

Ksenia Szymanek-Majchrzak<sup>1\*</sup>, Andrzej Młynarczyk<sup>1</sup>, Grażyna Młynarczyk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Wpłynęło w marcu 2013 r.

1. Wstęp. 2. Wankomycyna i inne glikopeptydy. 2.1. Charakterystyka antybiotyków. 2.2. Kryteria wrażliwości na glikopeptydy. 3. Nabyta oporność na wankomycynę. 3.1. Enterokoki VRE. 3.2. Transfer operonu *vanA* ze szczepów *Enterococcus* spp. do izolatów metycylino-opornych *Staphylococcus aureus* – możliwości i obawy. 3.3. Wankomycyno-oporne szczepy *Staphylococcus aureus* (VRSA). 3.3.1. Mechanizm oporności u VRSA warunkowany obecnością operonu *vanA*. 3.3.1.1. Heterologiczna ekspresja operonu *vanA* u wankomycyno-opornych *S. aureus*. 3.3.1.2. Wankomycyno-oporne *S. aureus* – analiza przypadków. 3.3.1.3. Epidemiologia szczepów VRSA *vanA*. 3.3.2. Szczepy VRSA – *vanA*-negatywne (dawne *Staphylococcus aureus* o obniżonej wrażliwości na wankomycynę, VISA) – pochodzenie oraz mechanizm oporności. 4. Szczepy *Staphylococcus aureus* wykazujące fenotyp hetero-VISA. 5. Opcje terapeutyczne leczenia ciężkich zakażeń o etiologii *S. aureus*, wobec których terapia wankomycyną pozostaje nieskuteczna. 6. Podsumowanie

### Resistance of *Staphylococcus aureus* strains to glycopeptides

**Abstract:** Until recently, vancomycin was perceived as an effective drug for the treatment of serious infections with MRSA etiology. For over 30 years, since the introduction of the antibiotics on the pharmaceutical market, there was no case of *Staphylococcus aureus* resistant to the glycopeptide and it seemed that strains of *S. aureus* are naturally sensitive to vancomycin. Problems began to appear at the beginning of the 90s of the twentieth century, when more and more treatment failures with the use of the glycopeptide antibiotics were being reported. Strains of *S. aureus* which may manifest decreased susceptibility or resistance to vancomycin and/or teicoplanin were recognized as the main cause of these failures. VRSA (vancomycin resistant *S. aureus*), with the genotype *vanA* conditioned by the presence of *vanA* operon transmitted from *Enterococcus* are extremely rare. More frequent are VISA (vancomycin intermediate *S. aureus*) or VRSA *vanA*-negative strains exhibiting thickened cell walls, increased content of free dipeptide D-Ala-D-Ala in peptidoglycans and disorders in autolytic processes, and hetero-VISA strains sensitive to vancomycin (MIC<sub>VA</sub> ≤ 2 mg/L), but containing subpopulations of cells exhibiting MIC values at different levels. These effects are caused by different molecular mechanisms, which are related to different regulatory systems and manifested by diverse phenotypic features, but the result is always the lack of treatment efficacy. A review of the mechanisms leading to the formation and spread of *S. aureus* isolates for which the vancomycin treatment can be ineffective has become an essential objective of this monograph.

1. Introduction. 2. Vancomycin and other glycopeptides. 2.1. Characteristics of the antibiotics. 2.2. Criteria of sensitivity to glycopeptides. 3. Transferred resistance to vancomycin. 3.1. *Enterococci* VRE strains. 3.2. The *vanA* operon transfer from *Enterococcus* spp. to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains – possibilities and apprehensions. 3.3. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains (VRSA). 3.3.1. Mechanism of resistance of VRSA strains – determination the presence of *vanA* genes. 3.3.1.1. Heterologic expression of *vanA* operon in vancomycin-resistant *S. aureus*. 3.3.1.2. Vancomycin-resistance of *S. aureus* – case studies. 3.3.1.3. Epidemiology of VRSA *vanA* strains. 3.3.2. VRSA strains – *vanA*-negative (previous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*, VISA) – provenance and mechanism of resistance. 4. The hetero-VISA phenotype expression in *Staphylococcus aureus* strains. 5. Therapeutic options for the treatment of serious infections with *S. aureus* etiology for which vancomycin therapy remains ineffective. 6. Summary

**Słowa kluczowe:** hetero-VISA, *Staphylococcus aureus*, VISA, VRSA, wankomycyna

**Key words:** hetero-VISA, *Staphylococcus aureus*, vancomycin, VISA, VRSA

## 1. Wstęp

*Staphylococcus aureus* jest jednym z najbardziej niebezpiecznych ludzkich patogenów. Wykazuje złożone mechanizmy patogenezы oraz posiada bogaty arsenał czynników zjadliwości. Powszechność stosowania antybiotykoterapii w leczeniu zakażeń oraz szerokie zastosowanie antybiotyków w innych dziedzinach, zwłaszcza takich jak rolnictwo, doprowadziły do wyselekcjonowania szczepów bakterii wysoce-opornych na chemioterapeutyki, wśród których gronkowce stanowią ważną grupę [64]. Szczególnie niebezpieczne okazały

się metycylino-oporne szczepy *S. aureus* (MRSA), które opisano w 1961 r. [43], oporne na wszystkie antybiotyki beta-laktamowe, oprócz najnowszych cefalosporyn specjalnie skierowanych przeciwko MRSA. Wśród tych cefalosporyn obecnie duże nadzieje wiąże się z fosamilem ceftaroliny, dopuszczonym przez Komisję Europejską do obrotu w sierpniu 2012 (Zinfor, Astra Zeneca, do wlewu dożylnego). Jednakże lekiem z wyboru w leczeniu ciężkich zakażeń MRSA jest wciąż wankomycyna. Ponieważ przez ponad 30 lat (od wprowadzenia w 1958 r.) nie odnotowano przypadku izolacji szczepu gronkowca złocistego opornego, uważano wręcz, że

\* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa; tel.: (22) 628 27 39; e-mail: xenia.szymanek@wum.edu.pl

*Staphylococcus aureus* wykazują gatunkową wrażliwość na ten glikopeptyd. Jednakże już od początku lat '90 XX wieku coraz częściej opisuje się przypadki braku skuteczności wankomycyny mimo, że izolowane szczepy, według obowiązujących wówczas kryteriów, można było zaliczyć do wrażliwych. Jednym z przypuszczalnych mechanizmów braku skuteczności leku, mimo wrażliwości *in vitro*, mogło być zjawisko tolerancji, które w przypadku wankomycyny ma miejsce wówczas, kiedy wartość MBC (minimal bactericidal concentration) jest przynajmniej 32-krotnie wyższa niż MIC (minimal inhibitory concentration) [66]. W 1996 roku, w Japonii zidentyfikowano pierwszy izolat kliniczny *S. aureus*, wykazujący obniżoną wrażliwość na wankomycynę. Nazwany został wówczas VISA, od „vancomycin intermediate *S. aureus*” lub GISA od „glycopeptide intermediate *S. aureus*”, ponieważ wykazywał także obniżoną wrażliwość na teikoplaninę. Wykryto również pierwszy szczep *S. aureus* wrażliwy na wankomycynę, ale wytwarzający subpopulacje komórek, dla których wartości MIC glikopeptydu były na zróżnicowanym poziomie (hetero-VISA, hetero-GISA) [36, 37]. U żadnego z tych szczepów nie wykryto genów, które mogłyby warunkować oporność na glikopeptydy [36, 37]. W 2002 roku w Michigan, w Stanach Zjednoczonych, wyizolowano pierwszy szczep gronkowca złocistego wykazujący wysoki poziom oporności na glikopeptydy (VRSA, vancomycin resistant *S. aureus* lub GRSA, glycopeptide resistant *S. aureus*) [14, 96]. Szczep ten, jak udowodniono uzyskał geny oporności od bakterii z rodzaju *Enterococcus*. Podłoże molekularne oraz mechanizmy warunkujące obniżoną wrażliwość szczepów opisanych po raz pierwszy w Japonii oraz szczepów opisanych w Stanach Zjednoczonych diametralnie się różnią. Celem niniejszej monografii jest przybliżenie mechanizmów prowadzących do powstawania i rozprzestrzeniania się izolatów *S. aureus*, wobec których leczenie wankomycyną może z większym lub mniejszym prawdopodobieństwem okazać się nieskuteczne.

## 2. Wankomycyna i inne glikopeptydy

### 2.1. Charakterystyka antybiotyków

Wankomycyna została wyizolowana w połowie lat 50-tych XX w. z pochodzących z Borneo promieniowców *Streptomyces orientalis* (obecnie *Amycolatopsis orientalis*) [54, 68], przez E.C. Kornfelda, pracownika koncernu Eli Lilly. Do leczenia wankomycyna została wprowadzona w 1958 r. [68].

Wankomycyna, jest dużą cząsteczką, o masie cząsteczkowej 1485,7 Da. Jest cyklicznym heptapeptydem, zawierającym trzy cykliczne systemy, z których każdy może istnieć w postaci jednego z dwóch możliwych atropoizomerów. W naturze, spośród ośmiu możliwych

atropoizomerów, występuje tylko jeden. Cząsteczka podstawnika aglikonu stwarza dziewięć dodatkowych centrów stereochemicznych [7, 9]. Mechanizm działania wankomycyny polega na blokowaniu biosyntezy ściany komórkowej bakterii. Ze względu na brak możliwości dostępu do miejsca docelowego u bakterii Gram-ujemnych, antybiotyk jest aktywny jedynie w stosunku do większości bakterii Gram-dodatnich [7].

Ściana komórkowa jest jedną z najważniejszych struktur komórki bakteryjnej. U drobnoustrojów Gram-dodatnich składa się głównie z heteropolimeru – peptydoglikanu, zwanego mureiną [56, 79]. Synteza peptydoglikanu zachodzi w trzech etapach i w trzech różnych miejscach w komórce bakteryjnej. Pierwszy przebiega w cytoplazmie i polega na syntezie prekursorów: urydyno-di-fosforanu-N-acetylmuramylo-pentapeptydu (UDP-MurNAc-pentapeptyd) oraz UDP-N-acetylglukozaminy (UDP-GlcNAc). Drugi etap ma miejsce w błonie komórkowej i prowadzi do połączenia MurNAc-pentapeptydu z pirofosforylo-undekaprenolem (lipid I) oraz przyłączeniu do tego kompleksu GlcNAc (lipid II). Ostatni, trzeci etap procesu biosyntezy peptydoglikanu zachodzi po zewnętrznej stronie błony komórkowej, przy współdziałaniu enzymów z rodziny białek wiążących penicylinę PBP (penicillin binding protein). W tym etapie syntezy peptydoglikanu u *S. aureus* szczególnie ważną rolę odgrywa enzym PBP2, który przeprowadza reakcję zarówno transglikozytacji, jak i wraz z około 40 innymi enzymami uczestniczy w transpeptydacji L-Lys-(Gly)<sub>5</sub>-D-Ala, prowadząc do powstania usieciowanej, trójwymiarowej struktury heteropolimeru ściany komórkowej [56, 79].

Cząsteczka wankomycyny, aby spełnić swoją bakteriobójczą funkcję, musi przeniknąć przez wszystkie warstwy peptydoglikanu i dotrzeć do miejsca, gdzie zachodzi drugi i trzeci etap syntezy muropeptydu, czyli do zewnętrznej powierzchni błony komórkowej. W tym miejscu przyłącza się do dipeptydu D-Ala-D-Ala, znajdującego się na końcu pentapeptydu, w uwalnianej z lipidu II reszty heterodimeru -(GlcNAc-β-(1,4)-MurNAc-pentapeptydu)-. Antybiotyk posiada w swojej strukturze przestrzennej „kieszonkę” która idealnie pasuje do struktury przestrzennej D-Ala-D-Ala (zasada „zamka i klucza”). Poza tym cząsteczka wankomycyny może utworzyć pięć, niekwalencyjnych wiązań wodorowych z dipeptydem, co dodatkowo stabilizuje powstający kompleks. Ponieważ cząsteczka antybiotyku jest dość duża, po związaniu heterodimeru, uniemożliwia włączenie go do już istniejącej sieci peptydoglikanu, czyli blokuje reakcję transglikozytacji, jedną z ostatnich, ale kluczowych reakcji podczas biosyntezy ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich [7].

W stężeniach, jakie są możliwe do osiągnięcia w organizmie ludzkim, zakres aktywności przeciwbakteryjnej wankomycyny obejmuje większość tlenowych oraz bez-

względnie beztlenowych drobnoustrojów Gram-dodatnich [58, 62, 66].

Wankomycyna, przez wiele lat nie stanowiła leku pierwszego rzutu w terapiach zakażeń bakteriami Gram-dodatnimi, głównie ze względu na niską jakość ówczesnych preparatów (pierwsze preparaty wankomycyny, często nazywano błotem Mississippi, *Mississippi mud*) oraz niepożądane efekty nefro- oto- oraz hepato-toksyczne [68]. Zainteresowanie glikopeptydami wzrosło dopiero na przełomie lat 70–80 XX w., na skutek ogromnego rozprzestrzeniania się szczepów MRSA [67]. W tym czasie preparaty glikopeptydów zostały też znacznie udoskonalone. Dopiero po 30 latach od wprowadzenia wankomycyny, pojawiła się pierwsza nabyta oporność u bakterii z rodzaju *Enterococcus*. Oczekiwano, że podobnie jak w przypadku innych genów oporności, geny oporności na glikopeptydy z enterokoków zostaną w krótkim czasie przekazane do gronkowców. Jednak, mimo obserwowanych czasem niepowodzeń terapii zakażeń gronkowcowych, przy użyciu wankomycyny, przekazanie genów oporności na ten antybiotyk do *S. aureus*, w warunkach pozalaboratoryjnych zaobserwowano dopiero po około 15 latach.

Oprócz wankomycyny szerokie zastosowanie w leczeniu, na terenie całej Europy (w tym również w Polsce) znalazł półsyntetyczny glikopeptyd, teikoplanina. Antybiotyk wprowadzony w latach 90-tych XX w., charakteryzujący się podobnym spektrum przeciwbakteryjnym do wankomycyny, ale lepszymi właściwościami farmakokinetycznymi [9, 72]. Teikoplanina, w porównaniu do wankomycyny ma dłuższy okres biologicznego półtrwania w surowicy, dzięki czemu może być podawana co 24 godziny. Wykazuje nieco wyższą aktywność przeciwbakteryjną wobec drobnoustrojów Gram-dodatnich, przez co może być stosowana w niższych stężeniach. W terapii skojarzonej z antybiotykiem aminoglikozydowym wykazuje wyższą aktywność bakterioobójczą wobec *Enterococcus* spp. niż wankomycyna i ampicylina. Ponadto teikoplanina wywołuje znacznie mniej efektów ubocznych (odnotowano tylko nieliczne przypadki ototoksyczności). Jednak niektóre szczepy *S. haemolyticus* i *S. epidermidis* wykazują obniżoną wrażliwość na teikoplaninę w porównaniu do wankomycyny. Poza tym okazało się, że pomimo oznaczonej *in vitro* wrażliwości na teikoplaninę, terapie bakteriemii o etiologii *Staphylococcus* spp. przy zastosowaniu tego antybiotyku kończyły się niepowodzeniem. Dlatego obecnie, ze względu na ryzyko wyselekcjonowania szczepów gronkowców opornych na ten i inne antybiotyki glikopeptydowe, nie zaleca się stosowania teikoplaniny w leczeniu tego typu infekcji [9, 72].

Niedawno zarejestrowana została również inna pochodna wankomycyny, telawancyna. Jest to półsyntetyczny lipoglikopeptyd, w którym, do heptapetydowej części rdzeniowej, został dołączony lipofilny łańcuch

boczny. Dzięki tej modyfikacji telawancyna wykazuje znacznie dłuższy, w porównaniu do wankomycyny, okres połowicznego rozpadu (może być podawana co 24 godziny). Ponadto łańcuch boczny ułatwia zakotwiczenie antybiotyku w strukturach osłon komórkowych, wpływa na integralność oraz przepuszczalność błony komórkowej, a tym samym zwiększa aktywność przeciwbakteryjną tego lipoglikopeptydu. Telawancyna jest antybiotykiem zalecanym do leczenia skomplikowanych zakażeń w obrębie skóry i tkanek podskórnych, wywoływanych przez drobnoustroje Gram-dodatnie, w tym również szczepy MSSA, MRSA oraz VISA i hetero-VISA (wartości MIC od 0,03 do 1 mg/L), jednak nie wykazuje aktywności wobec *vanA*-pozytywnych izolatów VRE oraz VRSA (MIC od 1 do 4 mg/L) [40, 86].

Ciągle w fazie testów klinicznych znajdują się inne pochodne wankomycyny takie jak dalbawancyna oraz oritawancyna, których jedna lub dwie dawki są wystarczające do przeprowadzenia całego procesu terapeutycznego. Jednak dalbawancyna, podobnie jak telawancyna, nie stanowi induktora ekspresji operonu *vanA* zarówno u wankomycyno-opornych szczepów enterokoków, jak i *vanA*-pozytywnych *S. aureus* [40, 62, 64, 86].

## 2.2. Kryteria wrażliwości na glikopeptydy

Wielokrotnie dokumentowane przypadki niepowodzeń terapii wankomycyną zakażeń MRSA, mimo wrażliwości szczepu oznaczonej *in vitro*, poza poszukiwaniem przyczyny tego zjawiska, skłoniły mikrobiologów i lekarzy do zastanowienia się, czy dotychczasowe wartości MIC glikopeptydów, przyjmowane jako punkty odcięcia między szczepami wrażliwymi, a opornymi nie są zbyt wysokie. Pojawiło się wiele prac, w których udokumentowano, że znacznie więcej niepowodzeń występuje w przypadkach, kiedy wartości MIC wankomycyny są większe od 2 mg/L [21, 36, 68]. Dlatego w kwietniu 2010 r. EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) wprowadził nowe kryteria oporności *S. aureus* na wankomycynę (MIC  $\geq$  4 mg/L), obowiązujące w Polsce od 01.01.2011 r., które zostały przedstawione w Tabeli I [26–29]. W Tabeli I przedstawiono również wytyczne CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute), obowiązujące w Polsce do końca 2010 r. [17–20].

## 3. Nabyta oporność na wankomycynę

### 3.1. Enterokoki VRE

W 1988 roku został wyizolowany pierwszy szczep *Enterococcus faecium* wykazujący oporność na wysokie stężenia wankomycyny oraz teikoplaniny (VRE/GRE, vancomycin/glycopeptide resistant *Enterococcus*) [92].

Tabela I  
Kryteria oporności na wankomycynę i teikoplaninę, według rekomendacji CLSI oraz EUCAST, w latach 2002–2013

Rok	CLSI						EUCAST					
	MIC wankomycyny (mg/L)			MIC teikoplaniny (mg/L)			MIC wankomycyny (mg/L)			MIC teikoplaniny (mg/L)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
2002–2005	≤4	8–16	≥32	≤8	16	≥32	–	–	–	–	–	–
2006–2008	≤2	4–8	≥16	≤8	16	≥32	≤4*	8*	≥16*	≤4*	8*	≥16*
2009	≤2	4–8	≥16	≤8	16	≥32	≤4* ≤1**	8* 2**	≥16* ≥4**	≤4* ≤1**	8* 2**	≥16* ≥4**
2010	≤2	4–8	≥16	≤8	16	≥32	≤1 ≤2***	2 –***	≥4 ≥4***	≤1 ≤2***	2 –***	≥4 ≥4***
2011	–	–	–	–	–	–	≤2	–	≥4	≤2	–	≥4
2012–2013	–	–	–	–	–	–	≤2	–	≥4	≤2	–	≥4

\* od 20–06–2006 do 21–12–2009

\*\* od 22–12–2009

\*\*\* od 04–2010

Jak wykazano, oporność enterokoków na glikopeptydy jest warunkowana obecnością operonu *van*. Od pojawienia się pod koniec lat '80 XX w. pierwszych izolatów klinicznych enterokoków opornych na glikopeptydy, do chwili obecnej, zidentyfikowano dziewięć fenotypów oporności na glikopeptydy: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM oraz VanN, różniących się między sobą pochodzeniem, fenotypowym wyrażeniem cechy (D-Ala-D-Lac u szczepów o fenotypie VanA, B, D i M; D-Ala-D-Ser u wariantów VanC, E, G, L i N), lokalizacją w genomie bakteryjnym, zdolnością do koniugacyjnego przekazywania, rozpowszechnieniem wśród enterokoków i innych rodzajów drobnoustrojów oraz sposobem regulacji ekspresji genów wchodzących w skład operonu [42, 52, 53, 65, 90, 99]. Operon *vanA* zostanie dokładniej scharakteryzowany w dalszej części niniejszej pracy.

Obecnie zakażenia wywoływane przez VRE dotyczą niemal wszystkich krajów zurbanizowanych oraz rozwijających się na świecie. W epidemiologii zakażeń VRE największą rolę odgrywają dwa gatunki, tj. *E. faecium* i znacznie rzadziej *E. faecalis*. Łatwość rozprzestrzeniania się tych szczepów w środowiskach szpitalnych wynika z nakładania się dwóch zjawisk: i) przekazywania genów oporności na drodze różnych mechanizmów horyzontalnego transferu (przede wszystkim koniugacji) oraz ii) tzw. „szerzenia klonalnego”, czyli powstawania i rozprzestrzeniania się szczepów blisko spokrewnionych ze sobą. Udział VRE w międzygatunkowej (w obrębie rodzaju *Enterococcus*), a nawet międzyrodzajowej (*Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria*) wymianie materiału genetycznego *in vivo* oraz *in vitro* posiada szeroką dokumentację [8, 63–65, 70]. Uznaje się, że znany już od początku lat '90-tych XX w., typ epidemiczny *E. faecium* CC17, na przestrzeni lat także powiększył rozmiar genomu o około 150 kbp (geny *esp*) [51]. Potwierdza to zdolność tych drobnoustrojów

zarówno do pobierania, jak i przekazywania elementów genetycznych innym bakteriom.

### 3.2. Transfer operonu *vanA* ze szczepów *Enterococcus* spp. do izolatów metycyliny-opornych *Staphylococcus aureus* – możliwości i obawy

Od pojawienia się oporności na wankomycynę u enterokoków, prowadzono badania nad możliwością przeniesienia genów oporności z VRE do *S. aureus* [63, 70]. Próby przekazania drogą koniugacji plazmidu zawierającego transpozon Tn1546 (operon *vanA*) w warunkach laboratoryjnych, zakończyły się powodzeniem jedynie w pracach W.C. Noble z 1992 roku [70]. Transkoniuganty otrzymywane w późniejszych latach, przez innych badaczy najczęściej nie wyrażały fenotypu VanA, a przynajmniej nie na takim poziomie jak enterokoki lub wykazywały wysoką niestabilność cechy [63]. Wydawało się zatem, że możliwość transferu genów *vanA* z VRE do MRSA jest bardzo mało prawdopodobna. Jednakże drobnoustroje same zweryfikowały te wątpliwości, ponieważ w 2002 roku w Michigan, USA, wyizolowano pierwszy, naturalnego pochodzenia szczep *S. aureus*, wykazujący fenotyp o wysokiej oporności na wankomycynę (VRSA, vancomycin resistant *S. aureus*) [14, 96]. Analizy genetyczne potwierdziły obecność u tego izolatu operonu *vanA*, a wartości MIC wankomycyny dla szczepu wynosiły 1024 mg/L, a teikoplaniny 32 mg/L [14].

Z badań przeprowadzonych w 2006 roku przez Waldron oraz Lindsay wynika [95], że aby doszło do przeniesienia oraz ekspresji genów oporności na glikopeptydy z enterokoków do *S. aureus* szczep biorcy musi być mutantem defektywnym w systemie restrykcji i modyfikacji R-M typu I [95]. Jednym z genów kodujących systemy R-M u *S. aureus* jest *hsdR*. Jednak badania przeprowadzone w 2009 roku na trzech szczepach gron-



kowca złocistego, pozbawionych genu *hsdR* wykazały, że mutacja w *hsdR*, kodującego endonukleazę SauI, nie jest wystarczająca, aby w szczepie *S. aureus* uległy ekspresji geny kodowane przez DNA pochodzące z innego rodzaju bakterii [93]. Być może odpowiedzialne są za to jeszcze inne, do tej pory niezidentyfikowane modyfikacje genomu np. mutacje w genie metylazy systemu modyfikacji typu I.

Z kolei badania przeprowadzone z udziałem klinicznych izolatów VRSA [80, 96] wykazują, że warunkiem przeniesienia i ekspresji genów *vanA* do szczepów *S. aureus* jest sekwencja dwóch następujących po sobie genetycznych zdarzeń: koniugacyjnego transferu z udziałem plazmidu należącego do rodziny Inc18, a następnie wycięcia, przeniesienia i wbudowania, czyli translokacji transpozonu Tn1546 do chromosomu komórki biorcy. Potwierdzają to wyniki najnowszych badań, uzyskane przez dwie niezależne grupy badawcze, które donoszą o skutecznym HGT (horizontal gene transfer) operonu *vanA* z wankomycyno-opornych szczepów *Enterococcus* sp. do kompetentnych komórek MRSA, w warunkach *in vitro* [24, 100].

### 3.3. Wankomycyno-oporne szczepy *Staphylococcus aureus* (VRSA)

Szczepy *S. aureus* odporne na glikopeptydy (VRSA, GRSA), można zaliczyć do dwóch grup: posiadających operon *vanA* oraz *vanA*-negatywnych. Ponadto, poniżej zostaną omówione warianty, co prawda wrażliwe na glikopeptydy, ale wytwarzające subpopulacje komórek o obniżonej wrażliwości lub opornych, tzw. szczepy h-VISA.

#### 3.3.1. Mechanizm oporności u VRSA warunkowany obecnością operonu *vanA*

Począwszy od 2002 roku, kiedy w Michigan, został wyizolowany pierwszy szczep *Staphylococcus aureus* wykazujący wysoki poziom oporności na antybiotyki glikopeptydowe, do chwili obecnej, na całym świecie zostało opisanych 13 potwierdzonych przypadków zakażeń u ludzi o etiologii VRSA (wg kryteriów CLSI). U każdego z tych izolatów oporność na wankomycynę warunkowana była obecnością genów operonu *vanA*, pochodzących od *Enterococcus* spp. [11–13, 31, 61, 74, 75, 85, 86].

System *vanA* u enterokoków zlokalizowany jest na transpozonie Tn1546, o wielkości 10,851 kbp, zaliczanym do rodziny transpozonów podobnych do Tn3. Tn1546 może być wbudowany zarówno do chromosomu, jak i do dużego plazmidu koniugacyjnego. Jest on ruchomym, podlegającym replikatywnej transpozycji elementem genetycznym, oflankowanym 36- do 38-nukleotydowymi niedoskonałymi, odwróconymi sekwencjami powtórzonymi (inverted repeats, IR).

Zawiera siedem genów: *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanR*, *vanS*, *vanY* i *vanZ*, podlegających transkrypcji ze wspólnego promotora i podlegających wspólnej regulacji oraz dwie otwarte ramki odczytu ORF1 i ORF2, ulegające transkrypcji w dwóch przeciwnych kierunkach. Kodują one, odpowiednio: gen transpozazy (*tnp*) oraz gen resolwazy (*res*) [5, 35].

Do wyrażenia fenotypu oporności na wankomycynę typu VanA niezbędne są geny: *vanH*, *vanA* oraz *vanX*. Produkt VanH, jest 322-aminokwasowym białkiem, pełniącym funkcję dehydrogenazy kwasów 2-hydroksy (alfa-keto-) karboksylowych. Przeprowadza ono redukcję kwasu pirogronowego, prowadząc do powstania D-mleczanu (D-Lac). Jest to enzym wysoce specyficzny, wykazuje aktywność jedynie wobec kwasów będących izomerami optycznymi typu D [5, 6, 10]. Białko VanX, posiada aktywność D,D-dipeptydazy i katalizuje reakcję hydrolizy wiązania peptydowego pomiędzy dwoma resztami D-Ala w pentapeptydzie. W ten sposób na końcu łańcucha tetrapeptydu pozostaje reszta D-Ala z wolną grupą karboksylową [76].

Produkty reakcji dehydrogenacji pirogronianu oraz hydrolizy wiązania peptydowego w D-Ala-D-Ala, czyli D-mleczan i reszta D-Ala<sub>4</sub> tetrapeptydu prekursora peptydoglikanu, stanowią substraty dla ligazy VanA. VanA, w przeciwieństwie do ligazy D-Ala-D-Ala, jest enzymem, który wykazuje wysoką specyficzność substratową do D-Lac [10, 53, 62]. Dzięki aktywności enzymów VanH, VanA i VanX powstaje prekursor mureiny, który na końcu łańcucha bocznego zawiera D-Ala-D-Lac. Częsteczką depsipeptydu posiada inną strukturę przestrzenną niż D-Ala-D-Ala, która nie pasuje do kieszonki w cząsteczce wankomycyny (wytwarza się jedno wiązanie wodorowe mniej), co skutkuje znacznie niższym (ok. 1000x) powinowactwem antybiotyku do D-Ala-D-Lac. Wankomycyna nie wiąże się z prekursorem peptydoglikanu i tym samym nie może spełnić swojej funkcji. Reakcje transglikozylacji oraz transpeptydyzacji, czyli ostatnie etapy syntezy ściany komórkowej mogą zachodzić bez zakłóceń, a komórka mikroorganizmu wykazuje fenotyp oporności na antybiotyk glikopeptydowy [53, 62, 77].

Pozostałe dwa geny ulegające transkrypcji z promotora P<sub>H</sub>: *vanY* i *vanZ* pełnią mniej istotną rolę w wyrażeniu fenotypu oporności na glikopeptydy typu VanA. VanY jest białkiem o masie cząst. 38,4 kDa, wykazuje aktywność D,D-karboksypeptydazy o szerokim spektrum substratowym, która odcina reszty D-alaniny od każdego białka lub peptydu, które posiada ten aminokwas na końcu cząsteczki, w tym również od pentapeptydu. W ten sposób, zmniejszając liczbę cząsteczek stanowiących docelowe miejsce wiązania wankomycyny, pełnią funkcję wspomagającą do wyrażenia fenotypu oporności [4, 98]. Z kolei białko VanZ najprawdopodobniej odgrywa rolę w wyrażeniu oporności na niskim

poziomie na teikoplaninę, szczególnie w sytuacji braku genów odpowiedzialnych za syntezę depsipeptydu [3].

Geny operonu *vanA* u *S. aureus*, podobnie jak u *Enterococcus* spp. podlegają regulacji, a wyrażany fenotyp VanA oporności na glikopeptydy jest systemem indukcyjnym. Induktorami mogą być zarówno glikopeptydy, jak również czynniki nieglikopeptydowe – bacytracyna, polimyksyna B i robenidyna, stosowane w medycynie, ale również np. w leczeniu chorób infekcyjnych u drobiu [53, 62, 92]. W mechanizmie regulacji uczestniczą dwa, podlegające transkrypcji z własnego promotora P<sub>R</sub>, geny: *vanR* i *vanS*. Białko VanS pełni funkcję sensora, zlokalizowanego w błonie komórkowej bakterii i wykazuje aktywność kinazy histydynowej. Aktywacja sensora następuje w obecności ligandu [62]. Cząsteczki aktywnego sensora dokonują reakcji fosforylacji substratowej drugiego białka, VanR (response regulator), które pełni funkcję pozytywnego czynnika transkrypcyjnego operonu *vanA*. Zatem w obecności ligandu, VanS pełni funkcję aktywatora dla VanR i dochodzi do wyrażenia fenotypu oporności, natomiast w sytuacji nieobecności wankomycyny białko sensora pozostaje nieaktywne, białko odpowiedzi znajduje się w stanie defosforylacji, a geny *vanA* nie ulegają ekspresji [2, 39].

### 3.3.1.1. Heterologiczna ekspresja operonu *vanA* u wankomycyno-opornych *S. aureus*

Fenotyp VanA charakteryzuje się opornością zarówno na wankomycynę, jak i na teikoplaninę. Analiza wartości MIC wankomycyny izolatów VRSA wykazała, że choć wszystkie przekraczają wartość graniczną, co pozwala je uznać za odporne (przy zastosowaniu zarówno starych, jak i obecnie obowiązujących kryteriów, zarówno CLSI, jak i EUCAST (Tabela I), to jednak są one dla poszczególnych szczepów bardzo zróżnicowane i znajdują się w granicach między 32 a 1024 mg/L. Z kolei wartości MIC teikoplaniny izolatów VRSA zawierają się w przedziale między 8 a 32 mg/L, co również pozwala je wszystkie zaklasyfikować jako odporne, ale jedynie zgodnie z obecnie obowiązującymi kryteriami EUCAST [26, 48]. Natomiast gdyby zastosować normy oporności wg CLSI z 2009 roku to część szczepów byłoby klasyfikowanych jako wrażliwe, część jako średniowrażliwe, a niektóre jako odporne na teikoplaninę. Zróżnicowany poziom ekspresji genotypu *vanA* oraz brak ujednoczonego systemu kryteriów stwarza liczne problemy z prawidłową i konsekwentną interpretacją wyników oznaczenia wartości MIC.

Istotne stało się zbadanie przyczyn oraz mechanizmu heterologicznej ekspresji operonu *vanA* u różnych szczepów *S. aureus*. W tym celu przeprowadzono analizę porównawczą genomu pierwszego izolatu VRSA-M, wykazującego wysoki poziom oporności na obydwie glikopeptydy ze szczepem, pochodzącym z tego samego roku VRSA-P, wykazującego znacznie niższe wartości

MIC glikopeptydów [11, 13, 16]. Wykazano, że szczep VRSA-M posiada transpozon Tn1546, o wielkości 10,851 kbp w dzikiej, niezmienionej formie. Natomiast transpozon izolatu VRSA-P znacznie różni się od dzikiej wersji Tn1546. Zidentyfikowano w nim dużą delecję pomiędzy pierwszym a 3098 nukleotydem na 5'-końcu transpozonu, obejmującą sekwencję kodującą genu transpozazy *tnp*; ponadto, powyżej nukleotydu 3099 zlokalizowano 809-nukleotydową insercję, podobną do IS1216 oraz w regionie intergenicznym genów *vanS* i *vanH* odnaleziono odwróconą, 1499-nukleotydową sekwencję podobną do IS1251 [16]. Tak duże modyfikacje elementu genetycznego Tn1546 w VRSA-P mogą tłumaczyć odmienną ekspresję genów oporności.

Podobne obserwacje heterologicznej ekspresji genów warunkujących oporność na wankomycynę typu VanA, poczyniono również dla wankomycyno-opornych enterokoków już w latach '90 [32, 45, 46]. Wykazano, że w procesie horyzontalnego transferu genów transpozon Tn1546, który w szczepie dawcy występował w obrębie 40 kbp fragmentu DNA, w szczepie biorcy występował na odcinkach znacznie większych, od 150 do 450 kbp [35] lub mniejszych o około 2 kbp [87]. Dokładniejsza analiza wykazała że postkoniugacyjne modyfikacje mogą polegać na wstawieniu sekwencji podobnej do IS16 w obrębie genu *vanY*, co powoduje obniżenie wartości MIC teikoplaniny [69]. Inne zmiany, które zidentyfikowano u VRE mogą polegać na wstawianiu sekwencji insercyjnych podobnych do IS1216, IS1251 lub ISEfa4 w różnych miejscach Tn1546, tj.: powyżej ORF1; w regionie międzygenowym ORF2 – *vanR*, *vanS* – *vanH*, *vanX* – *vanY*, czy w obrębie sekwencji kodującej *vanY*. W szczepach *Enterococcus* spp. wankomycyno-opornych i wykazujących wrażliwość na teikoplaninę, o genotypie *vanA*, znaleziono również liczne delecje fragmentów lub całych genów: *tnp*, *res*, *vanR*, *vanS*, *vanY*, *vanZ* oraz mutacje punktowe, typu zmiany sensu, w genach *vanR*, *vanS*, *vanA*, *vanH*, *vanY*, *vanZ* [32, 46, 87]. Wydaje się zatem, że liczne zmiany mutacyjne w obrębie sekwencji Tn1546, tj.: insercje, delecje, mutacje punktowe zarówno wśród szczepów wankomycyno-opornych enterokoków, jak i gronkowców, mogą powodować brak możliwości wyrażenia prawidłowego fenotypu VanA i tym samym heterologiczną ekspresję genów *vanA*, specyficzną nawet dla poszczególnych izolatów.

### 3.3.1.2. Wankomycyno-oporne *S. aureus* – analiza przypadków

Na całym świecie, do tej pory odnotowano 13 przypadków izolacji szczepów VRSA. Jedenaście miało miejsce w Stanach Zjednoczonych, z czego osiem w Michigan, jeden w Pensylwanii, jeden w Nowym Yorku i jeden w Delaware [31, 74, 85, 86]. Ponadto odnotowano również trzy przypadki izolacji wankomycyno-opornych

*S. aureus* w Indiach [78, 91] oraz dwa w Iranie [1], tych ostatnich jednak nie uznano ich za odpowiednio udokumentowane. Jedynymi wiarygodnymi doniesieniami spoza Ameryki są najnowsze prace Mirani i Jamil z 2013 roku, Pakistan [61] oraz Dezfulian i wsp. z 2012 roku, Iran [25].

### 3.3.1.3. Epidemiologia szczepów VRSA *vanA*

Choć od momentu, kiedy wyizolowano pierwsze kliniczne warianty VRSA *vanA*, minęła już ponad dekada, dotychczas w literaturze zostało odnotowanych jedynie 13 przypadków. Wydaje się zatem, że zdarzenia genetyczne, które muszą zajść, aby doszło do przekazania operonu *vanA* i wyrażenia cechy wankomycyno-oporności zachodzą z niezwykle niską częstością [24, 100]. Dlatego też ryzyko globalnego rozprzestrzenienia szczepów *S. aureus* niosących geny *vanA* jest stosunkowo niewielkie. Ponadto, dodatkowym czynnikiem ograniczającym rozwój globalnej epidemii jest fakt, iż niektóre z izolatów VRSA posiadają mutację w genie *ddl*, kodującym ligazę D-Ala-D-Ala [55, 59]. Efektem fenotypowym takiej modyfikacji genetycznej jest uzależnienie wzrostu i przeżycia szczepu bakteryjnego od obecności wankomycyny. W normalnych warunkach mutacje te są letalne, z powodu braku możliwości przeprowadzenia wszystkich etapów biosyntezy ściany komórkowej. Dla wariantów *vanA*-pozytywnych jedyną możliwością przeżycia jest wykorzystanie do tych procesów ligazy D-Ala-D-Lac, która wykazuje bardzo wysoką specyficzność substratową. Zatem w komórkach musi zachodzić ekspresja operonu *vanA*, tak aby powstał i enzym, i substrat dla enzymu. Dzięki temu możliwe jest przeprowadzenie alternatywnego szlaku biosyntezy ściany komórkowej mutantu. A ponieważ *vanA* jest systemem indukcyjnym, zależnym od wankomycyny, presja antybiotyku jest warunkiem przeżycia szczepu [55, 59]. Spełnienie tego kryterium jest możliwe jedynie w warunkach szpitalnych, ponieważ glikopeptydy w działaniu ogólnoustrojowym mogą być podawane jedynie poprzez iniekcję dożylną. Niewątpliwie jest to ważny czynnik ograniczający rozprzestrzenianie się klinicznych izolatów VRSA w warunkach ambulatoryjnych oraz przy udziale pacjentów nie leczonych wankomycyną.

### 3.3.2. Szczepy VRSA – *vanA*-negatywne (dawne *Staphylococcus aureus* o obniżonej wrażliwości na wankomycynę, VISA) – pochodzenie oraz mechanizm oporności

Pierwszy szczep *S. aureus* wykazujący mechanizm obniżonej wrażliwości na wankomycynę (Mu50) został zidentyfikowany w maju 1996 roku, w jednym z japońskich szpitali klinicznych [37]. Izolat pochodził od czteromiesięcznego niemowlaka płci męskiej, operowanego z powodu atrezji tętnicy płucnej. W dwa tygodnie po

zabiegu dziecko doznało zakażenia miejsca operowanego. Ponieważ wyizolowany szczep był oporny na wszystkie antybiotyki beta-laktamowe, w terapii pierwszego rzutu zastosowano wankomycynę [45 mg/kg/dobę] jednakże, pomimo długiego, 29-dniowego stosowania, leczenie okazało się nieskuteczne. W terapii drugiego rzutu przez 12 dni podawano nadal wankomycynę, ale w skojarzeniu z antybiotykiem aminoglikozydowym – arbekacyną i choć początkowo poziom reaktywnego białka C (CRP, C-reactive protein) obniżył się do granicy normy, 12 dni po zakończeniu leczenia u niemowlaka rozwinął się ropień podskórny, również o etiologii *S. aureus*. Kolejna sześć-dniowa terapia (arbekacyna plus ampicylina/sulbaktam) wydawała się być skuteczna, jednak po odstawieniu leków poziom białka CRP był podwyższony i zmienny, co świadczyło, iż infekcja miała charakter przewlekły. Dopiero przedłużenie dawkowania arbekacyny z ampicyliną i sulbaktamem przez kolejne 17 dni przyniosło oczekiwany efekt terapeutyczny [37]. Wyizolowany od małego pacjenta szczep MRSA, nazwany Mu50 (ATCC 700699) został poddany dokładnej analizie. Okazało się, że wykazywał wiele cech nietypowych, ponieważ pomimo, że nie zawierał genów *vanA* ani *vanB*, MIC wankomycyny dla tego izolatu wynosiło 8 mg/L, co w zależności od stosowanego kryterium, świadczyło o oporności lub średniej wrażliwości szczepu. Według ówczesnych kryteriów, stosowanych przez British Society for Antimicrobial Therapy, Mu50 był oporny na wankomycynę (VRSA, MIC  $\geq$  8 mg/L), natomiast według amerykańskiego kryterium NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, obecnie CLSI) – średniowrażliwy (VISA, MIC = 8–16 mg/L) [37]. Według obecnie stosowanych w Polsce rekomendacji EUCAST, w których od kwietnia 2010 r. granica wrażliwości na wankomycynę dla *S. aureus* została obniżona do  $\leq$  2 mg/L, szczep Mu50 jest wariantem VRSA. W rekomendacjach EUCAST szczepy średniowrażliwe (VISA), w ogóle nie występują [26, 48]. Natomiast zgodnie z rekomendacjami CLSI, szczepy dla których wartości MIC wankomycyny znajdują się w przedziale 4–8 mg/L, nadal są szczepami VISA (Tabela I).

Pierwsze badania szczepu Mu50 wykazały, że posiada on dwukrotnie grubszą ścianę komórkową (około 40 warstw peptydoglikanu) niż typowe, wrażliwe szczepy *S. aureus*. Produkuje też trzykrotnie więcej białek PBP2 i PBP2' oraz syntetyzuje trzykrotnie więcej prekursorów mureiny [37]. Wielu badaczy podjęło próby wyjaśnienia mechanizmu obniżonej wrażliwości na glikopeptydy u tych szczepów, jak również próby doszukania się pewnych korelacji pomiędzy nietypowymi właściwościami ściany komórkowej, a wyrażaniem się fenotypu VISA, zarówno u Mu50, jak również późniejszych izolatów.

Wzrost grubości ściany komórkowej wydawał się odgrywać kluczową rolę w obniżeniu wrażliwości szczepów na glikopeptydy [33, 83]. Zakładano, że jest



to wypadkowa kilku innych procesów, które zachodziły w komórce, tj.: wzrostu syntezy bifunkcyjnego enzymu transglikozylazy i transpeptydazy (3–5 razy); nawet 20-krotnego wzrostu wewnątrzkomórkowej produkcji N-acetylo-glukozaminy oraz syntezy i akumulacji prekursorów peptydoglikanu, czyli lipidu I oraz lipidu II w błonie cytoplazmatycznej (3–8 razy) [33] i tym samym przyspieszenia metabolizmu ściany komórkowej zarówno na etapie wbudowywania, jak i uwalniania jej składników [83]. PBP2 oraz, warunkowane obecnością genu *mecA*, PBP2' (PBP2a), rzeczywiście mogą wpływać na efektywność włączania nowych heteromerów do już istniejącej sieci peptydoglikanu, jak również na wydajność wytwarzania wiązań poprzecznych w mureinie. Jednak dalsze badania dowiodły, że nie ma to wpływu na zwiększenie oporności szczepów *S. aureus* na antybiotyki glikopeptydowe, a jedynie na beta-laktamy [22, 33]. Nie stwierdzono również oporności krzyżowej bakterii na te dwie grupy chemioterapeutyków [22].

Z kolei istotne wydają się być te zmiany, które związane są z wcześniejszymi etapami biosyntezy ściany komórkowej. Analiza sekwencji genomu oraz porównanie 362 otwartych ramek odczytu ORF (open reading frame) pomiędzy Mu50 a wzorcowym szczepem MRSA, wrażliwym na wankomycynę N315, wykazało aż 213 różnic na poziomie DNA, z czego 174 (6,6% ze wszystkich 2699 genów szczepu Mu50) dawało efekt zmiany sensu na poziomie produktu genu [49, 71]. Zmiany te dotyczyły przede wszystkim trzech grup genów: i) związanych z transportem komórkowym (14,9% ze 174 istotnie różniących się); ii) związanych z metabolizmem węglowodanów (5,7%); iii) uczestniczących w syntezie RNA oraz mechanizmach regulacyjnych (8,0%) [49, 71]. Uzyskane wyniki wydają się potwierdzać oraz wyjaśniać niektóre wcześniejsze hipotezy, ponieważ węglowodany, takie jak glukoza czy glukozamina mogą w komórce bakteryjnej być wykorzystywane jako źródło węgla w procesach biosyntezy peptydoglikanu ściany komórkowej [21, 23]. Związki te mogą ulegać włączeniu w cykl przemian metabolicznych za pośrednictwem systemu fosfotransferaz PTS (phosphotransferase system), który podczas procesów transportu komórkowego przeprowadza reakcje fosforylacji substratowej cukrów. W ten sposób np. przy udziale aminotransferazy 6-fosfo-glukoamino-fruktozy, może być syntetyzowana 6-fosfoglukozamina (GlcN-6-P), która stanowi substrat do produkcji jednego z cytoplazmatycznych prekursorów mureiny. Inne białka transporterów odgrywające rolę w produkcji ściany komórkowej, to związki zaliczane do podrodziny transporterów w systemie typu ABC (ATP-binding cassette transporter), takie jak transporter fosfoheksozowy (kodowany przez gen *uhpT*), transporter fosfoglicerolowy (*glpT*) czy transporter specyficzny dla laktozy (*lacE*). Ponadto wykazano, że różnice genetyczne między szczepem Mu50, a N315, wrażliwym na wanko-

mycynę, dotyczą również trzech genów: *acsA*, syntetazy acetylo-koenzymu A; *pykA*, kinazy pirogronianowej oraz *lctE*, dehydrogenazy L-mleczanowej, związanych z cyklem przemian kwasów trójkarboksylowych (TCA, tricarboxylic acid cycle), prowadzących do powstania pirogronianu. Pirogronian z kolei uczestniczy w syntezie glutaminianu, będącego składnikiem w GlcNAc- $\beta$ -(1,4)-MurNAc-pentapeptydzie. Znalezione również zmiany w 17 genach odgrywających rolę w procesach regulacyjnych, z których pięć jest zaliczanych do tzw. dwuskładnikowych systemów regulatorowych TCSTS (two components signal transduction system). Polegały one na substytucji pojedynczego nukleotydu [44, 49, 71].

Wzmógłony transport oraz synteza prekursorów peptydoglikanu mogą w efekcie powodować powstawanie ściany komórkowej o nietypowej budowie oraz grubości. Ponadto wykazano, że w pentapeptydzie mureiny szczepu Mu50 znajduje się więcej cząsteczek glutaminianu pozbawionego reszty aminowej [34]. Początkowo przypuszczano, że przyczyną może być mutacja lub obniżenie ekspresji genu *glnA*, kodującego syntetazę glutaminy, która w procesie biosyntezy ściany komórkowej jest dawcą grupy aminowej dla prekursorów heterodimeru [34]. Okazało się, że glutamina faktycznie odgrywa kluczową rolę w powstawaniu prawidłowej cząsteczki aminokwasu, ale w jej niedoborze znaczenie odgrywa inne podłoże molekularne. Podwyższenie poziomu syntezy lipidu I oraz lipidu II powoduje spadek poziomu wewnątrzkomórkowej glukozy, która stanowi punkt wyjścia dla licznych przemian metabolicznych, w tym również dla syntezy glutaminy [21, 23]. Ponadto, sekwencjonowanie wybranych genów szczepu Mu50 oraz wrażliwego wariantu *S. aureus* N315, ujawniło substytucję nukleotydu w *nasD*, co spowodowało zastąpienie glicyny Gly<sup>478</sup> przez alaninę w produkcie genu. Powstanie nieaktywnej biologicznie reduktazy azotanu, prowadzi do obniżenia poziomu wewnątrzkomórkowego amoniaku, który stanowi jeden z dawców grupy aminowej dla glutaminy [71].

W komórkach szczepów bakteryjnych wykazujących zmniejszoną wrażliwość na wankomycynę obserwuje się zwiększenie grubości ściany komórkowej, ale zawiera ona w swojej strukturze dużą ilość pentapeptydów z glutaminianem, pozbawionym reszty aminowej na końcu. Uniemożliwia to wytwarzanie przez transpeptydazę PBP wiązania peptydowego pomiędzy L-Lys a grupą karboksylową glicyny w łańcuchu pentaglicynowym, a tym samym mostków poprzecznych pomiędzy resztą L-lizyny jednego pentapeptydu, a resztą D-alaninową innego. W efekcie powstaje peptydoglikan o zmienionym składzie jakościowo-ilościowym, zawierający zwiększoną ilość niezwiązanych dimerów D-alanino-D-alaninowych na końcach pentapeptydów oraz ze zmienioną strukturą przestrzenną, czyli mniej usiecioną [23, 34, 38].



Wzmoczone procesy metaboliczne prowadzą również do uwalniania większej ilości dimerów D-Ala-D-Ala, które nie ulegają wbudowaniu w strukturę peptydoglikanu, lecz znajdują się w przestrzeni trójwymiarowej sieci [83]. Stanowią one dodatkowe punkty uchwytu dla wankomycyny. U drobnoustrojów Gram-dodatnich cząsteczki tego antybiotyku wnikają w strukturę przestrzennej sieci, ale warunkiem zadziałania leku (wywołania efektu bakteriostatycznego lub bakteriobójczego) jest dotarcie do docelowego miejsca, czyli tuż przy błonie komórkowej [7, 23]. Zmniejszone usieciowanie mureiny ułatwia penetrację glikopeptydu, ale po drodze natrafia on na wolne dimery D-Ala-D-Ala, zarówno w oczkach sieci peptydoglikanu, jak i na końcach pentapeptydów, które stanowią swoistą „pułapkę” dla wankomycyny. Zatem może zaistnieć sytuacja w której wszystkie cząsteczki leku ulegną związaniu, a tym samym inaktywacji, zanim dotrą do właściwego miejsca swojego działania, czyli tam gdzie zachodzą reakcje polimeryzacji heterodimerów -(GlcNAc- $\beta$ -(1,4)-MurNAc-pentapeptyd)- [38, 83]. Ponadto penetracja wankomycyny może być dodatkowo utrudniona ze względu na rozbudowaną strukturę przestrzenną cząsteczek antybiotyku. Związane i uwięzione w pierwszych warstwach peptydoglikanu cząsteczki antybiotyku, uniemożliwiają przenikanie kolejnych, aktywnych do głębszych warstw sieci [21]. Badania przeprowadzone przez Cui i wsp. dowodzą, że podczas hodowli szczepów VISA na podłożu z wankomycyną (30 mg/L), stężenie antybiotyku w pożywce zmniejsza się w zależności od czasu inkubacji i jednocześnie zwiększa się wysycenie nim mureiny bakterii. Zmiany strukturalne ściany komórkowej mają jedynie wpływ na szybkość i tym samym wydajność pochłaniania wankomycyny (wprost proporcjonalnie do stopnia uszkodzenia heteropolimeru), jednakże nie decydują o wyniku ilościowym [21].

Przeprowadzone dotychczas badania nie pozostawiają wątpliwości, że pogrubiona ściana komórkowa u szczepów *S. aureus* odgrywa kluczową rolę w wyrażeniu się fenotypu obniżonej wrażliwości na wankomycynę. Okazuje się jednak, że na taki efekt wpływają nie tylko procesy wzmoczonej syntezy i kumulacji prekursorów peptydoglikanu, lecz również obniżonej aktywności autolitycznej.

Reakcje autolityczne u *S. aureus* zachodzą z udziałem około 20 różnych enzymów hydrolitycznych i odgrywają naturalną rolę w procesach fizjologicznych komórki bakteryjnej takich jak: wzrost i podziały komórki; produkcja i utylizacja muropeptydu; liza komórki indukowana inhibitorami syntezy peptydoglikanu; remodeling heteropolimeru związany np. z powstawaniem pili koniugacyjnych. Do najważniejszych hydrolaz zalicza się: amidazę N-acetyl-muramyl-L-alaninową (amidaza N-MurAc-L-Ala), N-acetyl-glukozaaminidazę (N-GlcAc-aminidaza), N-acetyl-muraminidazę (N-MurAc-aminidaza),

endopeptydazy oraz transglikozylazy. Najlepiej poznane autolizyny: amidaza N-MurAc-L-Ala (62 kDa) oraz N-GlcAc-aminidaza (51 kDa) są kodowane przez jeden wspólny gen oraz transkrypt *atl*, którego pierwotny produkt o masie 138 kDa, podczas obróbki posttranslacyjnej ulega cięciu proteolitycznemu na dwa aktywne enzymy o masach cząsteczkowych 62 i 51 kDa. Amidaza N-MurAc-L-Ala uczestniczy w odłączaniu pentapeptydu od łańcucha heteropolimeru, natomiast N-acetyl-glukozaaminidaza ma swoje miejsce rozpoznawalne pomiędzy resztą -(N-GlcAc)- a pierwszym aminokwasem pentapeptydu (L-Ala). Z kolei rodzina białek Lyt pełni funkcje endopeptydaz. Najważniejsza z nich endopeptydaza glicyl-glicynowa, LytM, jest białkiem o masie 32 kDa i uczestniczy w rozcinaniu wiązań poprzecznych (mostki pentaglicynowe) sieci peptydoglikanu [94].

Już pierwsze badania prowadzone na szczepie wzorcowym VISA (Mu50) wskazywały na zaburzenia w recyklingu składników jego ściany komórkowej oraz na wolniejsze uwalnianie hydrolizowanych łańcuchów mureiny [33]. Sieradzki i Tomasz dowodzą, że efekt ten jest związany raczej ze zmodyfikowaną strukturą peptydoglikanu niż z budową lub funkcją samych autolizyn [84]. Zaobserwowano, że jeżeli szczepy *S. aureus* rosną na podłożach zawierających subinhibicyjne stężenia wankomycyny, to komórki bakterii rosną w postaci bezpostaciowych skupisk (gron) i zawierają nierozdzieloną, amorficzną ścianę komórkową [84]. Świadczy to o tym, że w obecności antybiotyku dochodzi do zaburzeń procesów litycznych, przez co, w trakcie podziałów nie mogą powstać prawidłowe komórki potomne. Jednocześnie stwierdzono, że w podłożu, w pobliżu miejsca wzrostu drobnoustrojów, zmniejsza się stężenie wankomycyny, co potwierdza wyniki wcześniejszych badań, iż antybiotyk jest wbudowywany w strukturę peptydoglikanu [21, 23, 84]. A ponieważ cząsteczki wankomycyny są dość duże i posiadają miejsce przyłączania w pobliżu wiązań hydrolizowanych przez amidazy N-MurAc-L-Ala oraz endopeptydazy glicyl-glicynowe, uniemożliwiają dotarcie enzymów hydrolizujących do docelowego miejsca działania, najprawdopodobniej na drodze mechanizmu polegającego na tworzeniu fizycznej bariery.

Mechanizm zmniejszonej wrażliwości na wankomycynę izolatów *S. aureus*, częściowo wyjaśnia również fakt obniżenia aktywności białka wiążącego penicylinę PBP4 [30, 82, 83]. Jest to jeden z enzymów, należących do niskocząsteczkowych białek PBP (LMW), w obrębie rodziny transferaz acylo-serynowych, uczestniczących w procesach polimeryzacji oraz sieciowania mureiny [79]. Niedobór tego enzymu może powodować obniżenie ilości wytwarzanych wiązań poprzecznych (aktywność transpeptydazy) oraz zwiększenie ilości dimerów D-Ala-D-Ala, które stanowią docelowe miejsce

działania wankomycyny [30]. Dlatego szczepy, które posiadają obniżoną produkcję PBP4 lub syntetyzują nieaktywny enzym, wykazują obniżoną wrażliwość w stosunku do tego antybiotyku [30, 82, 83].

Istnieje korelacja również pomiędzy spadkiem liczby wiązań poprzecznych w peptydoglikanie a wzrastającą długością łańcuchów heteropolimeru [47]. Jednak dotychczas nie został wyjaśniony mechanizm tej zależności. Wydaje się również, że na obniżenie poziomu usieciowania mureiny może mieć wpływ inaktywacja operonu *femA/B* [41]. Jednak określenie takiej zależności na podstawie spadku aktywności białek Fem wymaga przeprowadzenia dalszych analiz.

Globalna analiza poziomu ekspresji mRNA u szczepów VSSA i VISA (JH1 – JH15), izolowanych od tego samego pacjenta na różnych etapach długotrwałej terapii wankomycyną [81, 83] pokazuje, że powstawanie szczepów o fenotypie VISA jest procesem bardzo złożonym i determinowanym wielogenowo [57]. Pomiędzy wariantem wrażliwym na wankomycynę JH1, a średniowrażliwym JH9 wykryto przynajmniej dwukrotną różnicę ekspresji 224 genów. Obniżenie syntezy mRNA i cDNA dotyczyło 169 genów, związanych przede wszystkim z metabolizmem podstawowym, syntezą białek powierzchniowych oraz licznych toksyn i enzymów; natomiast podwyższoną ekspresję odnotowano dla 55 genów, kodujących przede wszystkim czynniki uczestniczące w transporcie komórkowym, metabolizmie węglowodanów, biosyntezie ściany komórkowej oraz globalnych procesach regulacyjnych. Zidentyfikowano również dwa geny SA2343 i SAS016 (numery ORF szczepu N315), których ekspresja była 84- i 23-krotnie wyższa u wariantu VISA w porównaniu z izolatem wrażliwym, jednak funkcja tych genów nie została dotychczas poznana [57].

Uzyskane wyniki zmian w ekspresji genów mogą sugerować, że powstawanie szczepów o obniżonej wrażliwości na wankomycynę wiąże się z zaburzeniami w komórkowych systemach regulacyjnych [88]. Hipotezę tą potwierdzają wyniki analiz z 2009 roku, które wskazują na udział globalnego czynnika regulacyjnego SarA w wyrażaniu fenotypu VISA [50]. Z kolei wyniki najnowszych badań, z października 2012, sugerują znaczący udział w ekspresji fenotypu VISA białek z rodziny fosfatyz C2 (PPC2, protein phosphatase C2) [73].

#### 4. Szczepy *Staphylococcus aureus* wykazujące fenotyp hetero-VISA

Pierwszy szczep hetero-VISA, oznaczony jako wrażliwy na wankomycynę, ale zawierający subpopulacje komórek dla których MIC tego antybiotyku było na zróżnicowanym poziomie (od 3 do 9 mg/L), został wyizolowany w styczniu 1996 (wcześniej niż Mu50),

w Japonii, w tym samym ośrodku klinicznym, co pierwszy izolat VISA [36]. Pochodził od 64-letniego pacjenta, który po operacji płuc, wykonywanej z powodu nowotworu, doznał infekcji dolnych dróg oddechowych. Ponieważ badanie diagnostyczne wykazało, że czynnikiem etiologicznym był szczep MRSA, jako lek pierwszego rzutu zastosowano wankomycynę (42 mg/kg/dobę). Dwunasto-dniowe leczenie nie przyniosło poprawy, a wręcz, w ciągu czterech ostatnich dni podawania leku, objawy zapalenia płuc nasiliły się. Z tego powodu zmieniono zestaw antybiotyków i przez kolejnych 10 dni pacjentowi podawano terapię skojarzoną: arbekacynę plus ampicilinę/sulbaktam. Szczep o fenotypie hetero-VISA, nazwany Mu3 (ATCC 700698), został wyizolowany z płwociny chorego zanim do leczenia został wprowadzony aminoglikozyd z antybiotykiem beta-laktamowym i inhibitorem beta-laktamaz [36]. Izolat wykazywał  $MIC_{VA} = 3$  mg/L, przez co pierwotnie został zaklasyfikowany jako wariant wrażliwy na wankomycynę (VSSA). Jednak niepowodzenie terapii przy użyciu tego antybiotyku, skłoniło naukowców do ponownych badań Mu3. Analiza populacyjna szczepu, polegająca na wysiewaniu różnych rozcieńczeń hodowli bakteryjnej na podłoża ze wzrastającymi stężeniami wankomycyny wykazała, że stężenie 4 mg/L hamuje wzrost 99,99% komórek. Natomiast niewielka subpopulacja (jedna na  $10^6$  komórek) wykazuje wzrost na pożywkach zawierających glikopeptyd w stężeniach 5, 6, 7, 8, a nawet 9 mg/L. Dla porównania, szczep Mu50 w 100% był niewrażliwy na stężenie wankomycyny 4 mg/L, natomiast wyższa koncentracja antybiotyku w podłożu hamowała wzrost części komórek mikroorganizmu tak, że przy stężeniu 10 mg/L, uzyskiwano wzrost 0,001% hodowli. Z kolei szczep VSSA (FDA209P) był w 100% wrażliwy na stężenie wankomycyny 4 mg/L [36]. Dlatego też izolat Mu50 został określony jako wykazujący fenotyp o obniżonej wrażliwości na wankomycynę (VISA), natomiast Mu3, który w rutynowym oznaczeniu był wrażliwy na ten antybiotyk, ale posiadał heterogenną populację komórek, został nazwany hetero-VISA (h-VISA). Na podstawie kolejnych analiz stwierdzono, że oba szczepy wykazują fenotyp heterogeny również w stosunku do innego antybiotyku glikopeptydowego, teikoplaniny ( $MIC_{Mu3} = 8$  mg/L,  $MIC_{Mu50} = 16$  mg/L), czyli są to warianty nie tylko hetero-VISA i VISA, lecz również hetero-GISA oraz GISA. Dalsza charakterystyka ujawniła pewne podobieństwa pomiędzy japońskimi izolatami. Posiadały ten sam wzór restrykcyjny w typowaniu PFGE, co oznaczało, że stanowiły ten sam typ epidemiczny (klon IIA); należały do tego samego typu MLST (ST5), były wrażliwe na takie samo minimalne stężenie bakteriobójcze wankomycyny,  $MBC = 8$  mg/L, ponadto obydwa zostały wyizolowane od pacjentów z tego samego japońskiego ośrodka klinicznego, co pozwala przypuszczać, że są to szczepy bli-

sko spokrewnione ze sobą [36]. Badania, które miały na celu poznanie mechanizmu prowadzącego do ekspresji fenotypu hetero-VISA, były również równolegle przeprowadzane dla Mu50. Mu3, podobnie jak wzorcowy izolat VISA, wykazywał podwyższony poziom syntezy wewnątrzkomórkowych prekursorów mureiny oraz zwiększone trzykrotnie uwalnianie heterodimerów na zewnątrz błony komórkowej, wzrost syntezy hydrolaz peptydoglikanu oraz zwiększenie dwukrotnie aktywności autolitycznej ściany komórkowej, jak również podwyższenie trzykrotnie produkcji białek PBP2 i PBP2', związanych z ostatnimi etapami syntezy heteropolimeru. Jednak zmiany te były na poziomie 1,67–6,67 razy niższym, niż u szczepu wzorcowego VISA, Mu50 [33]. Pierwsze analizy porównawcze ujawniły, że jedyna różnica związana była z grubością ściany komórkowej, która u hetero-VISA pozostawała niezmienną, dzięki czemu także struktura peptydoglikanu pozostawała jak u izolatów wrażliwych (brak heteromerów z glicyną pozbawioną grupy aminowej, usieciowanie mureiny na naturalnym poziomie) [34]. Także analiza molekularna sekwencji 213 genów wykazała, że zmiany mutacyjne (substytucje nukleotydów) dotyczą tych samych grup genów (tylko 9 różnic) u obu wariantów, tj.: związanych z metabolizmem węglowodanów, transportem wewnątrzkomórkowym oraz z mechanizmami regulacyjnymi [71]. Wydaje się zatem, że za ekspresję fenotypu hetero-VISA oraz hetero-GISA odpowiadają te same mechanizmy, co u szczepów VISA i GISA, a te pierwsze są najprawdopodobniej formami prekursorowymi, co by tłumaczyło słabsze wyrażenie oraz utrwalenie pewnych modyfikacji i właściwości fenotypu oraz genotypu. Najnowsze publikacje wydają się potwierdzać udział globalnych, komórkowych systemów regulacyjnych (*sarA*, *agr*, *sigB*, *mgrA*) w ekspresji obniżonej wrażliwości na wankomycynę/glikopeptydy u szczepów VISA i GISA oraz u heterogennych h-VISA i h-GISA [15, 50, 88]. Zgodnie z obecnie obowiązującymi rekomendacjami, szczep Mu3, który jest uznawany za wzorcowy szczep h-VISA, jest szczepem VRSA wg EUCAST (kryterium oporności dla wankomycyny MIC  $\geq$  4 mg/L,) oraz VISA wg CLSI, a więc podobieństwo mechanizmów oporności wydaje się zrozumiałe.

### 5. Opcje terapeutyczne leczenia ciężkich zakażeń o etiologii *S. aureus*, wobec których terapia wankomycyną pozostaje nieskuteczna

Pojawienie się pod koniec lat '80-tych XX wieku wankomycyno-opornych szczepów *Enterococcus* spp., w roku 1987 pierwszych klinicznych izolatów gronkoców koagulazo-ujemnych (głównie *S. haemolyticus* oraz *S. epidermidis*), wykazujących fenotyp obniżonej wrażliwości na glikopeptydy, jak również pod koniec

lat '90 XX w. wariantów *S. aureus* niewrażliwych na leczenie dostępnymi wówczas antybiotykami glikopeptydowymi, skłoniło klinicystów oraz mikrobiologów do poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych, stanowiących alternatywę dla wankomycyny. W roku 2000 wprowadzono do lecznictwa linezolid, syntetyczny chemioterapeutyk z grupy oksazolidynonów, skuteczny i bezpieczny w terapiach szpitalnego i ambulatoryjnego zapalenia płuc oraz zakażeń w obrębie skóry i tkanek podskórnych, wywoływanych przez szczepy MRSA, VISA, hetero-VISA oraz VRE. Jednak już począwszy od roku 2001 na całym świecie odnotowuje się przypadki izolacji szczepów *S. aureus*, *E. faecium* oraz *E. faecalis* wykazujące oporność typu mutacyjnego na ten lek przeciwbakteryjny. W ostatnich latach zostały zarejestrowane na rynku, również w Polsce, jeszcze inne terapeutyki, takie jak: daptomycyna (cykliczny lipopeptyd), chinupristina-dalfopristina (preparat złożony ze streptogramin A i B) oraz tigecyklina (glicylocyklina, tetracyklina nowej generacji). I choć każdy z nich wykazuje wysoką aktywność *in vitro* oraz skuteczność w leczeniu zakażeń wywoływanych przez wieloleko-oporne ziarenkowce Gram-dodatnie, to jednocześnie żaden z nich nie jest lekiem ani uniwersalnym, ani pozbawionym wad [40, 62, 64, 86]. W ostatnich latach duże nadzieje leczenia zakażeń MRSA wiąże się z cefalosporynami piątej generacji, jednak jedyny z dotychczas zarejestrowanych z tej grupy antybiotyków – fosamil ceftaroliny, nie jest jeszcze dostępny w Polsce.

### 6. Podsumowanie

Już od początku lat '90 XX w. coraz częściej mają miejsce przypadki niepowodzeń terapeutycznych przy zastosowaniu antybiotyków glikopeptydowych, które jeszcze do niedawna były uznawane za skuteczne terapeutyki, stosowane z wyboru w leczeniu ciężkich infekcji o etiologii MRSA. Przyczyną tych niepowodzeń są szczepy *Staphylococcus aureus*, które na różne sposoby mogą manifestować obniżoną wrażliwość lub oporność na wankomycynę i/lub teikoplaninę (VRSA, VISA, hetero-VISA). Efekty te są warunkowane odmiennymi mechanizmami molekularnymi, podlegającymi różnym systemom regulacyjnym oraz objawiające się różnicowanymi cechami fenotypowymi, ale w konsekwencji zawsze prowadzącymi do braku skuteczności zastosowanego leczenia. Mimo, że wankomycyna nadal stanowi lek z wyboru w terapiach zakażeń MRSA i pomimo możliwości zastosowania kilku alternatywnych terapeutyków, skutecznych wobec wieloleko-opornych *S. aureus*, konieczne jest stosowanie zasad racjonalnej antybiotykoterapii oraz, ze względu na wciąż zmniejszającą się liczbę obecnie dostępnych, poszukiwanie nowych opcji terapeutycznych.



## Piśmiennictwo

- Aligholi M., Emameini M., Jabalameli F., Shahsavan S., Dabiri H., Sedaght H.: Emergence of high-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Imam Khomeini Hospital in Tehran. *Med. Princ. Pract.* **17**, 432–434 (2008)
- Arthur M., Depardieu F., Gerbaud G., Galimand M., Leclercq R., Courvalin P.: The VanS sensor negatively controls VanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction. *J. Bacteriol.* **179**, 97–106 (1997)
- Arthur M., Depardieu F., Molinas C., Reynolds P., Courvalin P.: The *vanZ* gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin. *Gene*, **154**, 87–92 (1995)
- Arthur M., Depardieu F., Snaith H.A., Reynolds P.E., Courvalin P.: Contribution of VanY D,D-carboxypeptidase to glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* by hydrolysis of peptidoglycan precursors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1899–1903 (1994)
- Arthur M., Molinas C., Depardieu F., Courvalin P.: Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J. Bacteriol.* **175**, 117–127 (1993)
- Arthur M., Molinas C., Dutka-Malen S., Courvalin P.: Structural relationship between the vancomycin resistance protein VanH and 2-hydroxycarboxylic acid dehydrogenases. *Gene*, **103**, 133–134 (1991)
- Barna J.C.J., Williams D.H.: The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Annu. Rev. Microbiol.* **38**, 339–357 (1984)
- Biavasco F., Giovanetti E., Miele A., Vignaroli C., Facinelli B., Varaldo P.E.: *In vitro* conjugative transfer of VanA vancomycin resistance between enterococci and *Listeriae* of different species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**, 50–59 (1996)
- Boger D.L.: Vancomycin, teicoplanin, and ramoplanin: synthetic and mechanistic studies. *Med. Res. Rev.* **21**, 356–381 (2001)
- Bugg T.D.H., Wright G.D., Dutka-Malen S., Arthur M., Courvalin P., Walsh C.T.: Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry*, **30**, 10408–10415 (1991)
- CDC.: *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin – United States, 2002. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **51**, 565–567 (2002)
- CDC.: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* – New York, 2004. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **53**, 322–323 (2004)
- CDC.: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* – Pennsylvania, 2002. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **51**, 902 (2002)
- Chang S., Fridkin S.K. i wsp.: Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Investigative Team.: Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1342–1347 (2003)
- Chong Y.P., Kim Y.S. i wsp.: Accessory Gene Regulator (*agr*) Dysfunction in *Staphylococcus aureus* Bloodstream Isolates from South Korean Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 1509–1512 (2013)
- Clark N.C., Weigel L.M., Patel J.B., Tenover F.C.: Comparison of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Michigan and Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 470–472 (2005)
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2005.: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard. *M100-S15*, **25**, 1–181 (2005)
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2006.: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing M2-A9 and M7-A7. *M100-S16*, **26**, 1–181 (2006)
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2008.: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing M2-A9 and M7-A7. *M100-S18*, **28**, 1–181 (2008)
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2009.: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *M100-S19*, **29**, 1–149 (2009)
- Cui L., Iwamoto A., Lian J.Q., Neoh H.M., Maruyama T., Hori-kawa Y., Hiramatsu K.: Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 428–438 (2006)
- Cui L., Ma X., Sato K., Okuma K., Tenover F.C., Mamizuka E.M., Gemmell C.G., Kim M.N., Ploy M.C., El-Solh N., Ferraz V., Hiramatsu K.: Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5–14 (2003)
- Cui L., Murakami H., Kuwahara-Arai K., Hanaki H., Hiramatsu K.: Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2276–2285 (2000)
- de Niederhäusern S., Bondi M., Messi P., Iseppi R., Sabia C., Manicardi G., Anacarso I.: Vancomycin-resistance transferability from VanA enterococci to *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.* **62**, 1363–1367 (2011)
- Dezfulian A., Aslani M.M., Oskoui M., Farrokh P., Azimirad M., Dabiri H., Salehian M.T., Zali M.R.: Identification and Characterization of a High Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Harboring VanA Gene Cluster Isolated from Diabetic Foot Ulcer. *Iran J. Basic Med. Sci.* **15**, 803–806 (2012)
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Clinical Breakpoint Table v. 3.1, 2013.02.11. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/Breakpoint\\_table\\_v\\_3.1.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf), 2013.03.29.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2006.06.20. <http://www.srga.org/eucastwt/mictab/MICglycopeptides.html>, 2013.03.29.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST\_breakpoints\_v1.0\_20091221,2009.12.21. [http://www.eucast.org/antimicrobial\\_susceptibility\\_testing/previous\\_versions\\_of\\_tables](http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/previous_versions_of_tables), 2013.03.29.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Kopia EUCAST\_breakpoints\_v1.2\_101220,2010.12.20. [http://www.eucast.org/antimicrobial\\_susceptibility\\_testing/previous\\_versions\\_of\\_tables](http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/previous_versions_of_tables), 2013.03.29.
- Finan J.E., Archer G.L., Pucci M.J., Climo M.W.: Role of penicillin-binding protein 4 in expression of vancomycin resistance among clinical isolates of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3070–3075 (2001)
- Finks J., Miller C. i wsp.: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, Michigan, USA, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 943–945 (2009)
- Gu L., Cao B., Liu Y., Guo P., Song S., Li R., Dai H., Wang C.: A new Tn1546 type of VanB phenotype-*vanA* genotype vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in mainland China. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **63**, 70–75 (2009)
- Hanaki H., Kuwahara-Arai K., Boyle-Vavra S., Daum R.S., Labischinski H., Hiramatsu K.: Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**, 199–209 (1998)
- Hanaki H., Labischinski H., Inaba Y., Kondo N., Murakami H., Hiramatsu K.: Increase in glutamine-non-amidated muopeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**, 315–320 (1998)

35. Handwerger S., Skoble J.: Identification of chromosomal mobile element conferring high-level vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2446–2453 (1995)
36. Hiramatsu K., Aritaka N., Hanaki H., Kawasaki S., Hosoda Y., Hori S., Fukuchi Y., Kobayashi I.: Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*, **350**, 1670–1673 (1997)
37. Hiramatsu K., Hanaki H., Ino T., Yabuta K., Oguri T., Tenover F.C.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**, 135–136 (1997)
38. Hiramatsu K.: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet. Infect. Dis.* **1**, 147–155 (2001)
39. Hong H.J., Hutchings M.I., Buttner M.J.: Vancomycin resistance VanS/VanR two-component systems. *Adv. Exp. Med. Biol.* **631**, 200–223 (2008)
40. Howden B.P., Davies J.K., Johnson P.D., Stinear T.P., Grayson M.L.: Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 99–139 (2010)
41. Hübscher J., Jansen A., Kotte O., Schäfer J., Majcherczyk P.A., Harris L.G., Bierbaum G., Heinemann M., Berger-Bächi B.: Living with an imperfect cell wall: compensation of *femAB* inactivation in *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics*, **8**, 307 (2007)
42. Jeljaszewicz J., Młynarczyk G., Młynarczyk A.: Antibiotic resistance in Gram-positive cocci. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **16**, 473–478 (2000)
43. Jevons M.P.: “Celbenin” – resistant staphylococci. *BMJ*. **1**, 124–125 (1961)
44. Kato Y., Suzuki T., Ida T., Maebashi K.: Genetic changes associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*: predominance of amino acid substitutions in YvqF/VraSR. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 37–45 (2010)
45. Khan M.A., van der Wal M., Farrell D.J., Cossins L., van Belkum A., Alaidan A., Hays J.P.: Analysis of VanA vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Saudi Arabian hospitals reveals the presence of clonal cluster 17 and two new Tn1546 lineage types. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**, 279–283 (2008)
46. Khan S.A., Sung K., Layton S., Nawaz M.S.: Heteroresistance to vancomycin and novel point mutations in Tn1546 of *Enterococcus faecium* ATCC 51559. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **31**, 27–36 (2008)
47. Komatsuzawa H., Ohta K., Yamada S., Ehlert K., Labischinski H., Kajimura J., Fujiwara T., Sugai M.: Increased glycan chain length distribution and decreased susceptibility to moenomycin in a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* mutant. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 75–81 (2002)
48. Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów. [http://www.korl.edu.pl/pdf/eucast/EUCAST\\_breakpoints\\_tlumaczenie\\_v2-2012.pdf](http://www.korl.edu.pl/pdf/eucast/EUCAST_breakpoints_tlumaczenie_v2-2012.pdf)
49. Kuroda M., Hiramatsu K. i wsp.: Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **357**, 1225–1240 (2001)
50. Lamichhane-Khadka R., Cantore S.A., Riordan J.T., Delgado A., Norman A.E., Dueñas S., Zaman S., Horan S., Wilkinson B.J., Gustafson J.E.: *sarA* inactivation reduces vancomycin-intermediate and ciprofloxacin resistance expression by *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **34**, 136–141 (2009)
51. Leavis H., Top J., Shankar N., Borgen K., Bonten M., van Embden J., Willems R.J.: A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J. Bacteriol.* **186**, 672–682 (2004)
52. 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)
53. Leclercq R.: Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci and enterococci. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 224–231 (2009)
54. Levine DP.: Vancomycin: a history. *Clin. Infect. Dis.* **42**, S5–12 (2006)
55. Lindsay J.A.: Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 98–103 (2010)
56. Mainardi J.L., Villet R., Bugg T.D., Mayer C., Arthur M.: Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 386–408 (2008)
57. McAleese F., Wu S.W., Sieradzki K., Dunman P., Murphy E., Projan S., Tomasz A.: Overexpression of genes of the cell wall stimulon in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibiting vancomycin-intermediate *S. aureus*-type resistance to vancomycin. *J. Bacteriol.* **88**, 1120–1133 (2006)
58. Mcguire J.M., Wolfe R.N., Ziegler D.W.: Vancomycin, a new antibiotic. II. *In vitro* antibacterial studies. *Antibiot. Annu.* **3**, 612–618 (1955)
59. Meziane-Cherif D., Saul F.A., Moubareck C., Weber P., Haouz A., Courvalin P., Périchon B.: Molecular Basis of Vancomycin Dependence in VanA-Type *Staphylococcus aureus* VRSA-9. *J. Bacteriol.* **192**, 5465–5471 (2010)
60. Mirani Z.A., Jamil N.: Effect of vancomycin on the cytoplasmic membrane fatty acid profile of vancomycin-resistant and -susceptible isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Chemother.* **19**, 24–33 (2013)
61. Mirani Z.A., Jamil N.: Genomic Organization of a Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Coll. Physicians Surg. Pak.* **23**, 107–111 (2013)
62. Młynarczyk A., Młynarczyk B., Kmera-Muszynska M., Majewski S., Młynarczyk G.: Mechanisms of the resistance and tolerance to beta-lactam and glycopeptide antibiotics in pathogenic Gram-positive cocci. *Mini-Rev. Med. Chem.* **9**, 1527–1537 (2009)
63. Młynarczyk A., Młynarczyk G., Łuczak M.: Conjugative transfer of glycopeptide and macrolide resistant genes among enterococci and from *Enterococcus faecalis* to *Staphylococcus aureus*. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **54**, 21–28 (2002)
64. Młynarczyk B., Młynarczyk A., Kmera-Muszynska M., Majewski S., Młynarczyk G.: Mechanisms of resistance to antimicrobial drugs in pathogenic Gram-positive cocci. *Mini-Rev. Med. Chem.* **10**, 928–937 (2010)
65. Młynarczyk G., Grzybowska W., Młynarczyk A., Tyski S., Kawecki D., Łuczak M., Chmura A., Rowiński W.: Significant increase in the isolation of glycopeptide-resistant enterococci from patients hospitalized in the transplant surgery ward in 2004–2005. *Transplant. Proc.* **39**, 2883–2885 (2007)
66. Młynarczyk G., Młynarczyk A., Zabicka D., Jeljaszewicz J.: Lysogenic conversion as a factor influencing the vancomycin tolerance phenomenon in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**, 136–137 (1997)
67. Młynarczyk G., Rosdahl V.T., Skov R., Młynarczyk A.: Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Warsaw hospital. *J. Hosp. Infect.* **34**, 151–160 (1996)
68. Moellering R.C. Jr.: Vancomycin: A 50-year reassessment. *Clin. Infect. Dis.* **42**, 3–4 (2006)

69. Naas T, Fortineau N., Snanoudj R., Spicq C., Durrbach A., Nordmann P.: First nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* expressing a VanD-like phenotype associated with a *vanA* genotype. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3642–3649 (2005)
70. Noble W.C., Virani Z., Cree R.G.: Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**, 195–198 (1992)
71. Ohta T., Hayashi H. i wsp.: Nucleotide substitutions in *Staphylococcus aureus* strains, Mu50, Mu3, and N315. *DNA Res.* **11**, 51–56 (2004)
72. Parenti F., Schito G.C., Courvalin P.: Teicoplanin chemistry and microbiology. *J. Chemother.* **12**, 5–14 (2000)
73. Passalacqua K.D., Satola S.W., Crispell E.K., Read T.D.: A mutation in the PP2C phosphatase gene in a *Staphylococcus aureus* USA300 clinical isolate with reduced susceptibility to vancomycin and daptomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 5212–5223 (2012)
74. Périchon B., Courvalin P.: *Staphylococcus aureus* VRSA-11B is a constitutive vancomycin-resistant mutant of vancomycin-dependent VRSA-11A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 4693–4696 (2012)
75. Périchon B., Courvalin P.: VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 4580–4587 (2009)
76. Reynolds P.E., Depardieu F., Dutka-Malen S., Arthur M., Courvalin P.: Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon Tn1546 requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. *Mol. Microbiol.* **13**, 1065–1070 (1994)
77. Roper D.I., Huyton T., Vagin A., Dodson G.: The molecular basis of vancomycin resistance in clinically relevant enterococci: crystal structure of D-alanyl-D-lactate ligase (VanA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8921–8925 (2000)
78. Saha B., Singh A.K., Ghosh A., Bal M.: Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia). *J. Med. Microbiol.* **57**, 72–79 (2008)
79. Scheffers D.J., Pinho M.G.: Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 585–607 (2005)
80. Severin A., Tabei K., Tenover F., Chung M., Clarke N., Tomasz A.: High level oxacillin and vancomycin resistance and altered cell wall composition in *Staphylococcus aureus* carrying the staphylococcal *mecA* and the enterococcal *vanA* gene complex. *J. Biol. Chem.* **279**, 3398–3407 (2004)
81. Sieradzki K., Leski T., Dick J., Borio L., Tomasz A.: Evolution of a vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strain *in vivo*: multiple changes in the antibiotic resistance phenotypes of a single lineage of methicillin-resistant *S. aureus* under the impact of antibiotics administered for chemotherapy. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1687–1693 (2003)
82. Sieradzki K., Pinho M.G., Tomasz A.: Inactivated *pbp4* in highly glycopeptide-resistant laboratory mutants of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **274**, 18942–18946 (1999)
83. Sieradzki K., Tomasz A.: Alterations of cell wall structure and metabolism accompany reduced susceptibility to vancomycin in an isogenic series of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **185**, 7103–7110 (2003)
84. Sieradzki K., Tomasz A.: Inhibition of the autolytic system by vancomycin causes mimicry of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*-type resistance, cell concentration dependence of the MIC, and antibiotic tolerance in vancomycin-susceptible *S. aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 527–533 (2006)
85. Sievert D.M., Rudrik J.T., Patel J.B., McDonald L.C., Wilkins M.J., Hageman J.C.: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002–2006. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 668–674 (2008)
86. Sujatha S., Prahara J.I.: Glycopeptide Resistance in Gram-Positive Cocci: A Review. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* **2012**, 781679 (2012)
87. Sung K., Khan S.A., Nawaz M.S.: Genetic diversity of Tn1546-like elements in clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **31**, 549–554 (2008)
88. Szymanek K., Młynarczyk A., Młynarczyk G.: Systemy regulacyjne ekspresji genów u *Staphylococcus aureus*. *Post. Mikrobiol.* **48**, 7–22 (2009)
89. Tenover F.C., Bozdogan B. i wsp.: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.* **8**, 275–280 (2004)
90. Teo J.W.P., Krishnan P., Jureen R., Lin R.T.P.: Detection of an Unusual *van* Genotype in a Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Hospital Isolate. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 4297–4298 (2011)
91. Tiwari H.K., Sen M.R.: Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. *BMC Infect. Dis.* **26**, 156 (2006)
92. Uttley A.H.C., Collins C.H., Naidoo J., George R.C.: Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*, **1**, 57–58 (1988)
93. Veiga H., Pinho M.G.: Inactivation of the *SauI* type I restriction-modification system is not sufficient to generate *Staphylococcus aureus* strains capable of efficiently accepting foreign DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 3034–3038 (2009)
94. Vollmer W., Joris B., Charlier P., Foster S.: Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 259–286 (2008)
95. Waldron D.E., Lindsay J.A.: *SauI*: a novel lineage-specific type I restriction-modification system that blocks horizontal gene transfer into *Staphylococcus aureus* and between *S. aureus* isolates of different lineages. *J. Bacteriol.* **188**, 5578–5585 (2006)
96. Weigel L.M., Clewell D.B., Gill S.R., Clark N.C., McDougal L.K., Flannagan S.E., Kolonay J.F., Shetty J., Killgore G.E., Tenover F.C.: Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*, **302**, 1569–1571 (2003)
97. Weigel L.M., Patel J.B. i wsp.: High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 231–238 (2007)
98. Wright G.D., Molinas C., Arthur M., Courvalin P., Walsh C.T.: Characterization of *vanY*, a DD-carboxypeptidase from vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* BM4147. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 1514–1518 (1992)
99. Xu X., Wang M. i wsp.: *vanM*, a New Glycopeptide Resistance Gene Cluster Found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4643–4647 (2010)
100. Zhu W., Clark N., Patel J.B.: pSK41-like plasmid is necessary for Inc18-like *vanA* plasmid transfer from *Enterococcus faecalis* to *Staphylococcus aureus* *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 212–219 (2013)