowanie częściej występują geny *asa1* i *gelE* niż w *E. faecium*. *E. faecalis* dużo częściej niż *E. faecium* wytwarza cząsteczki umożliwiające tworzenie biofilmu [8].

2. Zakażenia enterokokami

Wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia zakażenia omawianymi patogenami wiąże się przede wszystkim ze stosowaniem terapii antybiotykami o szerokim spektrum działania [4]. Do grupy podwyższonego ryzyka zalicza się pacjentów z chorobami rozrostowymi, z przewlekłymi chorobami wątroby oraz biorców przeszczepionych narządów. Z uwagi na wysoką oporność enterokoków na środki dezynfekcyjne i antyseptyczne najczęściej dochodzi do przenoszenia tych bakterii na powierzchni dłoni personelu medycznego w szpitalach [1]. Bardzo istotny jest fakt, iż bakterie *Enterococcus* mogą przetrwać na dłoniach nawet przez 60 minut [10]. Możliwy jest również transfer bakterii niosących geny warunkujące oporność na wankomycynę między zwierzętami a ludźmi. Takie zjawisko udokumentowano zarówno w przypadku szczepów *E. faecium*, jak i *E. faecalis* [11]. W specyficznych okolicznościach enterokoki mogą rozwijać się w innych miejscach w organizmie niż ich typowe lokalizacje, na przykład w układzie oddechowym [4].

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* są czynnikami etiologicznymi takich chorób jak zapalenie wsierdza, sepsa, zapalenie otrzewnej, ropnie wewnątrzbrzuszne, zapalenia dróg żółciowych czy ran oparzeniowych [1]. Bakterie z rodzaju *Enterococcus*, które wykazują obecność istotnych czynników zjadliwości, umożliwiających wywoływanie trudnych do wyleczenia zakażeń (głównie szpitalnych), mogą zostać zaklasyfikowane jako przedstawiciele zupełnie różnych kompleksów klonalnych. Kompleksem klonalnym (CC – Clonal Complexes) jest grupa klonów bakteryjnych, której przedstawiciele wywodzą się od wspólnego przodka i wykazują wzajemne podobieństwo na poziomie molekularnym, a niekiedy także pod względem określonych cech feno-

typowych, np. posiadanych czynników zjadliwości [12]. Kompleksy klonalne są rozróżniane przy pomocy techniki molekularnej MLST (MultiLocus Sequence Typing), w której analizuje się sekwencje kilku alleli genów, kodujących białka metabolizmu podstawowego. Geny te ulegają ekspresji u wszystkich przedstawicieli danego gatunku na podobnym poziomie – dlatego nazywane są genami konstytutywnymi. W analizie *E. faecium* przeprowadzonej przez Homana i wsp. [13] brano pod uwagę następujące geny: *adk* (gen kodujący kinazę adenylanową), *atpA* (gen kodujący podjednostkę alfa syntazy ATP), *ddl* (gen kodujący ligazę D-alanina: D-alanina), *gyd* (gen kodujący dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego), *gdh* (gen kodujący dehydrogenazę glukozy-6-fosforanu), *pstS* (gen kodujący transporter z rodziny ABC) oraz gen kodujący podjednostkę ATPazy fosforybozyloaminoimidazolowej [10, 12, 13].

Podstawowym kompleksem klonalnym gatunku *E. faecium* jest, popularny w Europie, jak i na całym świecie, CC-17. Przedstawiciele kompleksu CC-17 w zdecydowanej większości wykazują oporność na wankomycynę (VRE – Vancomycin-Resistant *Enterococcus*) [10]. Szczepy tego kompleksu wykazują obecność białka Esp oraz zdolność do produkcji hialuronidazy i białka Acm wiążącego kolagen. Są również odporne nie tylko na wankomycynę, ale także na ampicylinę oraz chinolony, takie jak ciprofloksacyna [14, 15]. Z uwagi na częstotliwość występowania CC-17 stanowią istotny problem zarówno w Polsce czy w USA oraz globalnie. Z analizy przeprowadzonej przez Top i wsp. [16] wynika, że na 217 izolatów VR *E. faecium* 97% (czyli 211 izolatów) stanowili przedstawiciele tego kompleksu klonalnego. Do innych kompleksów klonalnych gatunku *E. faecium* należy popularny w Europie CC-5, a w przypadku *E. faecalis* jest to CC-2 i CC-9 [11, 17]. Zespół badaczy pod kierunkiem M. Kawalec, badający kompleksy klonalne izolatów pozyskanych z polskich szpitali do 2007 roku, ustalił, że poza powszechnie znanymi na świecie CC-2 i CC-9, pojawiły się też nowe grupy klonów: CC-87 i CC-21. Pierwszy z nich był odpowiedzialny za powstanie czterech ognisk VRE, z czego trzy były związane z fenotypem VanA, a jedno z VanB. Szczepy należące do tego klonu wykazywały zdolność do przeprowadzania procesu hemolizy, natomiast nie były zdolne do produkcji żelatynazy [17].

3. Leczenie zakażeń enterokokami i antybiotykooporność

Standardowe leczenie zakażeń enterokokami polega na zastosowaniu skojarzonego połączenia aminoglikozydu z wankomycyną lub ampicyliną [4]. Podstawowym problemem w terapii zakażeń enterokokami jest jednak wysoka oporność tych bakterii na antybiotyki

[18]. Może być ona zarówno wrodzona, jak i nabyta. *E. faecium* wykazuje naturalną oporność na cefalosporyny, linkozamidy (np. klindamycynę), trimetoprim z sulfametoksazolem, a także na niskie stężenia aminoglikozydów [1, 4, 18]. Przyczyną tego zjawiska jest niski poziom wnikania aminoglikozydów do komórek. Stanowi to przyczynę łączenia przedstawicieli tej grupy antybiotyków z lekami hamującymi syntezę ściany komórkowej – głównie ampicyliną [19]. Dodatkowo, enterokoki mają naturalnie podwyższoną oporność na penicyliny – w porównaniu z paciorkowcami są od 10 do nawet 100 razy mniej wrażliwe na antybiotyki β -laktamowe (*E. faecalis*), natomiast *E. faecium* jest 4–16-krotnie mniej wrażliwy niż *E. faecalis* [1, 4, 19]. Związane jest to z bardzo często spotykaną u *E. faecium*, oraz dużo rzadziej w przypadku *E. faecalis*, nadekspresją białek PBP5 (białka wiążące penicyliny), natomiast w dużo mniejszym stopniu z wytwarzaniem β -laktamaz – ten mechanizm (warunkowany przez gen plazmidowy) występuje z kolei u enterokoków bardzo rzadko [19]. Obecnie przyjmuje się, że 25% szczepów enterokoków, zarówno *E. faecium*, jak i *E. faecalis*, cechuje się opornością na wysokie stężenia aminoglikozydów – takie szczepy nazywane są HLAR (High Level Aminoglycoside Resistance) [1, 4]. Oporność na gentamycynę pierwszy raz zaobserwowano w Stanach Zjednoczonych w 1979 roku zarówno u *E. faecium*, jak i *E. faecalis*, zaś na gentamycynę, tobramycynę, amikacynę, kanamycynę i streptomycynę w 1983 roku [20, 21]. Przyczyna tej oporności może wynikać bądź z enzymatycznej modyfikacji lub degradacji antybiotyku (w toku badań nad wspomnianymi próbkami z 1983 r. wykryto liczne enzymy, na przykład 3'-fosfotransferazę, 2'-fosfotransferazę czy 6'-acetylotransferazę [18, 21]), bądź też ze zmiany struktury miejsca przyłączenia antybiotyku do rybosomów [17]. Zdecydowana większość szczepów *E. faecium* jest oporna na ampicylinę [4, 18].

4. Rozwój zjawiska oporności na wankomycynę

Pierwsze doniesienia o pojawieniu się oporności na wankomycynę w zakażeniach bakteriami z rodzaju *Enterococcus*, czyli występowania szczepów VRE, pojawiły się w Europie, w Wielkiej Brytanii w 1988 roku (*E. faecalis* i *E. faecium*), a rok później w Stanach Zjednoczonych [1, 22]. Bardzo istotny z epidemiologicznego punktu widzenia był też rok 2002, w którym zanotowano pierwszy w historii przypadek, w którym na drodze horyzontalnego transferu genów nastąpiło przemieszczenie operonu *vanA* między przedstawicielem rodzaju *Enterococcus* o fenotypie VanA, a bakterią z gatunku *Staphylococcus aureus*, oporną na metycylinę, czyli pomiędzy szczepami VRE i MRSA, w wyniku czego powstał metycylineooporny szczep gronkowca

złocistego, niewrażliwy zarówno na metycylinę, jak i na teikoplaninę, czyli szczep VRSA [1]. Istotne jest to, iż szczepy zaliczane do VRE są klasyfikowane jako XDR (eXtensively Drug Resistant). Przynależność do tej grupy oznacza, że bakteria pozostaje obecnie wrażliwa wyłącznie na jeden antybiotyk z jednej lub dwóch grup, które są przeznaczone do zwalczania przedstawicieli jej gatunku [23].

5. Leki stosowane w zwalczaniu zakażeń szczepami opornymi na wankomycynę

Aby móc wyleczyć przypadki VRE konieczne jest stosowanie najnowszych leków przeciwbakteryjnych, które nie są niestety pozbawione wad. Do podstawowych leków stosowanych w leczeniu VRE zalicza się linezolid. Antybiotyk ten zaliczany jest do pochodnych oksazolidynonu. FDA zaleca jego zastosowanie w razie zakażenia VRE *E. faecium*, ale również m.in. do zwalczania MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) lub wrażliwych na penicylinę szczepów *S. pneumoniae*. Mechanizm działania linezolidu polega na hamowaniu syntezy białek na drodze oddziaływania z kompleksem mRNA-tRNA i rybosomem. Zaburza tworzenie kompleksu inicjacyjnego przez związanie podjednostki 50S rybosomu i uniemożliwienie przyłączenia tRNA [4]. Antybiotyk ten jest skuteczny głównie wobec Gram-dodatnich bakterii tlenowych i beztlenowych [24]. Oporność na linezolid występuje wprawdzie dość rzadko, ale wśród VRE jest dostrzegalna. Pierwsze jej przypadki odnotowano już w 2001 roku u 5 pacjentów leczonych linezolidem [25]. Również w 2001 roku odnotowano pierwsze przypadki oporności na wspomniany antybiotyk w Wielkiej Brytanii (dwa izolaty *E. faecium* i jeden *E. faecalis*) [26]. Wykryto mutację punktową w genie kodującym 23S rDNA (mutacja G2576T w nukleotydzie 2576), której występowanie wykazuje korelację z nieskutecznością terapii, może zatem stanowić jeden z markerów oporności na linezolid o nieznanym mechanizmie [27].

Kolejnym lekiem traktowanym jako tzw. lek „ostatniej szansy” jest mieszanina chinuprystyna/dalfoprystyna. Jest jednak nieskuteczna w przypadku zakażeń *E. faecalis*. Stosowane są także hamujące syntezę kwasów nukleinowych fluorochinolony, które niestety nie są zbyt aktywne w stosunku do szczepów wankomycynopornych [4]. Według Leavis i wsp., za oporność szczepów VRE na fluorochinolony, takie jak ciprofloksacyna, odpowiadają geny *parC*, *gyrA*, *parB* i *GyrE*. Szczególnie mutacje w dwóch pierwszych genach sprawiają, że bakterie stają się wysoce odporne na ciprofloksacynę [28]. W dalszej kolejności warto zwrócić uwagę na daptomycynę. Jest to cykliczny antybiotyk peptydowy, stosowany w terapii w USA od 2003 roku [29]. Jednakże już

w 2005 roku pojawiło się pierwsze doniesienie o występowaniu zakażenia szczepem VRE *E. faecium*, który był niewrażliwy również na ten antybiotyk. Dopiero zastąpienie go skojarzonym podaniem linezolidu i doksy-cykliny doprowadziło do wyleczenia pacjenta [29–30].

Kolejnym przykładem leku stosowanym w leczeniu VRE jest tigecyklina. Ten półsyntetyczny antybiotyk, zaliczany do grupy glicylocyklin, wykazuje aktywność bakteriostatyczną poprzez zaburzenie wiązania aminoacylo-tRNA do miejsca A rybosomu bakteryjnego, w wyniku związania z podjednostką 30S. Mimo że jest dalece zmodyfikowaną pochodną tetracyklin, tigecyklina jest również aktywna względem szczepów na nie opornych [31]. Tigecyklina jest również na ogół skuteczna w zwalczaniu zarówno MRSA, VRE, jak i wobec wielu *Enterobacteriaceae*, które produkują karbapenemazę [32]. Wykorzystywana jest, zgodnie z rekomendacją KORLD (Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów), do leczenia ciężkich zakażeń skóry, tkanek podskórnych i jamy brzusznej [33]. Jak na wszystkie dostępne leki, również przeciwko temu wykształciła się oporność. W 2008 roku pojawiło się doniesienie o pacjencie z oddziału intensywnej terapii ze szpitala w Niemczech, od którego wyizolowano szczep *E. faecalis* oporny na tigecylinę [31].

Inne źródła sugerują, że do zwalczania zakażeń szczepami VRE można zastosować chloramfenikol [34]. Lek ten wywołuje zahamowanie transpeptydacji na rybosomach bakteryjnych, w wyniku związania z ich podjednostką 50S. Jego spektrum działania obejmuje tlenowe i beztlenowe bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne, a także riketsje. Na ogół wykazuje aktywność bakteriostatyczną. Zaleca się, aby był stosowany jedynie w najcięższych przypadkach, ze względu na liczne, silne działania niepożądane. Wywołuje silną supresję szpiku kostnego, a u noworodków może przyczynić się do wystąpienia „zespołu szarego dziecka”. Wpływa również bardzo niekorzystnie na prawidłową mikroflorę jelitową [35]. W latach 2006–2007 w Szpitalu Uniwersyteckim w Bydgoszczy wyizolowano od trzech pacjentów szczepy VRE odporne na ten lek [36].

6. Drogi powstawania oporności na wankomycynę

Można wyróżnić dwa różne i niezależne od siebie schematy, zgodnie z którymi kształtowała się oporność na wankomycynę wśród bakterii z rodzaju *Enterococcus*. Jeden ze schematów miał miejsce w USA, gdzie wankomycyna była antybiotykiem powszechnie stosowanym w leczeniu zakażeń gronkowcem złocistym opornym na metycylinę (MRSA), jak również w leczeniu poantybiotykowych biegunek wywoływanych przez *Clostridium difficile*. Drugi schemat zaobserwowano w Europie, gdzie na skutek karmienia zwierząt hodowlanych paszą

wzbogaconą glikopeptydem awoparcyną, miał miejsce transfer VRE między zwierzętami a człowiekiem [1]. USA i Kanada były jedynymi większymi krajami, które nie wprowadziły do używania awoparcyny w rolnictwie. Jest to najprawdopodobniej przyczyną faktu, iż do 2008 roku z żadnej z analizowanych prób pochodzących od zwierząt gospodarskich w tych krajach nie wyizolowano szczepu VRE. Natomiast w Europie, w latach 90-tych, w mikroflorze jelitowej zwierząt hodowlanych obecność *Enterococcus* opornych na wankomycynę była powszechna. Stosowanie tego antybiotyku jako stymulatora wzrostu rozpoczęło się w 1975 roku. Najczęściej podawano ją świniom, indykom i cielętom. Skalę zjawiska najlepiej uwidacznia fakt, iż w 1994 roku, w samej tylko Danii, w terapii ludzi zastosowano ok. 24 kg wankomycyny, a w rolnictwie ok 24 000 kg awoparcyny jako stymulatora wzrostu. Pierwszym krajem, który zabronił stosowania wspomnianego antybiotyku była Szwecja. Pociągnęło to za sobą lawinę podobnych decyzji, zakończoną dyrektywą Unii Europejskiej 97/6/WE, zakazującą używania awoparcyny w rolnictwie [14]. Niestety tego typu wypadki nie zakończyły się na incydencie z awoparcyną. Jeszcze w 2000 roku donoszono o powszechnym stosowaniu w rolnictwie w Rosji antybiotyków identycznych z tymi, jakie używa się w terapii klinicznej. W bardzo wielu krajach na świecie antybiotyki są używane w sposób zupełnie niekontrolowany. Najlepszym przykładem są hodowle krewetek w Azji [37]. Na uwagę zasługuje zjawisko zwane „paradoksem szwedzkim”. Przejawia się ono tym, że pomimo bardzo krótkiego (zwłaszcza w porównaniu z innymi krajami europejskimi) czasu stosowania awoparcyny w tym kraju – przez niecałe 10 lat, do roku 1984 – częstość występowania tam VRE była bardzo wysoka. Utrzymywała się równie długo po zakończeniu jej stosowania, mimo że w innych krajach ilość izolowanych VRE spadła [14]. Na obu kontynentach występowały inne rezerwuary VRE. W Stanach Zjednoczonych były to szpitale i nie zaobserwowano tam szczepów poza-szpitalnych, natomiast w Europie rezerwuarem były zwierzęta [1].

7. Fenotypy szczepów opornych na wankomycynę

Wśród opornych na wankomycynę szczepów enterokoków można wyróżnić dziewięć fenotypów. Są to: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM, VanN [1]. Jeden z nich, VanC, jest przykładem naturalnej oporności (gatunkowej). Stanowi cechę charakterystyczną niezbyt groźnych klinicznie gatunków *E. gallinarum* (vanC1), *E. casseliflavus* (vanC2 i vanC4) i *E. flavescens* (vanC3). Na ogół związany jest z konstytutywnym mechanizmem oporności. Bakterie posiadające fenotyp VanC wykazują niski stopień oporności na wankomycynę i równocześnie są wrażliwe na teikoplaninę.

Geny warunkujące ten fenotyp są zlokalizowane DNA chromosomalnym bakterii i nigdy nie ulegają horyzontalnemu transferowi [38–40]. Pozostałe fenotypy są przykładem nabytej oporności na glikopeptydy [1]. Fenotypy VanA, VanB, VanD i VanM charakteryzują się zmodyfikowaną budową prekursora mureiny, w której sekwencja D-Ala-D-Ala w końcowym pentapeptydzie zastąpiona jest depsiptydem D-Ala-D-Lac [40]. W pozostałych fenotypach, czyli VanC, VanE, VanG, VanL i VanN, sekwencja końcowa pentapeptydu ma postać: D-Ala-D-Ser [40]. Ze względu na to, że zespoły genów warunkujące fenotypy VanA i VanB są zlokalizowane na ruchomych elementach genomu, takich jak transpozony czy plazmidy, są one najistotniejsze pod względem klinicznym. Najbardziej wyraźna różnica pomiędzy tymi fenotypami polega na tym, że szczepy VanA są odporne zarówno na wankomycynę, jak i na teikoplaninę, a w przypadku VanB tylko na wankomycynę. Wyróżnia się w nim 3 podtypy – VanB1, VanB2 i VanB3 – ze względu na istniejące między nimi różnice genetyczne. Z kolei jedynie kilka szczepów *E. faecalis*, u których udało się opisać fenotypy VanG i VanE, wykazywały pełną wrażliwość na teikoplaninę oraz oporność na wankomycynę jedynie w niskich stężeniach [38]. W większości krajów świata, w tym zwłaszcza Europy, w USA i w Korei Południowej dominuje fenotyp VanA, natomiast VanB jest popularniejszy w Australii i Singapurze [10]. W Polsce nie wykryto obecności fenotypów innych niż VanA, VanB i VanC, a najczęściej izolowane szczepy wykazywały fenotyp VanA [1, 10]. W tabeli I przedstawiono podsumowanie najważniejszych cech różniących poszczególne fenotypy enterokoków opornych na wankomycynę.

8. Charakterystyka molekularna fenotypów szczepów opornych na wankomycynę

Istnieje zespół genów, które warunkują fenotyp VanA. Są wśród nich: *vanY*, *vanZ*, *ORF1*, *ORF2* (dwa ostatnie nie są związane z opornością, ale umożliwiają zajście zjawiska transpozycji) oraz geny tworzące operon *van*: *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanR* i *vanS* [3, 41]. Występują one w transpozonie Tn1546, zlokalizowanym w plazmidach pIP816. Geny związane z fenotypem VanA można też znaleźć na bardzo wielu innych plazmidach, na przykład na pRUM, pS177, pWZ909, pLG1, Inc18, pSL1, pSL2, pIP816 [42–46]. Geny *vanY* i *vanZ* nie są niezbędne do wystąpienia oporności, jednak bądź zwiększają jej poziom (*vanY*), bądź też wpływają na oporność na niskie stężenia teikoplaniny (*vanZ*). Operon *van* z kolei tworzony jest przez geny struktury (*vanH*, *vanA* i *vanX* – nazywane genami białek VanHAX) i geny regulatorowe (*vanR* i *vanS*). Gen *vanA* koduje ligazę D-dipeptydową, która katalizuje

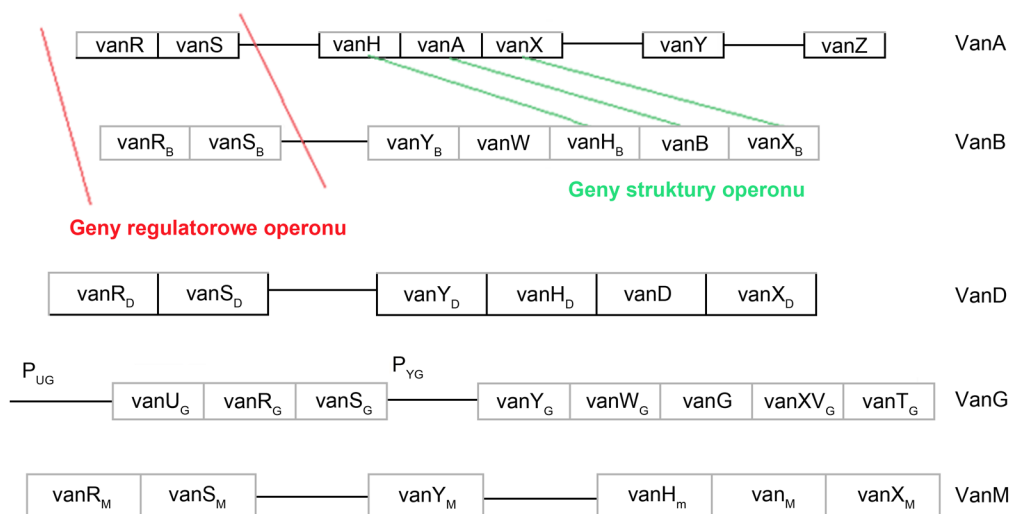
Tabela I
Charakterystyka fenotypów *Enterococcus* opornych na wankomycynę

Fenotyp	Wankomycyna MIC (mg/L)	Teikoplanina MIC (mg/L)	Modyfikacja	Lokalizacja	Zdolność do transferu	Ekspresja	Główne gatunki
VanA	64–1000	16–512	d-Ala-d-Lac	plazmid lub chromosom	tak	indukowana	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
VanB	4–1000	0,5–1	d-Ala-d-Lac	plazmid lub chromosom	tak	indukowana	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
VanC	2–32	0,5–1	d-Ala-d-Ser	chromosom	nie	konstytutywna lub indukowana	<i>E. casseliflavus</i> <i>E. casseliflavus</i>
VanD	64–128	4–64	d-Ala-d-Lac	plazmid lub chromosom	nie	konstytutywna lub indukowana	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
VanE	8–32	0,5	d-Ala-d-Ser	chromosom	nie	indukowana	<i>E. faecalis</i>
VanG	≤ 16	wrażliwy	d-Ala-d-Ser	chromosom	tak	indukowana	<i>E. faecalis</i>
VanL	8	≤ 0,5	d-Ala-d-Ser	chromosom	nie	indukowana	<i>E. faecalis</i>
VanM	> 256	96	d-Ala-d-Lac	plazmid lub chromosom	tak	indukowana	<i>E. faecium</i>
VanN	16	≤ 0,5	d-Ala-d-Ser	plazmid	tak	konstytutywna	<i>E. faecium</i>

tworzenie dipeptydu D-Ala-D-Lac. Zostaje on później wbudowany do prekursorów mureiny w cytoplazmie zamiast D-Ala-D-Ala. Aby to było możliwe, konieczne jest jednak wytworzenie D-mleczanu (D-Lac) – umożliwia to dehydrogenaza D-hydroksykwasów, kodowana przez gen *vanH*. Aby w komórce nie powstawały równolegle do D-Ala-D-Lac ugrupowania D-Ala-D-Ala, konieczna jest hydroliza występującego w nich wiązania amidowego. Reakcję tę katalizuje DD-dipeptydaza kodowana przez gen *vanX* [3, 41, 47]. Geny regulatorowe, obecne w operonie, odpowiadają za inicjację transkrypcji zespołu białek VanHAX, zgodnie z mechanizmem indukowanym. Pojawienie się w środowisku wankomycyny lub teikoplaniny stymuluje autofosforylację kinazy histydynowej (fosforylacja reszty His164), będącej białkiem błony komórkowej, które z kolei jest produktem ekspresji genu *vanS* [48].

Wspomniany enzym, po autofosforylacji, katalizuje fosforylację Asp53 drugiego elementu systemu regulacji, czyli białka VanR. Jest ono obecnym w cytoplazmie czynnikiem transkrypcyjnym, który w formie ufosforylowanej wiąże się z promotorem operonu *van*, aktywując jego transkrypcję [3, 48]. Na ryc. 1 przedstawiono schemat struktury genów tworzących operony VanA, VanB, VanD, VanG i VanM.

U szczepów zaliczanych do fenotypu VanB występuje zespół genów o analogicznych jak w przypadku VanA funkcjach. Dlatego geny struktury operonu zostały opisane jako *vanB* i *vanX_B*, a geny regulatorowe *vanR_B* i *vanS_B*. Występują też geny *vanY_B* i *vanW* – ostatni z wymienionych jako jedyny nie posiada odpowiednika w przypadku fenotypu VanA [47]. Geny warunkujące fenotyp VanB mogą być zlokalizowane w transpozonach Tn1549, Tn1547 i Tn5382 (ten ostatni



Ryc. 1. Schemat struktury zespołu genów warunkujących fenotypy VanA, VanB, VanD, VanG i VanM
Na podstawie [41, 47, 49, 52].

zwiera też gen kodujący enzym zwany Ant(3^{''})-la, warunkujący oporność na aminoglikozydy u enterokoków). Może następować ich przemieszczanie się między chromosomami bakteryjnymi [38].

Fenotypy VanC i VanE są pod względem genetycznym bardzo do siebie podobne. Zawierają operony zbudowane odpowiednio z *vanC* lub *vanE* (kodujące ligazę D-dipeptydową, która tworzy D-Ala-D-Ser) oraz *vanXY* (kodujący D,D-dipeptydazo-D,D-karboksypeptydazę), *vanT* (kodujący racemazę serynową, która pozwala na przekształcenie dostępnej w komórce L-seryny do D-seryny) *vanR* i *vanS* kodujące, odpowiednio, białko regulatorowe operonu i kinazę histydynową. Fenotyp VanD wiąże się ze średnim poziomem oporności na wankomycynę i teikoplaninę. Geny warunkujące ten fenotyp występują w chromosomalnym DNA i jak dotąd nie ma doniesień mówiących, że mogą ulegać transferowi [38]. W operonie tego fenotypu również występują analogiczne do wyżej wymienianych geny: *vanR_D*, *vanS_D*, *vanY_D*, *vanH_D*, *vanD* i *vanX_D*. Potwierdzono, że geny warunkujące fenotyp VanD mogą być zlokalizowane m.in. na transpozonie Tn1546 [49–50].

Pewne różnice występują w operonie fenotypu VanG, gdzie całość struktury poprzedza trójelementowa sekwencja regulatorowa (*vanU*). W dalszej kolejności znajdują się *vanR_G*, *vanS_G* (kodujące białka wspomniane wyżej), *vanY_G* (kodujący D,D-karboksypeptydazę), *vanW* (o nieznannej funkcji), a następnie *vanG*, *vanXY_G* i *vanT_G* [51].

Niedawno opisany dokładniej fenotyp VanL ma bardzo wiele cech wspólnych z fenotypami VanC i VanE, ale jego racemaza serynowa kodowana jest przez dwa geny: *vanTm_L* i *vanTr_L*. Ich podobieństwo z *vanT* w fenotypie VanC wynosi odpowiednio 51 i 49%. Fenotyp

VanN, podobnie jak dwa powyższe, wykazuje podatność na niskie stężenia wankomycyny i wrażliwość na teikoplaninę. Występuje w nim operon zawierający charakterystyczny dla niego gen *vanN* kodujący ligazę oraz geny *vanXY_N*, *vanT_N*, *vanR_N* i *vanS_N* o funkcjach analogicznych, jak w fenotypach VanC i VanE [50]. Szczególnie ciekawy jest fenotyp VanM, odkryty u *E. faecium* w 2010 roku [52]. Charakterystyczne dla tego fenotypu jest występowanie ligazy VanM zbudowanej z 343 aminokwasów i warunkującej oporność na wankomycynę oraz teikoplaninę. Podobieństwo produktu białkowego genu *vanM* do produktów ekspresji genów *vanA*, *vanB*, *vanD* i *vanF* jest na poziomie, kolejno: 79,9; 70,8; 66,3 i 78,8%. W dalszej kolejności operon tworzony jest przez geny *vanR_M*, *vanS_M*, *vanY_M*, *vanH_M*, *vanM* i *vanX_M*. Ogólnie struktura operonu jest najbardziej podobna do tego, który można znaleźć w fenotypie VanD [52].

9. Sytuacja epidemiologiczna na świecie

W 2003 roku badacze z Teksasu pod kierunkiem J.H. Jorgensena podjęli badania nad skutecznością kolejnych, stosowanych w walce z VRE antybiotyków. Zgromadzono 156 izolatów z 7 różnych placówek. Znalazło się wśród nich 126 izolatów *E. faecium* (fenotypy VanA i VanB kolejno w liczbie 109 i 17), 5 izolatów *E. faecalis* (3 *vanA* i 2 *vanV*), 2 izolaty *E. avium* (*vanA*), 1 izolat *E. durans* (*vanA*), 10 izolatów *E. gallinarum* (*vanC1*) oraz 12 izolatów *E. casseliflavus* (*vanC2*) [53]. Wyniki badań zespołu podsumowano w tabeli II.

Jak prezentuje tabela II, spośród przebadanych szczepów VRE o istotnych klinicznie fenotypach, najwięcej prób wykazywało oporność na ampicylinę i doksycylinę,

Tabela II

Oporność izolatów VRE na wybrane antybiotyki, pozyskanych z 7 różnych placówek medycznych

Szczepy enterokoków	Zastosowany lek	MIC (µg/ml)		% izolatów opornych
		50%	90%	
Szczepy VanA i VanB	Daptomycyna	4	8	nie ustalono
	Linezolid	2	2	1,5
	Chinuprystyna-dalfoprystyna	0,5	1	6,0
	Ampicylina	64	128	93,2
	Doksycyklina	4	16	14,2
	Wankomycyna	> 128	> 128	100
Szczepy VanC1 i VanC2	Daptomycyna	1	2	nie ustalono
	Linezolid	2	2	0
	Chinuprystyna-dalfoprystyna	2	2	0
	Ampicylina	0,5	1	0
	Doksycyklina	≤ 0,25	≤ 0,25	4,5
	Wankomycyna	4	4	0

Na podstawie [53].

a najmniej na chinuprystynę/dalfoprystynę i linezolid. Dla tych leków również wielkości zarówno MIC50%, jak i MIC90% były najniższe. Wśród szczepów VRE mniej istotnych klinicznie poziom oporności jest znacznie niższy. Co ciekawe, w toku analizy wpływu daptomycyny na VRE stwierdzono, że występowanie fenotypu VanA lub VanB nie wpływa w istotny sposób na skuteczność działania antybiotyku [53].

Simner i wsp. przeanalizowali 2927 izolatów enterokoków zebranych w Kanadzie na przestrzeni 6 lat, do 2013 r. Tylko 4,2% wykazywało oporność na wankomycynę. Wszystkie przebadane VRE należały do *E. faecium*, a 90% z nich wykazywało fenotyp VanA. W ciągu analizowanego okresu częstość występowania w szpitalach zakażeń VRE uległa potrojeniu [54]. Ogólnie, w Stanach Zjednoczonych poziom oporności na wankomycynę wśród enterokoków jest dużo wyższy (ok. 33% przebadanych izolatów *Enterococcus* nie wykazuje wrażliwości na wankomycynę) niż w Kanadzie (gdzie VRE stanowią poniżej 10%) [55].

Warto też zwrócić uwagę na sytuację epidemiologiczną w innych regionach świata. Zespół D. Ravi przeprowadził analizę izolatów *Enterococcus* pozyskanych ze szpitala w Chennai w Indiach między lutym 2013, a styczniem 2014 roku, od pacjentów z różnych oddziałów i grup wiekowych [56]. Na 200 uwzględnionych prób większość stanowili przedstawiciele *E. faecalis* (55%). W zdecydowanej mniejszości były inne gatunki: *E. faecium*, *E. avium*, *E. hirae*, *E. casseliflavus*, *E. durans* i *E. gallinarum*, stanowiące kolejno 29%; 10,5%; 3%; 1%; 1% i 0,5%. Jedynie 2,5% izolatów wykazywało oporność na wankomycynę. Identyczna ilość wykazywała oporność na teikoplaninę. Co zaskakujące, aż 5% szczepów enterokoków było opornych na linezolid. Zdecydowanie najwięcej z nich było opornych na tetracyklinę i ciprofloksacynę (po 47% szczepów) oraz erytromycynę (73% szczepów) [56].

Japonia jest krajem, w którym VRE stanowią bardzo niewielki odsetek wszystkich enterokoków. Z analizy Suzuki i wsp. wynika, że w szpitalu Uniwersytetu Tokijskiego w ciągu 20 lat do 2010 roku pojawiło się zaledwie dwadzieścia przypadków VRE. Natomiast między rokiem 2011, a 2012 wykryto w tej placówce aż dziewięć izolatów, z czego wszystkie wykazywały fenotyp VanB. W analizowanym materiale odkryto obecność transpozonu Tn5382, zawierającego geny warunkujące ten fenotyp [57].

Interesujące są wyniki analizy zanieczyszczenia wody źródlanej i mineralnej, jaką przeprowadzono między styczniem 2013, a lutym 2014 w Chinach. Przebadano 314 pobranych próbek pochodzących ze 101 fabryk wód butelkowanych z dziesięciu różnych prowincji Państwa Środka. 48 z nich było zanieczyszczonych *E. faecalis*, ale żaden z wykrytych szczepów nie był oporny na wankomycynę, jak również na żaden z pozostałych 11 antybio-

tyków, które wzięto po uwagę. Wykryto natomiast u analizowanych bakterii kilka genów wirulencji: *asa1* (79,3% szczepów; kodujący czynnik umożliwiający doczepianie się do komórek eukariotycznych), *ace* (39,3% szczepów; koduje białko adhezyjne, wiążące kolagen, przez co może ograniczać skuteczność działania układu immunologicznego), czy też *gelE*, który posiadały wszystkie przebadane szczepy [58]. Jak wynika z badań Sun i wsp., na terenie Chin dominującym gatunkiem VRE jest *E. faecium*, a fenotypem VanA. Ze 101 przeanalizowanych próbek, pochodzących z 12 różnych szpitali, *E. faecium* stanowił aż 96, a pozostałe 5 *E. faecalis*. Prawie wszystkie izolaty (z wyjątkiem pojedynczych przypadków) wykazywały fenotyp VanA. Wśród *E. faecium* zdecydowaną większość stanowił kompleks klonalny CC17, z kolei wśród *E. faecalis* był to CC4 [59]. Lai i wsp. wykazali, że istnieje ścisła, pozytywna korelacja między stosowaniem teikoplaniny i tygecykliny, a częstością występowania infekcji VRE związanych z opieką zdrowotną na Tajwanie [60].

Naukowcy z Brazylii przebadali 93 izolaty VRE (*E. faecium*) pochodzące z 13 różnych szpitali. Wszystkie szczepy zidentyfikowano jako posiadające fenotyp VanA, ze względu na wykryty gen *vanA*. Jedynie 6,5% izolatów wykazywało zdolność do tworzenia biofilmu [61]. W innym badaniu prowadzonym w tym samym kraju w Szpitalu Uniwersyteckim Londrina sprawdzano obecność czterech potencjalnych genów zjadliwości, obecnych u izolowanych szczepów VRE. Przebadano 40 izolatów pod kątem występowania genów: *esp* (gen kodujący białko Esp), *gelE*, *efaA* i *cylA*. Wszystkie szczepy wykazywały oporność na wankomycynę i teikoplaninę. U każdego ze szczepów potwierdzono obecność przynajmniej jednego z wymienionych wyżej genów wirulencji. Najczęściej stwierdzano obecność genu *esp* (87,5% szczepów) oraz genu *efaA*, (82,5% szczepów); rzadziej wykrywano gen *gelE* (70% szczepów) i *cylA* (65% szczepów). W 32,5% izolatów stwierdzono obecność wszystkich 4 genów. Ciekawy jest fakt, iż zawsze, gdy w szczepie wykrywano obecność genu *efaA*, posiadał on też gen *esp* [62].

Biorąc pod uwagę udział zwierząt hodowlanych w przenoszeniu lekoopornych szczepów drobnoustrojów, niepokojące doniesienia pochodzą z RPA. W 2014 roku poddano tam analizie 400 prób kału krów pochodzących z dwóch, oddalonych od siebie farm. Na uwagę zasługuje fakt, iż wszystkie zwierzęta miały częsty kontakt z antybiotykami z grupy penicylin (ampicylina, penicylina G), makrolidów (tylozyna: powszechnie stosowany antybiotyk do leczenia m.in. kur i bydła, dostępny również w Polsce), jak również z chinolonami (danofloksacyna, stosowana w rolnictwie do leczenia bydła jako Advocin [63]). W 341 próbkach wykryto szczepy z rodzaju *Enterococcus*. Większość z nich stanowił *E. faecium* (52,94% izolatów) i *E. durans* (23,53%

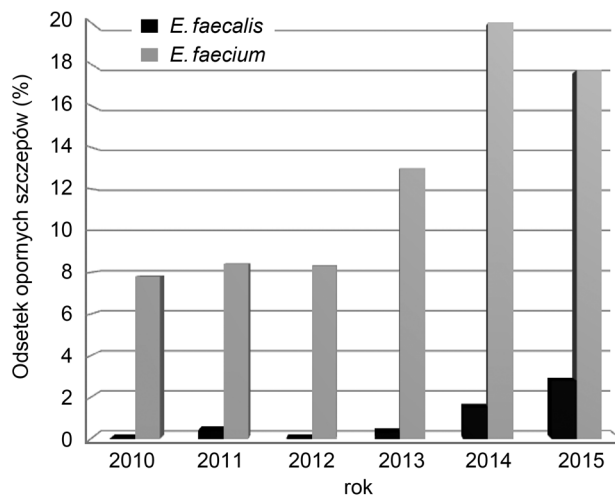
izolatów). Pozostałe gatunki były w zdecydowanej mniejszości. Wszystkie wykryte szczepy enterokoków były odporne na wankomycynę (VRE) i kloksacylinę. Na pozostałe antybiotyki: amikacynę, cefalotynę, streptomycynę, penicylinę G, klindamycynę, neomycynę i erytromycynę odsetek szczepów opornych stanowił, odpowiednio: 74%, 88%, 94%, 91%, 97%, 91% i 99%. Antybiotykami, na które oporność była najmniejsza, były kolejno: ciprofloksacyna (12% szczepów), amoksylicylina/kwas klawulanowy (8% szczepów) i imipenem (0,6% szczepów). Nie stwierdzono szczepu wrażliwego na wszystkie antybiotyki, natomiast dwa spośród wyizolowanych szczepów były odporne na wszystkie 12 przebadanych leków, a kolejne 7 szczepów było wrażliwe na tylko jeden z nich. Analiza molekularna wykazała obecność następujących genów wirulencji: *gelE* (97% szczepów), *asa1* (94,11% szczepów) i *esp* (79,4% szczepów). Równocześnie odkryto, że 65,29% szczepów wykazywało obecność genów *vanC*, a 19,7% szczepów obecność genów *vanB*. Nie wykryto obecności genu *vanA* [64].

Kolejnym regionem objętym badaniami VRE były Karaiby. Akpaka i wsp. zgromadzili 45 próbek VRE ze szpitali na terenie Trynidadu i Tobago. Wszystkie izolaty pochodziły od pacjentów długo hospitalizowanych, z zakażeniami szpitalnymi. 84% szczepów stanowił *E. faecium* zawierający gen *vanA*, a pozostałe 16% to *E. faecalis*, w którego DNA wykryto obecność genu *vanB*. Wszystkie szczepy były wrażliwe na linezolid, ale równocześnie 100% *E. faecalis* było opornych na lewofloksacynę, ciprofloksacynę, erytromycynę i chinuprystynę/dalfoprystynę. Podobnie wszystkie szczepy *E. faecium* były odporne na lewofloksacynę, ciprofloksacynę i erytromycynę, ale aż 82% szczepów tego gatunku było wrażliwych na chinuprystynę/dalfoprystynę. Analizowanymi czynnikami zjadliwości u badanych bakterii były geny: *esp*, wykryty u wszystkich izolatów, który obecny jest często u bakterii izolowanych od zdrowych nosicieli, oraz gen *hyl* kodujący hialuronidazę, którego obecność znacząco zwiększa inwazyjność enterokoków [65].

Natomiast z badań Somily i wsp., badających częstość występowania VRE w Arabii Saudyjskiej, wynika, że spośród 378 izolatów enterokoków, tylko 17 wykazywało oporność na wankomycynę. 76% z nich wykazywało przynależność do gatunku *E. faecium*, a pozostałe 24% do *E. gallinarum*. Fenotyp VanA wykazywały wszystkie VRE z gatunku *E. gallinarum* oraz większość z *E. faecium* [66].

10. Sytuacja epidemiologiczna w Polsce

Jak widać na wykresie przedstawionym na ryc. 2 w Polsce na przestrzeni lat 2010–2015 występuje niepokojąca tendencja wzrostu zarówno ilości szczepów *E. faecium* i *E. faecalis* opornych na wankomycynę, izo-



Ryc. 2. Oporność na wankomycynę w Polsce
Oporność wśród szczepów *E. faecium* i *E. faecalis* izolowanych z krwi pacjentów na przestrzeni lat 2010–2015 [67].

lowanych z krwi pacjentów (dane pochodzą z doniesień KORLD [67]). Zdecydowanie większy jest odsetek opornych szczepów *E. faecium* (w 2014 roku stanowiły prawie 20% wszystkich izolatów tego gatunku) niż wankomycynoopornych *E. faecalis*, których największy odsetek miał miejsce w 2015 roku (2,8%) [67]. Podsumowując powyższe dane można wysnuć wnioski, iż pomimo dużo rzadszego występowania *E. faecium* w populacji w porównaniu z *E. faecalis*, to właśnie *E. faecium* stanowi kluczowy problem, ze względu na często występujące jego szczepy odporne na wankomycynę [1, 67].

W badaniu Talaga i wsp. uwzględniono 154 próbki enterokoków z 4 różnych szpitali z Małopolski, zebrane na przestrzeni jednego roku. Z badań zespołu wynika, że *Enterococcus* odporne na wankomycynę mają niewielki udział w całkowitej puli przebadanych bakterii. Wszystkie *E. faecalis* wykazywały wrażliwość na analizowane antybiotyki, w tym wankomycynę. Ustalono, że pomimo utrzymywania się ogólnej tendencji dominacji fenotypu VanA, w Małopolsce *E. faecium* o fenotypie VanB ma większy udział procentowy w populacji VRE niż *E. faecium* o fenotypie VanA. Wszystkie izolaty *E. faecium*, w tym VRE, były wrażliwe na chinuprystynę/dalfoprystynę [68].

Po raz pierwszy w Polsce szczepy VRE pojawiły się w 1999 roku w Gdańsku. Był to *E. faecium* o fenotypie VanA. W tym samym roku po raz pierwszy pojawił się też izolat VRE o fenotypie VanB (w Warszawie). Od tego czasu co roku notowane są pojedyncze przypadki lokalnych ognisk epidemicznych. Wśród wszystkich czynników alarmowych, jakie są zgłaszane w polskich szpitalach, odsetek VRE jest stosunkowo niewielki – na przestrzeni 2012–2014 oscylował w okolicach 1–2% [1]. Mimo, że na terenie Polski występują VRE zarówno o fenotypie VanA, jak i VanB, to zdecydowanie częściej spotyka się przypadki VanA [1, 7, 66, 67].

Tabela III

Zestawienie ilości izolatów VRE i odsetka wszystkich czynników alarmowych na przestrzeni lat 2012–2016

Rok	Ilość izolatów	Odsetek wszystkich czynników alarmowych
2016	50	1,14%
2015	34	0,81%
2014	b.d.	b.d.
2013	18	0,44%
2012	11	0,33%

Dane ze 195 szpitali w Polsce, na podstawie [71].

Badania z tego zakresu prowadziły m.in. zespoły Grzybowski i wsp., z Instytutu Transplantologii [69], oraz Talaga-Ćwiertnia i wsp. [70]. Jak prezentuje tabela III, przypadków VRE jest stosunkowo niewiele w porównaniu z innymi czynnikami alarmowymi. Ich liczba w kolejnych latach sukcesywnie wzrasta. Równocześnie w 2014 r. zanotowano, iż za zakażenia miejsc operowanych w szpitalach tylko w 4,5% odpowiadały trzy grupy czynników alarmowych: MRSA, VRE i ESBL [71].

Mimo dominacji bakterii fenotypu VanA, dużym zagrożeniem mogą się stać patogeny o fenotypie VanB. Sadowy i wsp. przeanalizowali 278 izolatów VRE o fenotypie VanB, zebranych na przestrzeni 11 lat (1999–2010) w 22 polskich miastach. Stwierdzono, że geny warunkujące ten fenotyp są najczęściej zlokalizowane w transpozonie Tn1549 – w obrębie chromosomu bakteryjnego (81,65%) lub w plazmidzie (18%). Tylko w jednym przypadku zaobserwowano, że plazmid zawierający Tn1549 został zintegrowany z chromosomem bakteryjnym. Do roku 2006 geny warunkujące fenotyp VanB lokalizowano w plazmidach, a w kolejnych latach znajdowano je głównie w chromosomie bakteryjnym [72]. Interesujące badania przeprowadzono na próbach zaklasyfikowanych jako VRE, pozyskanych od pacjentów Szpitala Uniwersyteckiego w Bydgoszczy w latach 2005–2009. Kożuszko i wsp. przeanalizowali skład gatunkowy VRE i skuteczność różnych antybiotyków w ich zwalczaniu. Ustalono, że na 159 szczepów opornych na wankomycynę, aż 133 stanowił *E. faecium*, a jedynie 26 *E. faecalis*. W każdym kolejnym roku liczba takich izolatów była większa. Żaden z izolatów nie wykazał oporności na linezolid, a tylko bardzo niewielka ich liczba na chloramfenikol (3) i chinuprystynę/dalfoprystynę (1). Niemal wszystkie szczepy wykazywały oporność na ryfampicynę i ciprofloksacynę, a poziom oporności na gentamycynę, ampicylinę i penicylinę był również bardzo wysoki (w żadnym z przypadków nie był niższy niż 74%). Liczba szczepów opornych na streptomycynę w kolejnych latach malała, sięgając w 2009 poziomu 25,8%, a na tetracykliny oscylowała między 20–30%. W kolejnych latach silnie wzrastał poziom oporności na teikoplaninę (o 20% na przestrzeni 4 lat), co świad-

czy o stałym zwiększaniu się udziału w populacji VRE szczepów o fenotypie VanA [36].

Istotnych danych na temat genetycznych cech VRE *E. faecalis* dostarcza praca zespołu Łysakowskiej [7]. Autorzy badali występowanie genów zjadliwości wśród 161 szczepów z oddziałów zabiegowych dwóch szpitali w Łodzi w latach 2005–2006. Przynależność szczepów do analizowanego gatunku potwierdzano, wykrywając w reakcji PCR gen ligazy D-alaninowo-D-alanylowej. Poszukiwanymi genami zjadliwości były: *agg*, *cyl-L* i *cyl-S*, *esp*, *gelE* i gen *sprE*. Tylko 3 szczepy nie wykazywały obecności analizowanych genów zjadliwości. Gen *cyl-L* zidentyfikowano u 52,2% szczepów, gen *agg* u 62,73%, a gen *esp* u 71,2% szczepów *E. faecalis*. Ponad 80% szczepów posiadało geny *gelE* i *sprE* (odpowiednio 85,1% i 82,6%). Były to geny z badanej puli obecne najczęściej w analizowanych szczepach. Niezwykle istotny jest fakt, iż szczepy, które były odporne na działanie ampicyliny (tylko 6,8%), miały jednocześnie m.in. trzy geny zjadliwości. Aż 99 szczepów (czyli 61,49%) posiadało cztery lub więcej genów zjadliwości [7].

Celem badań przeprowadzonych przez Młynarczyk i wsp. było zbadanie poziomu podobieństwa genetycznego 20 szczepów VRE wyizolowanych w latach 2005–2008 z próbek pacjentów z trzech oddziałów Szpitala Dzieciątka Jezus w Warszawie. Fenotyp badanych szczepów VRE *E. faecium* określono za pomocą reakcji PCR, w której użyto starterów komplementarnych do DNA genów kodujących ligazę D-dipeptydową: *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* i *vanG*. Ich obecność potwierdza występowanie odpowiedniego fenotypu (VanA, VanB, VanD, VanE i VanG). Zaobserwowano, że wszystkie izolaty *E. faecium* posiadały gen ligazy *vanA*, a żaden nie posiadał innych, poszukiwanych genów. Potwierdziło to, że wszystkie szczepy VRE wykazywały fenotyp VanA. Analizowane szczepy wykazywały wysoką różnorodność na poziomie genomu. 12 z nich pochodziło od pacjentów leczonych na tym samym Oddziale Intensywnej Terapii [40]. W tym samym szpitalu przeanalizowano liczbę zakażeń VRE w latach 1998–2005, czyli na samym początku historii obecności VRE w Polsce. Na przestrzeni tych lat stale wzrastała liczba zakażeń bakteriami z rodzaju *Enterococcus* (z 293 izolatów w 1998 do 1185 izolatów w 2005), ale przypadki VRE zaczęły się pojawiać od 2003, gdy uzyskano 11 izolatów, w kolejnym roku 13, a w 2005 aż 64 izolaty. Oznacza to stale utrzymującą się tendencję wzrostową [40, 73].

Przebadano także 195 izolatów bakterii z rodzaju *Enterococcus*, pochodzących z przemysłowych hodowli świń, na terenie województwa Kujawsko-Pomorskiego. Skowron i wsp. ustalili, że dominującym gatunkiem był *E. hirae* (68%), natomiast pozostałe gatunki miały zdecydowanie mniejszy udział w populacji (*E. faecalis* 21%, *E. faecium* 3%). Tylko 2 izolaty wykazywały oporność na wankomycynę, posiadając fenotyp VanC [74].

11. Sytuacja epidemiologiczna w Europie

Z badań Orsi i wsp. wynika, że różnorodność częstości występowania VRE w Europie jest bardzo wysoka. Zdecydowanie częściej VRE pojawiają się na południu Europy, niż na północy [75]. Schouten i wsp. przeprowadzili analizę przypadków VRE w Europie. Dzięki współpracy 49 laboratoriów z 27 krajów europejskich udało się zebrać 4208 izolatów *Enterococcus* z prób klinicznych. Ustalono, że wśród nich znalazło się 18 przypadków VRE posiadających fenotyp VanA i 5 o fenotypie VanB. Z kolei izolatów cechujących się fenotypem VanC było 71. Fenotyp VanA najczęściej występował w próbach z Wielkiej Brytanii (2,7%), a VanB w izolatach ze Słowenii (2%). Fenotyp VanC był najpopularniejszy w izolatach z Łotwy (14,3%) i Turcji (11,7%). Wśród tych prób *E. gallinarum* dominował nad *E. casseliflavus*. Na podstawie tych danych można wysnuć wnioski, że w Europie częstość występowania VRE posiadających najgroźniejsze fenotypy jest stosunkowo niska [76]. Analizując poziom zagrożenia antybiotykoopornymi szczepami bakterii na Starym Kontynencie warto zwrócić uwagę na raporty sieci EARS-Net. Z jej danych wynika, że we wszystkich krajach, poza Grecją, zakażenia VRE *E. faecalis* nie są istotnym klinicznie problemem, w przeciwieństwie do VRE *E. faecium*. Do 2009 roku Polska na tle innych krajów Europy wyglądała bardzo korzystnie, gdyż infekcje o etiologii VRE *E. faecium* stanowiły nie więcej niż 5% wszystkich wywołanych tą bakterią. Niestety w 2012 roku Polska została zaliczona do grupy, gdzie wielkość ta mieści się między 5 a 10%, a w 2015 była już w grupie, w której parametr ten sięga od 10 do 25% [1, 77] (Tab. IV).

Przyczyną tych zatrważających zmian może być fakt, iż Polska graniczy bezpośrednio z państwami,

w których wspomniany wyżej wskaźnik dużo wcześniej był wysoki (Czechy, Niemcy, Litwa). Nie bez znaczenia jest również jego poziom w krajach, które Polacy uważają za interesujące kurorty wakacyjne (Grecja, Włochy), albo są miejscem ich emigracji zarobkowej (Irlandia, Wielka Brytania) [77]. Jedną z przyczyn zaobserwowanego rozmieszczenia zakażeń VRE w Europie mogą być różne wytyczne dotyczące stosowania antybiotyków, czy też kampanie informacyjne oraz poziom edukacji społeczeństwa. Wektorem dla enterokoków mogą być też zwierzęta, np. psy. Kubašová i wsp. przeanalizowali 160 prób enterokoków pochodzących od 105 zwierząt we wschodniej Słowacji. *E. faecium* stanowił 57,5%, *E. faecalis* 21,9%, *E. hirae* 17,5%, a pozostałe gatunki były bardzo nieliczne. Aż 71,9% szczepów wykazywało oporność na teikoplaninę. Najbardziej jednak zastanawiający jest fakt, iż 9 szczepów *E. faecium* posiadało marker specyficzny dla zakażeń szpitalnych [78].

Z analizy Remschmidt i wsp. wynika, że na terenie Niemiec zagrożenie ze strony VRE stale wzrasta. Procentowy udział VRE wśród enterokoków jest bardzo zróżnicowany między poszczególnymi krajami związkowymi: najwyższy jest w środkowych Niemczech (Berlin, Nadrenia Północna-Westfalia, Hesja, Saarland, Saksonia-Anhalt, Saksonia i Turynia), gdzie VRE stanowią powyżej 10% wszystkich enterokoków, a najniższy na północy. Tendencja ta nie uległa zmianie w latach 2007–2016. Zarejestrowano 12659 izolatów enterokoków pochodzących z próbek szpitalnych, a 833 z nich wykazywało oporność na wankomycynę [79]. Z kolei Gastmeier i wsp. wykazali, że w Niemczech w latach 2007–2012 odsetek zakażeń VRE wzrósł z 0,87% do 4,58% w przypadku ran pooperacyjnych oraz z 4,91% do 12,99% w przypadku zakażeń krwi [80].

Tabela IV

Zestawienie odsetka izolatów *Enterococcus faecium* opornych na wankomycynę z krajami, w których był zanotowany w latach 2012 i 2015

Odsetek izolatów <i>Enterococcus faecium</i> opornych na wankomycynę	2012	2015
poniżej 1%	Islandia, Norwegia, Szwecja, Finlandia, Estonia, Francja, Holandia, Słowenia, Chorwacja, Bułgaria	Islandia, Norwegia, Szwecja, Finlandia, Estonia, Francja, Belgia
od 1% do 5%	Hiszpania, Belgia, Dania, Austria, Słowacja, Węgry, Rumunia	Hiszpania, Dania, Holandia, Austria, Słowenia
od 5% do 10%	Łotwa, Litwa, Polska, Włochy	Czechy
od 10% do 25%	Wielka Brytania, Portugalia, Niemcy, Czechy, Grecja, Cypr	Portugalia, Wielka Brytania, Niemcy, Polska, Litwa, Łotwa, Słowacja, Węgry, Włochy, Bułgaria, Grecja
od 25% do 50%	Irlandia	Irlandia, Chorwacja, Rumunia, Cypr
powyżej 50%	brak	brak

Dane na podstawie [77].

Ciekawą analizę szczepów VRE z gatunku *E. faecium* przeprowadzili badacze z Turcji. Przebadano 55 izolatów, zawierających bakterie odporne na wankomycynę. Wszystkie szczepy były odporne na penicylinę G, ampicylinę i gentamycynę. Równocześnie były wrażliwe na linezolid i chinuprystynę/dalfoprystynę. 22 izolaty, które pozyskano od pacjentów wykazujących objawy zakażenia, uznano za inwazyjne, a pozostałe 33, które pochodziły ze skolonizowanej odbytnicy pacjentów bez objawów zakażenia bakteryjnego, uznano za nieinwazyjne. U wszystkich szczepów wykazano obecność genu *vanA*. W 14 izolatach nie wykryto genów wirulencji. Jeden taki gen, *esp*, obecny był w 39 izolatach, dwa geny w jednym izolacie (*esp* i *ebpA*; drugi z nich koduje podjednostkę A pilusa związanego z tworzeniem biofilmu przy zapaleniu wsierdza [81]) – podobnie jak 5 dodatkowych genów: *esp*; *ebpA*; *asa1*; *gelE* i *cpd*. Dostrzeżalna była tendencja, iż wśród szczepów uznanych za inwazyjne, częstość występowania genów wirulencji była niewielka [82].

Pinholt i wsp. przeanalizowali 495 próbek VRE *E. faecium* kilku szpitali w Danii na przestrzeni lat 2012–2014. Ustalono, że na początku badania większość populacji VRE stanowiły cztery liczne grupy bakterii o bliskim pokrewieństwie filogenetycznym w obrębie grup. W miarę upływu czasu następował stały wzrost zróżnicowania mikroorganizmów, tworzyły się nowe, mniej liczne grupy. Niektóre z nich wywoływały epidemię i zanikały, inne przez cały czas trwania badania były obecne w kilku różnych lokalizacjach [83].

12. Podsumowanie

Oporność na antybiotyki wśród bakterii będących przedstawicielami rodzaju *Enterococcus* staje się coraz bardziej istotnym problemem dla współczesnej służby zdrowia. Lata zaniedbań związanych z lekkomyślnym stosowaniem antybiotyków sprawiły, że coraz częściej pojawiają się szczepy odporne nie tylko na standardowe środki farmakologiczne, przeznaczone do ich zwalczania, ale i na leki „ostatniej szansy”. Poznanie molekularnych uwarunkowań mechanizmów oporności może być jednym ze sposobów zmniejszenia zagrożenia ze strony antybiotykoopornych enterokoków.

„Praca finansowana ze środków Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (KNW-1-182/N/8/B)”.

Piśmiennictwo

1. Talaga K., Bulanda M.: Czy enterokoki odporne na wankomycynę stanowią problem w polskich szpitalach? *Przegl. Epidemiol.* **69**, 861–864 (2015)
2. Mutters N.T., Mersch-Sundermann V., Mutters R., Brandt C., Schneider-Brachert W., Frank U.: Control of the spread of vancomycin-resistant enterococci in hospitals: epidemiology and clinical relevance. *Dtsch. Arztebl. Int.* **110**, 725–731 (2013)
3. Cetinkaya Y., Falk P., Mayhall C.G.: Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 686–707 (2000)
4. Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A.: *Mikrobiologia*. Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2011, s. 237–240.
5. Surface protein ESP [*Enterococcus faecium*], https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_016252734.1 (29.12.2017)
6. Surface protein ESP [*Enterococcus raffinosus*], https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_016250137.1 (29.12.2017)
7. Łysakowska M.E., Śmigiełski J., Denys A.: Występowanie genów zjadliwości wśród szczepów *Enterococcus faecalis* izolowanych od pacjentów i ze środowiska szpitalnego. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **61**, 125–132 (2009)
8. Comerlato C.B., de Resende M.C.C., Caierão J., d' Azevedo P.A.: Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, **108**, 590–595 (2013)
9. Kayaoglu G., Ørstavik D.: Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **15**, 308–320 (2004)
10. Szczypka A., Talaga K., Bulanda M.: Enterokoki odporne na wankomycynę jako czynniki etiologiczne zakażeń związanych z opieką zdrowotną – chorobotwórczość i metody kontroli. *Hygeia Public Health*, **51**, 134–140 (2016)
11. Freitas A.R., Peixe L. i wsp.: Human and swine hosts share vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* CC17 and CC5 and *Enterococcus faecalis* CC2 clonal clusters harboring Tn1546 on indistinguishable plasmids. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 925–931 (2011)
12. Szczypka K., Wilemska J., Hryniewicz W., Sitkiewicz I.: Epidemiologia zakażeń *Streptococcus pyogenes*, struktura klonalna populacji, antybiotykooporność. *Post. Mikrobiol.* **52**, 223–232 (2013)
13. Homan W.L., Tribe D., Poznanski S., Li M., Hogg G., Spalburg E., van Embden J.D., Willems R.J.: Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1963–1971 (2002)
14. Nilsson O.: Vancomycin resistant enterococci in farm animals – occurrence and importance. *Infect. Ecol. Epidemiol.* DOI: 10.3402/iee.v2i0.16959 (2012)
15. Top J., Willems R., van der Velden S., Asbroek M., Bonten M.: Emergence of clonal complex 17 *Enterococcus faecium* in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 214–219 (2008)
16. Top J., Willems R., Blok H., de Regt M., Jalink K., Troelstra A., Goorhuis B., Bonten M.: Ecological replacement of *Enterococcus faecalis* by multiresistant clonal complex 17 *Enterococcus faecium*. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 316–319 (2007)
17. Kawalec M., Pietras Z., Daniłowicz E., Jakubczak A., Gniadkowski M., Hryniewicz W., Willems R.J.: Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish hospitals: characterization of epidemic clones. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 147–153 (2007)
18. Miller W.R., Munita J.M., Arias C.A.: Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **12**, 1221–1236 (2014)
19. O'Driscoll T., Crank C.W.: Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect. Drug Resist.* **8**, 217–230 (2015)
20. Horodniceanu T., Bougueleret L., El-Solh N., Bieth G., Delbos F.: High-level, plasmid-borne resistance to gentamicin in *Streptococcus faecalis* subsp. *zymogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**, 686–689 (1979)
21. Mederski-Samoraj B.D., Murray B.E.: High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of enterococci. *J. Infect. Dis.* **147**, 751–757 (1983)

22. Uttley A.H., Collins C.H., Naidoo J., George R.C.: Vancomycin-resistant Enterococci. *Lancet*, **332**, 57–58 (1988)
23. Żabicka D., Literacka E., Bojarska K.: MDR, XDR, PDR – jednolite, międzynarodowe definicje nabytej oporności drobnoustrojów na antybiotyki. Aktualności Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków, 3 (2012), http://www.antybiotyki.edu.pl/pdf/biuletyn/biuletyn_npoa_3-2012.pdf (29.12.2017)
24. Tomczak S., Dettlaff K., Jelińska A.: Linezolid i jego analogi – perspektywy i ograniczenia terapii. *Farm. Współcz.* **8**, 227–234 (2015)
25. Gonzales R.D., DaPaul M., Schreckenberger C., Graham M.B., Swathi-Kelkar D., Besten K.D., Quinn J.P.: Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet*, **357**, 1179 (2001)
26. Auckland C., Teare L., Cooke F., Kaufmann M.E., Warner M., Jones G., Bamford K., Ayles H., Johnson A.P.: Linezolid-resistant Enterococci: report of the first isolates in the United Kingdom. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 743–746 (2002)
27. Herrero I.A., Inmaculada A., Issa N.C., Patel R.: Nosocomial spread of linezolid-resistant, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *New Engl. J. Med.* **346**, 867–869 (2002)
28. Leavis H.L., Willems R.J., Top J., Bonten M.J.: High-level ciprofloxacin resistance from point mutations in *gyrA* and *parC* confined to global hospital-adapted clonal lineage CC17 of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1059–1064 (2006)
29. Lewis J.S., Owens A., Cadena J., Sabol K., Patterson J.E., Jorgensen J.H.: Emergence of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1664–1665 (2005)
30. Montero C.I., Stock F., Murray P.R.: Mechanisms of resistance to daptomycin in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1167–1170 (2008)
31. Guido W., Gfrörer S., Fleige C., Witte W., Klare I.: Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from a German intensive care unit patient. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 1182–1183 (2008)
32. Cordina C., Hill R., Deshpande A., Hood J., Inkster T.: Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* associated with omeprazole use in a surgical patient. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 1806–1807 (2012)
33. Żabicka D., Stefaniuk E., Hryniewicz W.: Tigecyklina – aktywność wobec *Acinetobacter* ssp. http://www.korid.edu.pl/pdf/TIGECYKLINA_opracowanie_wer_ost.pdf (29.12.2017)
34. Ricaurte J.C., Boucher H.W., Turett G.S., Moeller R.C., Labombardi V.J., Kislak J.W.: Chloramphenicol treatment for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**, 17–21 (2001)
35. Eliakim-Raz N., Lador A., Leibovici-Weissman Y., Elbaz M., Paul M., Leibovici L.: Efficacy and safety of chloramphenicol: joining the revival of old antibiotics? Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 979–996 (2015)
36. Kożuszko S., Bogiel T., Gospodarek E.: *Enterococcus* sp. odporne na wankomycynę. *Dośw. Mikrobiol.* **61**, 351–357 (2009)
37. Holmström K., Gräslund S., Wahlström A., Pongshompo S., Bengtsson B., Kautsky N.: Antibiotic use in schrimp farming and implications for environmental and human health. *Int. J. Food Sci. Technol.* **38**, 255–266 (2003).
38. Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Łaniewska-Trokenheim Ł.: Oporność na antybiotyki bakterii z rodzaju *Enterococcus* występujących w żywności. *Kosmos*, **66**, 67–79 (2017)
39. Kuch A., Żabicka D., Hryniewicz W.: Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2009. Oznaczanie wrażliwości *Enterococcus* spp. Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów. <http://www.korid.edu.pl/pdf/04-Rek2009-Enterokoki.pdf> (29.12.2017)
40. Młynarczyk A., Grzybowska W., Mrówka A., Tyski S., Młynarczyk G.: Genetyczne podobieństwo opornych na wankomycynę szczepów *Enterococcus faecium* izolowanych z materiału klinicznego. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **62**, 297–302 (2010)
41. Lebreton F., Depardieu F., Bourdon N., Fines-Guyon M., Berger P., Camiade S., Leclercq R., Courvalin P., Cattoir V.: d-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4606–4612 (2011)
42. Zhu W., Murray P.R., Huskins W.C., Jernigan J.A., McDonald L.C., Clark N.C., Anderson K.F., McDougal L.K., Hageman J.C., Olsen-Rasmussen M., Frace M., Alangaden G.J., Chenoweth C., Zervos M.J., Robinson-Dunn B., Schreckenberger P.C., Reller L.B., Rudrik J.T., Patell J.B.: Dissemination of an *Enterococcus* Inc18-Like vanA Plasmid Associated with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4314–4320 (2010)
43. Wardal E., Markowska K., Żabicka D., Wróblewska M., Giemza M., Mik E., Połowniak-Pracka H., Woźniak A., Hryniewicz W., Sadowy E.: Molecular Analysis of VanA Outbreak of *Enterococcus faecium* in Two Warsaw Hospitals: The Importance of Mobile Genetic Elements. *Biomed Res Int.* 2014: 575367 (2014)
44. Freitas A.R., Novais C., Tedim A.P., Francia M.V., Baquero F., Peixe L., Coque T.M.: Microevolutionary Events Involving Narrow Host Plasmids Influences Local Fixation of Vancomycin-Resistance in *Enterococcus* Populations. *PLoS One.* **8**, e60589 (2013)
45. Lim S.K., Tanimoto K., Tomita H., Ike Y.: Pheromone-responsive conjugative vancomycin resistance plasmids in *Enterococcus faecalis* isolates from humans and chicken feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 6544–53 (2006)
46. Kelli L. Palmer K.L., Veronica N. Kos V.N., Gilmore M.S.: Horizontal Gene Transfer and the Genomics of Enterococcal Antibiotic Resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 632–639 (2010)
47. Faron M.L., Ledebore N.A., Buchana B.W.: Resistance mechanisms, epidemiology, and approaches to screening for vancomycin-resistant *Enterococcus* in the health care setting. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 2436–2447 (2016)
48. Hasman H., Aarestrup F.M., Dalsgaard A., Guardabassi L.: Heterologous expression of glycopeptide resistance vanHAX gene cluster from soil bacteria in *Enterococcus faecalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 648–653 (2006)
49. Depardieu F., Reynolds P.E., Courvalin P.: VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* 10/96A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 7–18 (2003)
50. Lebel S., Bouttier S., Lambert T.: The *cme* gene of *Clostridium difficile* confers multidrug resistance in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **238**, 93–100 (2004)
51. Boyd D.A., Willey B.M., Fawcett D., Gillani N., Mulvey M.R.: 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**, 2667–2672 (2008)
52. Xu X., Wang M. i wsp.: vanM, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4643–4647 (2010)
53. Jorgensen J.H., Crawford S.A., Kelly C.C., Patterson J.E.: In vitro activity of daptomycin against vancomycin-resistant enterococci of various Van types and comparison of susceptibility testing methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3760–3763 (2003)
54. Simner P.J., Zhanel G.G. i wsp.: Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in Canadian hospitals (CANWARD study, 2007 to 2013). *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 4315–4317 (2015)

55. Zhanel G.G., Hoban D.J. i wsp.: Antimicrobial-resistant pathogens in intensive care units in Canada: results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) study, 2005–2006. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1430–1437 (2008)
56. Ravi D., Rompicherla V., Govindan G., Shanmugam P.: Speciation of enterococcal isolates in a tertiary care hospital and molecular characterisation of vancomycin resistant enterococci (VRE). *Ind. J. Microbiol. Res.* **3**, 77–81 (2016)
57. Suzuki M., Koyano S., Okugawa S., Okazaki M., Seki G., Moriya K.: Diversity of vancomycin-resistant enterococci in a low endemicity area. *J. Glob. Antimicrob. Res.* **2**, 115–118 (2014)
58. Wei L., Wu Q., Jumei Z., Weipeng G., Moutong C., Liang X., Juan W., Lianyng M.: Prevalence and genetic diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from mineral water and spring water in China. *Front. Microbiol.* DOI: 10.3389/fmicb.2017.01109 (2017)
59. Sun H., Wang H., Xu Y., Jones R.N., Costello A.J., Liu Y., Li G., Chen M., Mendes R.E.: Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. clinical isolates recovered from hospitalized patients among several medical institutions in China. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **74**, 399–403 (2012)
60. Lai Ch.Ch., Chub Ch-Ch., Chengc A., Huang Y.T., Hsuehd P.R.: Correlation between antimicrobial consumption and incidence of health-care-associated infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci at a university hospital in Taiwan from 2000 to 2010. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **48**, 431–436 (2015)
61. Alves G.D.S., Pereira M.F., Bride L.L., Nunes A.P.F., Schuenck R.P.: Clonal dissemination of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST412 in a Brazilian region. *Braz. J. Infect. Dis.* DOI: 10.1016/j.bjid.2017.07.001 (2017)
62. Ruzon F.I., de Paula S.B., Kanoshiki R.L., Pereira-Santos J., Kerbauy G., Kobayashi R.K., Yamada-Ogatta S.F.: Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* vanA isolated from different sources at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. *J. Microbiol.* **48**, 814–821 (2010)
63. Charakterystyka produktu leczniczego weterynaryjnego (Advocin 180), http://www.zoetis.com.pl/global-assets/private/zoetis_com_pl_advocin_180_2013_06.pdf (29.12.2017)
64. Iweriebor B.C., Obi L.C., Okoh A.I.: Macrolide, glycopeptide resistance and virulence genes in *Enterococcus* species isolates from dairy cattle. *J. Med. Microbiol.* **65**, 641–648 (2016)
65. Akpaka P.E., Kisson S., Jayaratne P.: Molecular analysis of vancomycin-resistant enterococci isolated from regional hospitals in Trinidad and Tobago. *Adv. Med.* DOI: 10.1155/2016/8762691 (2016)
66. Somily A.M., Al-Mohizea M.M., Absar M.M., Fatani A.J., Ridha A.M., Al-Ahdal M.N., Senok A.C., Al-Qahtani A.A.: Molecular epidemiology of vancomycin resistant enterococci in a tertiary care hospital in Saudi Arabia. *Microb. Pathog.* **97**, 79–83 (2016)
67. Żabicka D.: Monitorowanie oporności w Polsce – dane sieci EARS-Net. http://www.korld.edu.pl/pdf/Monitorowanie_dane_2016_strona_KORLD.pdf (29.12.2017)
68. Talaga K., Odrowąż-Konduracka D., Paradowska B., Jagiencarz-Starzec B., Wolak Z., Bulanda M., Szczypta A.: Typing of *Enterococcus* spp. strains in 4 hospitals in the Małopolska region in Poland. *Adv. Clin. Exp. Med.* **27**, 111–117 (2018)
69. Grzybowska W., Młynarczyk G. i wsp.: Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* among patients of transplantology wards. *Transplant. Proceed.* **41**, 3256–3257 (2009)
70. Talaga-Ćwiertnia K., Bulanda M.: Analiza sytuacji epidemiologicznej zakażeń wankomycynoopornymi *Enterococcus faecium* na świecie, z uwzględnieniem obecnej sytuacji w Polsce. *Przegl. Epidemiol.* **72**, 3–15 (2018)
71. Kucharska I., Rychlewska A.: Szpitalne ogniska epidemiczne w Polsce w 2014 roku. Warszawa 21 września 2015 r., <http://www.antybiotyki.edu.pl/pdf/ogniskaepid3.pdf> (29.12.2017)
72. Sadowy E., Gawryszewska I., Kuch A., Żabicka D., Hryniewicz W.: The changing epidemiology of VanB *Enterococcus faecium* in Poland. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **37**, 927–936 (2018)
73. Młynarczyk G., Młynarczyk A., Brzuszkiewicz E., Łuczak M.: Oporność na antybiotyki glikopeptydowe szczepów z rodzaju *Enterococcus* izolowanych w latach 1997–2000 w szpitalu klinicznym w Warszawie. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **53**, 321–330 (2001)
74. Skowron K., Jeleńska A., Paluszak Z., Szala B.: Prevalence and distribution of VRE (vancomycin resistant enterococci) and VSE (vancomycin susceptible enterococci) strains in the breeding environment. *Ann. Agric. Environ. Med.* **23**, 231–236 (2016)
75. Orsi G.B., Ciorba V.: Vancomycin resistant enterococci health-care associated infections. *Ann. Ig.* **25**, 485–492 (2013)
76. Schouten M.A., Hoogkamp-Korstanje J.A., Meis J.F., Voss A., European VRE Study Group: Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**, 816–822 (2000)
77. Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union, EARS-Net surveillance data, November 2016, https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/antibiotics-EARS-Net-summary-2016_0.pdf (29.12.2017)
78. Kubašová I., Stropfiová V., Lauková A.: Safety assessment of commensal enterococci from dogs. *Folia Microbiol. (Praha)*, DOI: 10.1007/s12223-017-0521-z (2017).
79. Remschmidt C., Schröder C., Behnke M., Gastmeier P., Geffers C., Kramer T.S.: Continuous increase of vancomycin resistance in enterococci causing nosocomial infections in Germany – 10 years of surveillance. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* **7**, 54 (2018)
80. Gastmeier P., Schro C., Behnke M., Meyer E., Geffers C.: Dramatic increase in vancomycin-resistant enterococci in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 1660–1664 (2014)
81. Endocarditis and biofilm-associated pilus subunit A [*Enterococcus faecalis* 62], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/323480330> (29.12.2017)
82. Gozalan A., Durmaz R. i wsp.: Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains isolated from carriage and clinical samples in a tertiary hospital, Turkey. *J. Med. Microbiol.* **64**, 759–766 (2015)
83. Pinholt M., Gumpert H., Bayliss S., Nielsen J.B., Vorobieva V., Pedersen M., Feil E., Worning P., Westh H.: Genomic analysis of 495 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* reveals broad dissemination of a vanA plasmid in more than 19 clones from Copenhagen, Denmark. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 40–47 (2017)