

Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2009

Oznaczanie wrażliwości *Enterococcus* spp.

Alicja Kuch¹, Dorota Żabicka¹, Waleria Hryniewicz^{1,2}

- 1. Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków**
- 2. Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej**

5. Oznaczanie wrażliwości *Enterococcus* spp.

5.1. Metody

Podłoże MHA, zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda, inkubacja 16-18 h w temp. 35°C±2°C, w atmosferze tlenowej. **Inkubacja dla wankomycyny - pełne 24h.**

5.2. Najważniejsze mechanizmy oporności naturalnej i nabytej.

Oporność naturalna enterokoków obejmuje cefalosporyny, niskie stężenia aminoglikozydów, trimetoprim/sulfametoksazol, linkosamidy, niskie stężenia glikopeptydów u gatunków: *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* (fenotyp VanC) oraz właściwą dla *E. faecium* obniżoną wrażliwość na penicyliny. Enterokoki posiadają również mechanizmy oporności nabytej, spośród których największe obecnie znaczenie kliniczne i epidemiologiczne mają trzy z nich: oporność na wysokie stężenia antybiotyków aminoglikozydowych (HLAR), oporność na glikopeptydy (VRE) oraz oporność na linezolid (LRE).

5.2.1. Oporność na wysokie stężenia antybiotyków aminoglikozydowych (HLAR)

Naturalny mechanizm oporności na niskie stężenia aminoglikozydów występujący u enterokoków związany jest ze słabą przepuszczalnością bakteryjnych osłon komórkowych dla cząsteczek antybiotyku i uniemożliwia stosowanie tych leków w monoterapii. Skuteczne w leczeniu jest natomiast zastosowanie terapii skojarzonej aminoglikozydu z penicylinami lub glikopeptydami, pod

warunkiem wrażliwości *in vitro* na te grupy antybiotyków. Połączenie wykazuje działanie synergistyczne i umożliwia osiągnięcie efektu bakteriobójczego. Badanie lekowrażliwości enterokoków powinno uwzględniać oznaczenie poziomu oporności na antybiotyki aminoglikozydowe, bowiem wystąpienie wysokiego poziomu oporności na aminoglikozydy oznacza nabycie oporności (fenotyp HLAR) i wyklucza zastosowanie terapii skojarzonej aminoglikozydu z penicylinami lub glikopeptydami [5,22].

Termin **HLAR** (*ang. high level aminoglycoside resistance*) jest terminem używanym do określania wysokiego poziomu oporności na aminoglikozydy i oznacza brak istotnego klinicznie synergizmu z β -laktamami oraz glikopeptydami. Oporność wysokiego stopnia na aminoglikozydy jest mechanizmem nabytym i wynikiem działania enzymów modyfikujących aminoglikozydy tzw. AME (*ang. aminoglycoside-modifying enzymes*), o aktywności acetylotransferazy (AAC), fosfotransferazy (APH) lub nukleotydylotransferazy (ANT), a w przypadku streptomycyny może to być także modyfikacja miejsca docelowego działania leku, czyli podjednostki 30S rybosomu bakteryjnego.

Najważniejsze opisane dotychczas fenotypy oporności wysokiego stopnia na aminoglikozydy to:

- Fenotyp **HLGR – high level gentamicin resistance (MIC>128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wg EUCAST[10])** oznacza wysoki poziom oporności na gentamicynę i raportowany jest, jako wysoki poziom oporności na wszystkie aminoglikozydy z wyjątkiem streptomycyny oraz utratę synergizmu z β -laktamami oraz glikopeptydami. Ten typ oporności jest wynikiem działania enzymu bifunkcyjnego o aktywności acetylazo-fosfotransferazy (Aac(6')-Aph(2'')) warunkującego oporność krzyżową na wszystkie aminoglikozydy (z wyjątkiem streptomycyny).
- Fenotyp **HLSR – high level streptomycin resistant (MIC>1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wg EUCAST[10])** oznacza wysoki poziom oporności na streptomycynę i raportowany jest, jako wysoki poziom oporności tylko na streptomycynę, przy zachowanej wrażliwości na pozostałe aminoglikozydy oraz utratę synergizmu z β -laktamami i glikopeptydami dla streptomycyny. Ten fenotyp oporności jest wynikiem działania enzymu o aktywności nukleotydylotransferazy Ant(6') lub Ant(3''), modyfikującego streptomycynę bądź mutacjami w obrębie genów kodujących składniki podjednostki 30S rybosomu bakteryjnego.
- W przypadku niektórych szczepów obserwowano także **fenotyp oporności na wysokie stężenie kanamycyny (MIC>512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wg. EUCAST[10])**, co oznacza wysoki poziom oporności na kanamycynę i amikacynę oraz utratę synergizmu działania amikacyny i kanamycyny z β -laktamami i glikopeptydami. Ten typ oporności jest wynikiem działania

fosfotransferazy Aph(3') I-3 lub enzymu bifunkcyjnego o aktywności acetylazo-fosfotransferazy (Aac(6')-Aph(2'')).

Tab 5.1. Kryteria kwalifikowania szczepów do fenotypu HLAR na podstawie wartości MIC.

Antybiotyk	MIC [$\mu\text{g/mL}$]	
	CLSI [27]	EUCAST [10]
Genatmicyna	> 500	>128
Streptomycyna*	\geq 2000	>1024
Kanamycyna	-	>512

*Oznaczając MIC dla HLSR metodą dyfuzji w agarze z paska nasączonego gradientem antybiotyku należy pamiętać o przedłużeniu inkubacji do 24h, a w przypadku wystąpienia wrażliwości na lek po 24h, przedłużyć inkubację do 48h [9,27].

Tab 5.2. Kryteria kwalifikowania szczepów do fenotypu HLAR na podstawie wielkości strefy zahamowania wzrostu (metoda dyfuzyjno-krażkowa).

Antybiotyk	Krażek [μg]	Punkt odcięcia [mm]	
		CLSI [27]	EUCAST [10]
Genatmicyna	120	6	-
Streptomycyna	300	6	-
Kanamycyna	-	-	-

UWAGA!

W rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej, ze względu na stosowane opcje terapeutyczne, najczęściej oznacza się oporność wysokiego stopnia na gentamicynę, czyli fenotyp HLGR. W przypadku stwierdzenia oporności wysokiego stopnia na gentamicynę wynik oznaczania lekowrażliwości należy opatrzyć komentarzem: **HLGR – szczep o wysokim stopniu oporności na gentamicynę i pozostałe aminoglikozydy**. Wyjątek stanowi streptomycyna, która może pozostać aktywna wobec izolatu o fenotypie HLGR z powodu odmiennego mechanizmu oporności. W przypadku wprowadzenia do leczenia streptomycyny należy pamiętać o konieczności oznaczenia fenotypu HLSR.

W przypadku stwierdzenia oporności wysokiego stopnia na gentamicynę oraz na streptomycynę wynik oznaczania lekowrażliwości należy opatrzyć komentarzem: **HLAR- szczep o wysokim stopniu oporności na amino glikozydy brak synergizmu z penicylinami i glikopeptydami**.

5.2.2. Oporność na glikopeptydy (VRE – *ang. vancomycin resistant enterococci*)

Mechanizm oporności na wankomycynę polega na wytwarzaniu przez bakterie zmienionych cząsteczek dipeptydów: D-alanino-D-mleczanu oraz D-alanino-D-seryny o niskim powinowactwie do wankomycyny, które włączane są zamiast D-alanylo-D-alaniny w łańcuch prekursora biorącego udział w budowie ściany komórkowej. W przypadku włączenia zmienionych dipeptydów wankomycyna nie jest już w stanie zablokować syntezy peptydoglikanu. Opisano dotychczas 7 fenotypów oporności na wankomycynę: VanA [2], VanB [11], VanC [1], VanD [28], VanE [13], VanG [24] i VanL [3]. Ze względu na częstość występowania i szybkość rozprzestrzeniania się w populacji bakteryjnej największe znaczenie kliniczne mają fenotypy VanA i VanB. Oporność VanA i VanB jest przekazywana między komórkami drobnoustrojów za pomocą ruchomych elementów genetycznych takich jak plazmidy i transpozony. Lokalizacja genów związanych z fenotypem VanA i VanB w ruchomych elementach genetycznych warunkuje wysoki potencjał epidemiczny tych szczepów. [6].

Fenotyp VanA oznacza indukowalną oporność wysokiego stopnia (pojawiającą się dopiero w obecności antybiotyku) zarówno na wankomycynę (MIC 64-100 µg/ml) jak i teikoplaninę (MIC 16-512 µg/ml), występującą najczęściej u gatunków: *E. faecium*, *E. faecalis*, ale również u *E. avium*, *E. durans* oraz *E. raffinosum* [19].

Fenotyp VanB cechuje się indukowalną opornością na wankomycynę na różnym poziomie (MIC 4-1024 µg/ml) przy zachowanej wrażliwości *in vitro* na teikoplaninę (MIC 0,5-1 µg/ml). Występuje u gatunków *E. faecium*, *E. faecalis* oraz *E. durans* i *E. gallinarum* [22,30]. Na podstawie różnic w sekwencji DNA genów kodujących ligazę VanB w obrębie tego fenotypu wyróżniono 3 podtypy: VanB1, VanB2, VanB3 [6,7]. Nie wykazano natomiast związku pomiędzy występowaniem danego podtypu a poziomem oporności na wankomycynę i teikoplaninę. Wg danych KORDL VanB jest obecnie dominującym fenotypem w populacji enterokoków w Polsce.

Niepokojącym zjawiskiem, stanowiącym poważny problem diagnostyczny, jest pojawienie się w ostatnich latach szczepów enterokoków fenotypowo wrażliwych na wankomycynę (MIC ≤4 µg/ml), ale posiadających determinantę genetyczną charakterystyczną dla fenotypu VanB (*gen vanB2* ligazy), tzw. „low-MIC vancomycin-resistant enterococci” (LM-VRE) [15,26]. W takiej sytuacji wykrycie oporności (jednoznaczne jej potwierdzenie) jest możliwe jedynie w laboratorium referencyjnym. Szczepy o takim fenotypie oporności pojawiły się również w Polsce (dane KORDL niepublikowane). Należy pamiętać również o możliwości selekcji oporności na teikoplaninę wśród izolatów o fenotypie VanB w trakcie terapii teikoplaniną, co powoduje konieczność monitorowania poziomu oporności na glikopeptydy w czasie trwania terapii [20].

Fenotyp VanC jest mechanizmem oporności naturalnej, związanym z konstytutywnym, niskim stopniem oporności na wankomycynę (MIC 2-32 µg/ml) przy zachowanej wrażliwości na teikoplaninę (MIC 0,5-1 µg/ml). Mechanizm ten występuje u gatunków *E. gallinarum* oraz *E. casseliflavus* o niskim potencjale epidemicznym. Należy jednak pamiętać, że w przypadku wystąpienia u tych gatunków mechanizmu oporności nabytej (VanA, rzadziej VanB) mogą być one źródłem ciężkich zakażeń szpitalnych [4,6].

Pozostałe **fenotyp VanD, VanE, VanG oraz VanL** występują niezmiernie rzadko i warunkują oporność na wankomycynę (wyjątek stanowi VanD gdzie może wystąpić również oporność na teikoplaninę). W Polsce dotychczas nie odnotowano szczepów klinicznych o tych fenotypach oporności.

5.2.3. Oporność na linezolid (LRE – ang. linezolid resistant enterococi).

Oporność na linezolid jest wynikiem mutacji punktowej w nukleotydzie 2576 genu kodującego 23S rRNA (następuje zamiana guaniny na tyminę), co w konsekwencji prowadzi do utraty powinowactwa leku do rybosomu i zahamowania syntezy białek [14,31]. LRE jest wciąż rzadko występującym mechanizmem oporności u enterokoków. Dotychczas opisano w Polsce jeden szczep kliniczny *E. faecium* oporny na linezolid w 2004 roku [21], a w roku ubiegłym odnotowano kolejny przypadek, również gatunek *E. faecium* (dane KORDL nieopublikowane). Być może zjawisko to jest częstsze, ale nieraportowane. W przypadku oznaczania MIC linezolidu metodą dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku należy pamiętać, że linezolid zaliczany jest do leków bakteriostatycznych, dla których odczyt MIC musi być dokonywany zgodnie z instrukcją producenta paska. Dla leków bakteriostatycznych takich jak linezolid strefa zahamowania wzrostu jest niewyraźna (rozmyta) i za wartość MIC przyjmujemy się stężenie leku hamujące wzrost 80% kolonii z zawiesiny a zatem należy pominąć wzrost, który oceniamy, że odpowiada 20% zawiesiny bakteryjnej [9,10].

5.3. ANTYBIOGRAM PODSTAWOWY

UWAGA!

Enterokoki wykazują naturalną oporność na: niskie stężenia aminoglikozydów, cefalosporyny, klindamycynę i trimetoprim/sulfametoksazol, dlatego należy pamiętać, aby **nie oznaczać wrażliwości** na te leki szczepów *Enterococcus spp.* Informację o naturalnej oporności na wymienione leki należy umieszczać pod wynikiem antybiogramu.

Z powodu różnic w oporności na leki, jakie występują u izolatów *E. faecalis* i *E. faecium* oraz naturalnej oporności na glikopeptydy u *E. casseliflavus* i *E. gallinarum*, istotne jest, aby laboratorium **prawidłowo identyfikowało te gatunki.**

Tab. 5.3.1. ANTYBIOGRAM PODSTAWOWY

<p>Penicylina 10 IU i Ampicylina 10 µg</p>	<p>Wrażliwość na penicylinę oznacza wrażliwość na penicylinę, ampicylinę, amoksycylinę, piperacylinę, preparaty skojarzone z inhibitorami β-laktamaz (ampicylina/sulbaktam, amoksycylina/kw. klawulanowy, piperacylina/tazobaktam). Oporność na ampicylinę oznacza oporność również na ureidopenicyliny i karbapenemy [10]. Stosowanie krążka z ampicyliną pozwala lepiej przewidywać wrażliwość na imipenem u <i>Enterococcus faecalis</i> [29]. Karbapenemy są nieaktywne <i>in vitro</i> wobec większości izolatów <i>Enterococcus faecium</i> [17]. Oporność na ampicylinę lub penicylinę związana z wytwarzaniem β-laktamazy u enterokoków występuje bardzo rzadko, dotyczy głównie gatunku <i>E. faecalis</i> i powinna być wykrywana testem z nitrocefiną. Dodatni wynik testu na β-laktamazę oznacza oporność na penicylinę oraz amino-, karboksy- i ureidopenicyliny. Do dnia dzisiejszego nie opisano występowania takich szczepów w Europie, a więc rutynowe oznaczanie beta-laktamaz nie jest celowe. Uwaga: zaleca się oznaczanie wrażliwości na oba leki (penicylinę i ampicylinę), bowiem pojawiły się szczepy odporne na penicylinę a wrażliwe na ampicylinę. Prawidłowo zidentyfikowane do poziomu gatunku izolaty <i>E. faecalis</i>, dla których stwierdzono niewrażliwość na penicylinę lub ampicylinę powinny być przesłane w celu potwierdzenia do KORLD.</p>
<p>Gentamicyna 120 µg</p>	<p>Jeżeli strefa wokół krążka wynosi 7-9 mm konieczne jest wykonanie oznaczenia metodą przeglądową z gentamicyną w podłożu (patrz punkt 5.5.1).</p>
<p>Wankomycyna 30 µg</p>	<p>Konieczne jest, aby inkubację prowadzić pełne 24 godziny, a odczytu dokonywać w świetle przechodzącym; wzrost mgławicowy lub obecność kolonii w strefie zahamowania wzrostu uznajemy za oporność. Dla szczepów wykazujących strefę średniej wrażliwości (15-16 mm) należy wykonać oznaczanie metodą przeglądową (punkt 5.5.2) i/lub oznaczenie MIC.</p>
<p>Teikoplanina 30 µg</p>	

UWAGA!

Szczepy enterokoków o wykazanym przez laboratorium, metodami fenotypowymi, oporności na glikopeptydy należy przesłać do laboratorium referencyjnego (KORDL) w celu jednoznacznego potwierdzenia obecności fenotypu VRE w szczepie klinicznym metodami biologii molekularnej

Tab. 5.3.2. ATYBIOGRAM PODSTAWOWY DLA SZCZEPÓW IZOLOWANYCH Z MOCZU

Ampicylina 10µg	Stosowanie krążka z ampicyliną pozwala lepiej przewidywać wrażliwość na imipenem u <i>E. faecalis</i> [29] Karbapenemy są nieaktywne <i>in vitro</i> wobec większości izolatów <i>E. faecium</i> [17,29].
Nitrofurantoina 300 µg	
Ciprofloksacyna 5 µg Lewofloksacyna 5 µg Norfloksacyna 10 µg	
Fosfomycyna (trometamol) 200µg	Stosować tylko wobec <i>E. faecalis</i> izolowanych z ostrych nieskomplikowanych zakażeń dolnych dróg moczowych (cystitis-zapalenie pęcherza moczowego).

5.4. ANTYBIOGRAM ROZSZERZONY

Tab. 5.4. ATYBIOGRAM ROZSZERZONY

Streptomycyna 300 µg	Jeżeli strefa wokół krążka wynosi 7-9 mm konieczne jest wykonanie oznaczenia metodą przeglądową ze streptomycyną w podłożu (patrz punkt 5.5.1).
Tetracyklina 30 µg*	Szczepy wrażliwe na tetracyklinę należy uważać za wrażliwe na doksyycylinę. Szczepy średniowrażliwe lub odporne na tetracyklinę mogą być wrażliwe na doksyycylinę.
Tigecyklina 15 µg**	Jest zarejestrowana w UE do leczenia ciężkich zakażeń w obrębie jamy brzusznej oraz skomplikowanych zakażeń skóry i tkanki podskórnej. Wartości graniczne; wg EUCAST wrażliwy MIC ≤0,25 µg/mL, odporny >0,5 µg/mL [10], wg FDA wrażliwy MIC. ≤0,25 µg/mL, szczepy wrażliwe strefa zahamowania wzrostu ≥22 mm [12].
Chloramfenikol 30 µg*	Stosować wyjątkowo, zawsze po oznaczeniu MIC.
Rifampicyna 5 µg*	Stosować wyjątkowo, tylko wobec szczepów wieloopornych; nie stosować w monoterapii.
Chinupristyna/dalfopristyna 15 µg	Stosować tylko wobec <i>E. faecium</i> . Naturalna oporność <i>E. faecalis</i> .
Linezolid 30 µg***	Oznaczać w przypadku oporności na wankomycynę – VRE.

*W związku z ograniczeniem opcji terapeutycznych wobec enterokoków opornych na glikopeptydy, stosowanie chloramfenikolu, tetracykliny i rifampicyny może być rozważane w leczeniu zakażeń wywołanych tymi drobnoustrojami, jednakże zawsze po uprzednim oznaczeniu MIC tych leków.

**Oznaczając MIC tigecykliny metodą mikrorozcieńczeń w bulionie lub rozcieńczeń w agarze, standard tigecykliny należy dodać do podłoża w dniu badania. Ponadto, jeśli oznaczamy MIC metodą mikrorozcieńczeń w bulionie podłoże musi być przygotowane nie wcześniej niż w ciągu 24 godz. przed badaniem lub, jeśli jest starsze, powinno zostać zagotowane (i ostudzone) tuż przed dodaniem tigecykliny w celu usunięcia tlenu z podłoża [16]. W przypadku pasków nasasyconych gradientem antybiotyku należy pracować na świeżych, nieprzeterminowanych podłożach.

*** Oznaczając MIC linezolidu metodą dyfuzji w agarze z paska nasączonego gradientem antybiotyku należy pamiętać o prawidłowym odczycie strefy zahamowania wzrostu.

5.5. Metody oznaczania lekowrażliwości i mechanizmów oporności *Enterococcus spp.*

5.5.1. Oznaczanie oporności wysokiego stopnia na antybiotyki aminoglikozydowe (HLAR) – metoda przeglądowa wg CLSI [27].

- Podłoże: BHIA z gentamicyną 500 µg/ml lub streptomycyną 2000 µg/ml.
- Zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda.
- Nanosimy 10 µl zawiesiny bakteryjnej w postaci kropli na agar z antybiotykiem.
- Inkubacja: 24h, w temp. 35°C, atmosferze tlenowej; w przypadku streptomycyny, jeżeli szczep jest wrażliwy, inkubację przedłużamy do 48h.

Odczyt: **wzrost więcej niż jednej kolonii oznacza oporność.**

5.5.2. Oznaczanie wrażliwości na glikopeptydy - metoda przeglądowa wg CLSI [27].

- Podłoże: BHIA z wankomycyną 6 µg/ml.
- Zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda.
- Nanosimy 10 µl zawiesiny bakteryjnej w postaci kropli.
- Inkubacja: 24h, w temp. 35°C, w atmosferze tlenowej.
- Odczyt: **wzrost, co najmniej jednej kolonii może oznaczać oporność.** W takim przypadku konieczne jest wykonanie oznaczenia MIC oraz testu na ruch i wytwarzanie pigmentu w celu rozróżnienia czy nie mamy do czynienia z gatunkami z naturalną opornością na wankomycynę (*E. gallinarum* i *E. casseliflavus*). Gatunki te często rosną na podłożu z 6 µg/ml wankomycyny (fenotyp VanC zakres MIC 2-32 µg/ml) [4,8] natomiast są wrażliwe na teikoplaninę.

5.5.3. Oznaczanie wrażliwości na glikopeptydy – z wykorzystaniem podłoży wskaźnikowych.

Od dłuższego czasu dostępne są do badań przesiewowych w kierunku VRE podłoża mikrobiologiczne zawierające obok wankomycyny substancje hamujące wzrost innych drobnoustrojów (np. azydek sodu) oraz substancje wskaźnikowe dla enterokoków (eskulina, 40% żółć). Coraz częściej do podłoży dodawane są również wskaźniki chromogenne. Wykonanie i interpretacja wyników testu powinny być prowadzone zgodnie z zaleceniami producenta [20,23].

UWAGA!

Szczepy enterokoków o wykazanym przez laboratorium, metodami fenotypowymi, oporności na glikopeptydy należy przesłać do laboratorium referencyjnego (KORDL) w celu jednoznacznego potwierdzenia obecności fenotypu VRE w szczepie klinicznym metodami biologii molekularnej

5.6. Szczepy wzorcowe:

Staphylococcus aureus ATCC 25923 – szczep zalecany do kontroli jakości oznaczania lekowrażliwości w metodzie dyfuzyjno-krażkowej

Enterococcus faecalis ATCC 29212 – szczep wrażliwy na aminoglikozydy i wankomycynę zalecany do kontroli jakości: oznaczania MIC dla *Enterococcus* spp, oznaczania fenotypu HLAR w metodzie przeglądowej i w metodzie dyfuzyjno-krażkowej oraz w metodzie przeglądowej z wankomycyną w podłożu. Szczep ten służy także do oznaczania zawartości tyminy i tymidyny w podłożu (przy prawidłowej zawartości strefa wokół krażka z trimetoprimem/sulfametoksazolem powinna być ≥ 20 mm).

Enterococcus faecalis ATCC 51299 - szczep oporny na aminoglikozydy i wankomycynę, zalecany do kontroli jakości oznaczania fenotypu HLAR w metodzie przeglądowej oraz dyfuzyjno-krażkowej, a także do wykrywania oporności na glikopeptydy w metodzie przeglądowej z wankomycyną w podłożu.

Enterococcus faecalis MIKROBANK 10.001 – służy do kontroli jakości oznaczania fenotypu HLAR w metodzie przeglądowej, a także do kontroli jakości oznaczania oporności na wankomycynę w metodzie przeglądowej z wankomycyną w podłożu (kontrola dodatnia - szczep oporny na aminoglikozydy i wankomycynę, VanB).

Piśmiennictwo

1. Arias C.A., Courvalin P., Reynolds P.E. vanC cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. Antimicrob. Agents Chemother., 44: 1660 – 1666 (2000).
2. Arthur M., Mlinas C., Depardieu F., Courvalin P. Characterization of Tn1546, a tn3-related transposon, conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursor in *Enterococcus faecium* BM4147. J Bacteriol., 175: 117 – 127 (1993).
3. Boyd D.A., Willey B.M., Fawcett D., Gillani N., Mulvey M.R. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level ancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL. Antimicrob Agents Chemother., 52:2667-26672 (2008).
4. Centikaya Y., Falk P., Mayhall C. G. Vancomycin-resistant enterococci. Clin. Microbiol. Rev., 13, 686-707 (2000).
5. Chow J.W. Aminoglycoside resistance in enterococci. Clin Infect Dis., 31: 586-589 (2000).
6. Courvalin P. Genetics of glycopeptide resistance in Gram-positive pathogens. Int. J. Med. Microbiol., 294: 479 – 486 (2005).

7. Dahl K.H., Skov Simonsen G., Olsvik R., Sundsfjord A.. Heterogeneity in *vanB* gene cluster of genetically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1105-1110 (1999).
8. Dargere S., Vergnaud M., Verdon R., Saloux E., Le Page O., Leclercq R., Bazin C. *Enterococcus gallinarum* endocarditis occurring on native heart valves. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 2308-2310 (2002).
9. Etest Technical Manual, www.abbiiodisc.com.
10. EUCAST documents www.escmid.org/research_projects/eucast/.
11. Evers S., Reynolds P.E., Courvalin P. Sequence of the *vanB* and *ddl* genes encoding D-alanine:D-lactate and D-alanine:D-alanine ligases in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* V583. *Gene.*, 140: 97 – 102 (1994).
12. FDA ; www.fda.gov.
13. Fines M., Perichon B., Reynolds P., Sahn D.F., Courvalin P. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43: 2161 – 2164 (1999).
14. Gonzales R.D., Schreckenberger P.C., Graham M.B., Kelkar S., DenBesten K., Quinn J.P. Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet.*, 14; 357:1179 (2001).
15. Grabsch E.A., Chua K., Xie S., Byrne J., Ballard S.A., Ward P.B., Grayson M.L. Improved detection of vanB2-containing *Enterococcus faecium* with vancomycin susceptibility by Etest using oxgall supplementation. *J Clin Microbiol.*, 46: 1961-1964 (2008).
16. Hope R., Warber M., Mushtaq S., Ward M.E., Parsons T., Livermore D.M.. Effect of medium type, age and aeration on the MICs of tigecycline and classical tetracyclines. *J. Antimicrob. Chemother.*, 56, 1042-1046 (2005).
17. Jones R. N. Prediction of enterococcal imipenem susceptibility using ampicillin or penicillin MICs: mere evidence for a class concept. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 3810-3811 (2001).
18. Kawalec M., Gniadkowski M., Kedzierska J., Skotnicki J., Fiett J., Hryniewicz W. Selection of a teicoplanin-resistant *Enterococcus faecium* mutant during an outbreak caused by vancomycin-resistant enterococci with the *vanB* phenotype. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 4274-4282 (2001).
19. Kawalec M., Kedzierska J., Gajda A., Sadowy E., Wegrzyn J., Naser S., Skotnicki A.B., Gniadkowski M. and Hryniewicz W. Hospital outbreak of vancomycin-resistant enterococci caused by a single clone of *Enterococcus raffinosus* and several clones of *Enterococcus faecium*. *Clin. Microbiol. Infect.*, 13: 893-901 (2007).

20. Kuch A., Stefaniuk E., Ozorowski T., Hryniewicz W. New selective and differential chromogenic agar medium, chromID VRE, for screening vancomycin-resistant *Enterococcus* species. *J Microbiol Methods.*, 2009; 77: 124-126.
21. Krawczyk B., Samet A., Bronk M., Hellmann A., Kur J. Emerging linezolid-resistant, vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from a patient of a haematological unit in Poland. *Pol J Microbiol.*, 53: 193 – 196 (2004).
22. Leclercq R., Dutka-Malen S., Brisson-Noël A., Molinas C., Derlot E., Arthur M., Duval J., Courvalin P. Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides. *Clin Infect Dis.*, 15: 495-501 (1992).
23. Malhotra-Kumar S., Haccuria K., Michiels M., Ieven M., Poyart C., Hryniewicz W., Goossens H. MOSAR WP2 Study Team. Current trends in rapid diagnostics for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and glycopeptide-resistant enterococcus species. *J Clin Microbiol.*, 46: 1577-1587 (2008)
24. McKessar S.J., Berry A.M., Bell J.M., Turnidge J.D., Paton J.C. Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 44: 3224 – 3228 (2000).
25. MICE Technical Manual, www.oxid.com.
26. Pendle S., Jelfs P., Olma T., Su Y., Gilroy N., Gilbert G.L. Difficulties in detection and identification of *Enterococcus faecium* with low-level inducible resistance to vancomycin, during a hospital outbreak. *Clin Microbiol Infect.*, 14: 853 – 857 (2008).
27. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. CLSI M100-S19, Vol. 29, No.3 (2009).
28. Perichon B., Reynolds P., Courvalin P. VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41: 2016 – 2018 (1997).
29. Weinstein M. P. Comparative evaluation of penicillin, ampicillin and imipenem MICs and susceptibility breakpoints for vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 2729-2731 (2001).
30. Werner G., Coque T.M., Hammerum A.M., Hope R., Hryniewicz W., Johnson A., Klare I., Kristinsson K.G., Leclercq R., Lester C.H., Lillie M., Novais C., Olsson-Liljequist B., Peixe L.V., Sadowy E., Simonsen G.S., Top J., Vuopio-Varkila J., Willems R.J., Witte W., Woodford N. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill.* 20;13,pii: 19046 (2008).
31. Zurenko G., Todd W.M., Hafkin B.A., Myers B., Kaufman C., Bloc J. Development of linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in two compassionate use program patients treated

with linezolid [abstract 828], p.118, In: Program and abstracts of the 39th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; San Francisco. American Society for Microbiology, Washington, DC (1999).