

Pályamunka

Melegh Szilvia
Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ
Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet
7624 Pécs, Szigeti út 12.
72/536-000 mellék: 31665
melegh.szilvia@pte.hu

A Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 40 évnél fiatalabb kollégák számára meghirdetett pályázata

2015

Vancomycin rezisztens Enterococcus izolátumok megjelenése a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központjában

Melegh Szilvia¹, Nyul Adrienn¹, Kovács Krisztina¹, Gám Tamás¹, Patkó Brigitta¹, Berta Brigitta², Lesinszki Virág², Pászti Judit², Tóth Ákos², Mestyán Gyula¹

1) Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet 2) Országos Epidemiológiai Központ

Összefoglaló

A Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központjában, 2012 márciusában első alkalommal izoláltuk vancomycin rezisztens Enterococcut (VRE). Ezt követően számos további VRE izolátumot azonosítottunk a különböző osztályokról származó klinikai és környezeti mintákban. Vizsgálataink célja a vancomycin rezisztenciáért felelős gén azonosítása és az izolátumok közötti epidemiológiai összefüggések molekuláris módszerekkel történő feltárása volt. A *vanA* és *vanB* gének kimutatását PCR segítségével végeztük. Az izolátumok közötti klonális viszonyok elemzése PFGE-vel történt. A *vanA* operont hordozó Tn1546-os transzpozon szerkezetének meghatározását PCR térképezéssel végeztük, amelyet szekvenálással egészítettünk ki. Az eredmények alapján a pécsi VRE izolátumok megjelenését egy közös, a *vanA* operont hordozó, Tn1546-szerű elem *E. faecium* törzsekben való felbukkanása és elterjedése magyarázza. Az általunk azonosított Tn1546 variánsban a transzpozonon található *orf1* gén teljesen és az *orf2* gén részlegesen deletálódott, emellett a *vanS* és *vanH* gének közötti régióban egy IS1251-szerű elemet tartalmazott. IS1251 inzerciót hordozó Tn1546 variánsokat először az Amerikai Egyesült Államokban azonosítottak, majd később Európában, Ázsiában és Dél-Amerikában is elterjedté váltak. A Tn1546:IS1251 széleskörű, több kontinenst érintő elterjedése azt sugallja, hogy a VRE izolátumok pécsi megjelenésének hátterében a transzpozon külföldről történt behozatala állhatott.

Bevezetés

Az *Enterococcus* nemzetségbe tartozó fajok természetes rezisztenciával rendelkeznek számos antibiotikum csoporttal szemben, és emellett különféle szerzett rezisztenciamechanizmusokkal is fel lehetnek vértézve. Klinikai szempontból nagy jelentőséggel bír a humán infekciókban leggyakrabban előforduló két *Enterococcus* speciesnek – az *Enterococcus faecalis*-nak és az *Enterococcus faecium*-nak – a glikopeptid antibiotikumokkal szembeni szerzett rezisztenciája. Eddig nyolcféle szerzett vancomycin rezisztenciamechanizmust különítettek el (VanA, VanB, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM és VanN), amelyek egy része egyidejűleg csökkent teicoplanin érzékenységet is okoz. A legszélesebb elterjedtségre a *vanA* és a *vanB* operonok tettek szert. Míg az előbbi magas szintű vancomycin és teicoplanin rezisztencia kialakításáért felelős, addig a második jelenlétére magas szintű vancomycin rezisztencia mellett megtartott teicoplanin érzékenység a jellemző [1].

Az első vancomycin rezisztens *Enterococcus* (VRE) törzseket Franciaországban és az Egyesült Királyságban azonosították 1988-ban, majd egy évvel később hasonló izolátumok bukkantak fel az Amerikai Egyesült Államokban is. A VRE törzseknek a két kontinensen való kialakulásában és térhódításában eltérő tényezők játszhattak szerepet: míg Európában az állati takarmányhoz növekedésserkentőként adagolt avoparcin, addig Észak-Amerikában a humán gyógyászatban alkalmazott antibiotikumok (mindenekelőtt a vancomycin) jelenthették a VRE törzsek terjedésének fő hajtóerejét. Mindezek eredményeképpen az 1990-es években az Amerikai Egyesült Államokban, majd a 2000-es években Európa szerte is jelentős elterjedtségre tettek szert [1].

Magyarországon 2012 előtt, a 2004-es *vanB* pozitív *E. faecium* járványt leszámítva, csupán ritkán és sporadikus esetekben számoltak be VRE törzsek jelenlétéről [2–6]. A Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központjában az első szerzett vancomycin rezisztenciával rendelkező *Enterococcus* izolátumot 2012 márciusában azonosítottuk egy higiénés szűrés során vett környezeti mintában. Ezt követően további hasonló izolátumokat detektáltunk a Klinikai Központ különböző osztályairól származó klinikai és környezeti mintákban egyaránt. Vizsgálatunk célja az volt, hogy azonosítsuk a vancomycin rezisztenciáért felelős gént, továbbá, hogy az izolátumok közötti összefüggéseket molekuláris módszerek segítségével tisztázzuk.

Módszerek

Izolátumok

A 2012-es év során összesen 45 VRE izolátumot azonosítottunk, mely 17 betegtől és 9 környezeti mintából származott (1. táblázat). A fentiek közül 17 izolátumot (13 klinikai minta, 4 környezeti minta) választottunk ki további vizsgálat céljából.

	VRE pozitív betegek száma	VRE pozitív környezeti minták száma	Jelen vizsgálathoz kiválasztott izolátumok száma
I. sz. Belgyógyászati Klinika (összesen), ezen belül osztályonként: <i>Belgyógyászati Intenzív Osztály</i>	12 2	8 0	13 2
<i>Hematológia</i>	2	3	2
<i>Infektológia</i>	4	1	5
<i>Gasztroenterológia</i>	2	0	1
<i>Pulmonológia</i>	2	4	3
II. sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum	1	1	2
Sebészeti Klinika	2	0	1
Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet	1	0	0
Traumatológiai és Kézsebészeti Klinika	1	0	1

1. táblázat: VRE izolátumok előfordulása a különböző osztályokon 2012-ben

Identifikálás és rezisztencia vizsgálat

Az izolátumok identifikálása API 20 Strep (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Franciaország) segítségével és *E. faecium*-ra valamint *E. faecalis*-ra specifikus *ddl* gének PCR-rel történő kimutatásával történt (*ddl_{E.faecium}*; *ddl_{E.faecalis}*) [7]. A vancomycin érzékenységet korong diffúziós módszerrel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) és gradiens tesztcsík (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Olaszország) segítségével határoztuk meg. Az eredményeket a CLSI ajánlások alapján értékeltük [8]. A *vanA* és *vanB* gének jelenlétét PCR segítségével vizsgáltuk [7].

Molekuláris tipizálás

Az izolátumok közötti klonális viszonyok feltárására makrorestrikciós profil analízist végeztünk PFGE segítségével [9].

Tn1546 transzpozon vizsgálata

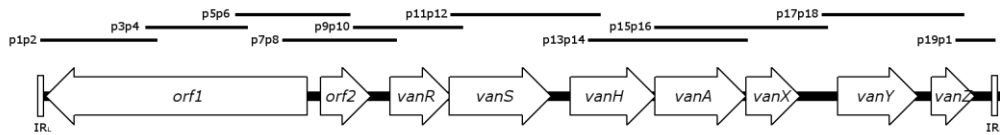
A *vanA* operont hordozó Tn1546 transzpozon szerkezetének feltérképezéséhez az irodalomban korábban leírt tizenkilenc primert (p1-p19) használtuk [10]. Ezek segítségével a transzpozon tíz átfedő fragmentumát amplifikáltuk PCR reakció során, és ezáltal a transzpozon különböző szerkezeti eltérései váltak vizsgálhatóvá (1. ábra). A PCR vizsgálatokhoz a Tn1546 prototípusát hordozó Bm4147-es irodalmi törzs szolgált kontrollként. Egy izolátum esetében a térképezéshez használt primerek segítségével elvégeztük a transzpozon részleges szekvenálását is.

Eredmények

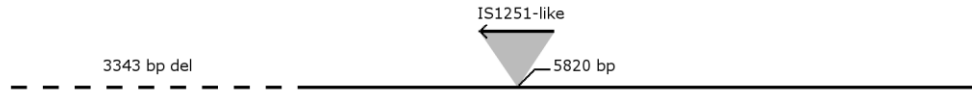
Valamennyi izolátum *vanA* gént hordozó *E. faecium*-nak bizonyult. A PFGE segítségével az izolátumok 4 csoportba voltak sorolhatóak (ENTCO-2 n=11, ENTCO-2a n=1, ENTCO-5 n=3, ENTCO-8 n=2).

A transzpozon térképezés alapján az izolátumok egy közös Tn1546-szerű elemet hordoztak, amely a kontrollként használt Bm4147-es törzs Tn1546-os szerkezetétől a következőkben tért el: (1) p1p2, p3p4, p5p6 és p7p8 fragmentumok hiánya, és (2) p11p12 fragmentum méretének megnövekedése (1679 bp helyett kb. 3200 bp).

A transzpozon szekvenálása során összesen 8409 bp hosszú DNS szekvenciához jutottunk. Számos részen, a két szálon ellentétesen megkezdett szekvenálás nem ért össze, így több helyen rövid szakaszok hiányoztak ahhoz, hogy a teljes nukleotid sorrend rendelkezésünkre álljon. A meglévő részleges DNS szekvenciát a prototípus Tn1546 szekvenciával (GenBank: M97297) összehasonlítva megállapítható volt, hogy a transzpozon 5' végénél 3433 bp hosszúságú deléció történt, mely az *orf1* gén teljes és az *orf2* gén részleges hiányát okozta, valamint az 5820. bp-nál (a *vanS* és *vanH* gének közötti régióban) egy inzerciót tartalmazott. Az inzertálódott szekvencia a blast keresés alapján IS1251-szerű inzerció elemnek bizonyult (GenBank: AF148130 azonosság: 942/943 bp) (1. ábra).



Tn1546 prototípus; *E. faecium* - Bm4147 irodalmi törzs (GenBank: M97297)



Tn1546-szerű elem; *E. faecium* - Pécsi Tudományegyetem

1. ábra A transzpozon térképezés, a Tn1546 prototípusnak és a pécsi izolátumok Tn1546-szerű elemének sematikus rajza

Blast keresés alapján a rendelkezésünkre álló DNS szekvencia az NCBI nukleotid adatbázisában szereplők közül a GQ900435 sorszámú szekvenciával mutatta a legnagyobb egyezőséget (azonosság: 8406/8409 nukleotid).

Megbeszélés

Vizsgálataink azt mutatták, hogy a VRE izolátumok pécsi klinikákon való felbukkanása és elterjedése egyetlen közös, a *vanA* gént hordozó, Tn1546 variánsnak az *E. faecium* törzsekben való megjelenésével és szétszóródásával magyarázható.

A *vanA* gén jellemzően a Tn1546-os transzpozonon vagy annak különböző strukturális változatain (Tn1546-szerű elemek) található meg. A Tn1546 magába foglalja a transzpozícióhoz szükséges géneket (*orf1* - transposase, *orf2* - resolvase), a magas szintű vancomycin rezisztencia kialakulásához szükséges enzimek génjeit (*vanA* - ligáz, *vanH* - dehidrogenáz, *vanX* - dipeptidáz, *vanY* - karboxipeptidáz), egy teicoplanin rezisztenciáért felelős gént (*vanZ*), valamint a *vanR* (regulátor) és *vanS* (szenzor) kétkomponensű szabályozó rendszer génjeit (1. ábra) [10–12]. A Tn1546 első leírása óta számos strukturális változatot (Tn1546-szerű elemek) azonosítottak már, amelyekben a vancomycin rezisztencia szempontjából nélkülözhető *orf1*, *orf2*, *vanY* és *vanZ* gének különböző mértékű deléciója és/vagy különböző inzerciók szekvenciákat jelenléte figyelhető meg.

	Év	Ország	Species	orf1	orf2	vanR	vanS	IS1251	vanH	vanA	vanX	vanY	vanZ	ref.
1	1991	USA	<i>E. faecium</i>	D (120 bp)	+	+	+	L34675	+	+	+	+	+	[13]
2	<1992	USA	<i>E. faecium</i>	NA	NA	+	+	≈AF148130	+	+	+	+	+	[14]
3	1994	USA, Írország	<i>E. faecium</i>	D (<590 bp)	+	+	+	≈AF148130	+	+	+	+	+	[15]
4	1995	USA	<i>E. faecium</i>	D (889 bp)	+	+	+	≈L34675	+	+	+	+	+	[16]
5	<1998	Norvégia	<i>E. faecium</i>	D (<590 bp)	+	+	+	AF148130	+	+	+ ¹	+	D (>10253 bp)	[15]
6	1998	Görögország	<i>E. faecium</i>	D (<1222 bp)	+	+	+	NA	+	+	+	+	+	[17]
7	2002	USA	<i>S. aureus</i>	D (3098 bp)	+	+	+	≈AF148130	+	+	+	+	+	[18]
8	<2004	Szaúd-Arábia	<i>E. faecium</i>	D (889 bp)	+	+	+	≈L34675	+	+	+	+	+	[19]
9	<2004	Brazília	<i>E. faecium</i>	D (<1222 bp)	+	+	+	AY560917	+	+	+	+	+	[20]
10	2004	USA	<i>S. aureus</i>	D (3578 bp)		+	+	≈L34675	+	+	+	+	+	[21]
11	2005	Lengyelország	<i>E. faecium</i>	D (<3000 bp)	+	+	+	NA	+	+	+	+	+	[22]
12	<2007	Paraguay	<i>E. faecium</i>	D (889 bp)	+	+	+	≈L34675	+	+	+	+	+	[23]
13	<2007	Paraguay	<i>E. faecium</i>	D (889 bp)	+	+	+	≈L34675 ²	+	+	+	+	+	[23]
14	2007	Tajvan	<i>E. faecium</i>	+	+	+	+	≈AF148130	+	+	+	+	+	[24]
15	2007	Tajvan	<i>E. faecium</i>	D (<1222 bp)	+	+	+	≈AF148130	+	+	+	+	+	[24]
16	<2008	USA	<i>E. faecium</i>	+	+	+	+	≈L34675	+	+	+	+	+	[25]
27	<2008	Szaúd-Arábia	<i>E. faecium</i>	D (3343 bp)		+	+	≈L34675	+	+	+	+	+	[26]
17	2009	Kanada	<i>E. faecium</i>	D (5813 bp)				≈AF148130	+	+	+	+	+	[27]
18	2009	Brazília	<i>E. faecium</i>	D (<3041 bp)	+	+	+	NA	+	+	+	+	D (>10116 bp)	[28]
19	<2011	Brazília	<i>E. faecium</i>	D (<3000 bp)	+	+	+	NA	+	+	+	+	+	[28]
20	<2011	NA	<i>E. faecium</i>	D (3343 bp)		+	+	≈AF148130	+	+	+	+	+	[29]
21	2012	Tajvan	<i>E. faecium</i>	D (<1222 bp)	+	+	+	≈AF148130	+	+	+	+	+	[30]
22	2012	Tajvan	<i>E. faecium</i>	D (<1222 bp)	+ ³	+	+	≈AF148130	+	+	+	+	+	[30]
23	2012	Tajvan	<i>E. faecium</i>	D (<1222 bp)	+ ³	+	+	≈AF148130	+	+	+ ⁴	+	+	[30]
24	2012	Tajvan	<i>E. faecium</i>	D (<1222 bp)	+	+	+	≈AF148130	+	+	+	D (>8929 bp)		[30]
25	2012	Tajvan	<i>E. faecium</i>	D (<1222 bp) ⁵	+	+	+	≈AF148130	+	+	+	+	+	[30]
26	2012	Tajvan	<i>E. faecium</i>	D (<1222 bp)	+ ³	+	+	≈AF148130 ⁶	+	+	+	+	+	[30]

2. táblázat: A *vanS* és *vanH* gének közötti régióban IS1251-et tartalmazó Tn1546-szerű elemek főbb szerkezeti eltérései

„+” = Bm4147 törzs Tn1546 elemével megegyező szerkezet (PCR termék vagy PCR-RFLP fragmentum mérete alapján)

„D” = deléció (a deléció pontos vagy becsült kiterjedése a Bm4147-es Tn1546 transzpozon teljes méretéhez viszonyítva került feltüntetésre)

„NA” = nincs adat

¹ *vanX* és *vanY* gének közötti régióban kb. 550 bp inzerció

² IS1251-ben ISEfa5 inzerció

³ *orf2* és *vanR* gének közötti régióban IS1678 inzerció

⁴ *vanX* és *vanY* gének közötti régióban ISEfa11 inzerció

⁵ *orf1* génben ISEfa4 inzerció

⁶ IS1251-ben inzerció

Az általunk azonosított Tn1546 variáns a *vanS* és *vanH* gének közötti régióban egy IS1251 inzerciós elemet tartalmazott (Tn1546::IS1251). Ilyen elrendeződést először az Amerikai Egyesült Államokban azonosítottak, később azonban Európa, Ázsia, Észak- és Dél-Amerika különböző országaiban is elterjedté vált [13]. A Tn1546::IS1251 elemek közötti legjelentősebb eltéréseknek tekinthetők (1) a transzpozon 5' és 3' végének különböző mértékű deléciói, (2) az IS1251 nukleotid sorrendjében való különbözőségeket (a három azonosított variáns GenBank sorszáma: L34675, AF148130, AY560917) és (3) további inzerciós elemek (IS) jelenléte. Ezek a szempontok alapján osztályozva az irodalomban megjelent variánsokat (2. táblázat) igen nagyfokú diverzitás állapítható meg. A számos változat közül a pécsi VRE izolátumokban azonosított transzpozon a legnagyobb mértékű egyezőséget (>99%) az 5753c *E. faecium* törzs Tn1546-szerű elemével (GenBank sorszám: GQ900435) mutatta (2. táblázat 20. sorszám) [29]. Ezen törzs izolálásának pontos helye és ideje nem került közlésre.

Magyarországon 2012-t megelőzően *vanA* gént több alkalommal is azonosítottak sporadikus esetekből izolált *E. faecalis* törzsekben [3, 4, 6]. Ezenfelül egy alkalommal *E. faecium* törzsben is kimutatásra került [31]. Ezek a 2012 előtti vizsgálatok a rezisztencia gén azonosításán túl, nem terjedtek ki a Tn1546 szerkezetének elemzésére, így jelen tanulmány volt az első ilyen jellegű vizsgálat Magyarországon. Annak ellenére, hogy a hazai adatok a Tn1546 szerkezetének tekintetben hiányosak, valószínűsíthető, hogy a Pécsen 2012-ben megjelent, majd halmozottan előforduló VRE izolátumok felbukkanásának hátterében a Tn1546::IS1251 változat külföldről történt behozatala állhatott. Ezt a feltételezést három tényező látszik alátámasztani: (1) 2012 előtt a *vanA* gén Magyarországon csak sporadikusan fordult elő, hasonló mértékű halmozódás nem volt tapasztalható; (2) Pécsen korábban nem azonosítottak VRE izolátumokat; és (3) ezen időszakban a Tn1546::IS1251 már több kontinensre való kiterjedtséggel és nagyfokú diverzitással rendelkezett.

A jövőben tervezzük transzpozon térképezési vizsgálatainkat kiterjeszteni más intézményekből és eltérő időszakokból származó *vanA* pozitív *Enterococcus* izolátumokra is annak érdekében, hogy a Tn1546::IS1251 térbeli és időbeli elterjedtsége az országon belül megismerhető legyen, és ezáltal a Pécsen észlelt megjelenés jelentősége pontosabban felmérhetővé váljon.

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük Patrice Courvalin-nek (Institut Pasteur, Párizs, Franciaország), hogy rendelkezésünkre bocsátotta a Bm4147-es *E. faecium* törzset.

Függelék

Az eredmények egy része bemutatásra került az Európai Klinikai Mikrobiológiai és Infektológiai Társaság 25. Európai Kongresszusán (ECCMID Kopenhága, 2015. április 25-28.).

A Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetében történt az izolátumok identifikálása és rezisztenciavizsgálata, a vancomycin rezisztencia gének kimutatása és Tn1546 transzpozon térképezés.

Az Országos Epidemiológiai Központban végezték a molekuláris tipizálást és Tn1546 transzpozon szekvenálását.

A pályázó, Melegh Szilvia, végezte a *vanA*, *vanB*, *ddl_{E.faecium}* valamint *ddl_{E.faecalis}* gének kimutatását és a transzpozon térképezést.

Irodalomjegyzék

- [1] V. Cattoir and R. Leclercq, "Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce?," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 68, no. 4, pp. 731–742, Dec. 2012.
- [2] M. Füzi, K. Tóth, Z. Lajos, J. Jung, A. Nagy, B. Zsolnai, G. Pados, I. Rényi, G. Benyó, J. Kovács, E. Székely, and E. Sipos, "Vancomycin-rezisztens enterococcus törzsek izolálása Magyarországon," *Infektológia és Klin. Mikrobiológia*, no. 3, pp. 136–141, 1998.
- [3] A. Ghidán, C. Jeney, C. L. Maródi, K. Csiszár, and F. Rozgonyi, "PCR detection of the *vanA* gene in a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* clinical isolate from Hungary.," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 46, no. 2, pp. 325–6, Aug. 2000.
- [4] M. Knausz, B. Gartner, I. Fömötör, A. Ghidán, K. Kamotsay, and F. Rozgonyi, "Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* colonization during recovery from *Neisseria meningitidis* cerebrospinal meningitis. Case report.," *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, vol. 50, no. 4, pp. 453–7, Jan. 2003.
- [5] K. Böröcz, E. Szilágyi, A. Kurcz, B. Libisch, K. Glatz, and M. Gacs, "First vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreak reported in Hungary.," *Euro Surveill.*, vol. 10, no. 1, p. E050127.1, Jan. 2005.

- [6] Z. Dombrádi, F. Bodnár, P. Orosi, V. Dombrádi, and J. Szabó, "A case report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* colonization of a femoral wound in central europe," *Cent. Eur. J. Med.*, vol. 4, no. 2, pp. 259–261, Feb. 2009.
- [7] S. Dutka-Malen, S. Evers, and P. Courvalin, "Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 33, no. 1, pp. 24–7, Jan. 1995.
- [8] *CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-second Informational Supplement. Document M100-S22.* Wayne, PA: CLSI, 2012.
- [9] J.-O. Cha, Y.-H. Jung, H. R. Lee, J. Il Yoo, and Y. S. Lee, "Comparison of genetic epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from humans and poultry.," *J. Med. Microbiol.*, vol. 61, no. Pt 8, pp. 1121–8, Aug. 2012.
- [10] M. Arthur, C. Molinas, F. Depardieu, and P. Courvalin, "Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147.," *J. Bacteriol.*, vol. 175, no. 1, pp. 117–27, Jan. 1993.
- [11] M. Arthur, C. Molinas, and P. Courvalin, "The VanS-VanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147.," *J. Bacteriol.*, vol. 174, no. 8, pp. 2582–91, Apr. 1992.
- [12] M. Arthur, F. Depardieu, C. Molinas, P. Reynolds, and P. Courvalin, "The vanZ gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin.," *Gene*, vol. 154, no. 1, pp. 87–92, Feb. 1995.
- [13] S. Handwerger, J. Skoble, L. F. Discotto, and M. J. Pucci, "Heterogeneity of the vanA gene cluster in clinical isolates of enterococci from the northeastern United States.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 39, no. 2, pp. 362–8, Feb. 1995.
- [14] S. A. Khan, K. Sung, S. Layton, and M. S. Nawaz, "Heteroresistance to vancomycin and novel point mutations in Tn1546 of *Enterococcus faecium* ATCC 51559.," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 31, no. 1, pp. 27–36, Jan. 2008.
- [15] G. S. Simonsen, M. R. Myhre, K. H. Dahl, O. Olsvik, and A. Sundsfjord, "Typeability of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant enterococci using long-range PCRs and specific analysis of polymorphic regions.," *Microb. Drug Resist.*, vol. 6, no. 1, pp. 49–57, Jan. 2000.
- [16] R. J. Willems, J. Top, N. van den Braak, A. van Belkum, D. J. Mevius, G. Hendriks, M. van Santen-Verheuver, and J. D. van Embden, "Molecular diversity and evolutionary relationships of Tn1546-like elements in enterococci from humans and animals.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 43, no. 3, pp. 483–91, Mar. 1999.
- [17] E. Demertzi, M. F. Palepou, M. E. Kaufmann, A. Avlami, and N. Woodford, "Characterisation of VanA and VanB elements from glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* from Greece.," *J. Med. Microbiol.*, vol. 50, no. 8, pp. 682–7, Aug. 2001.
- [18] N. C. Clark, L. M. Weigel, J. B. Patel, and F. C. Tenover, "Comparison of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Michigan and Pennsylvania.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 49, no. 1, pp. 470–2, Jan. 2005.
- [19] M. A. Khan, M. van der Wal, D. J. Farrell, L. Cossins, A. van Belkum, A. Alaidan, and J. P. Hays, "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.*, vol. 62, no. 2, pp. 279–83, Aug. 2008.

- [20] I. L. B. . Camargo, P. F. Del Peloso, C. F. Da Costa Leite, G. H. Goldman, and A. L. . Darini, "Identification of an unusual VanA element in glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* in Brazil following international transfer of a bone marrow transplant patient," *Can. J. Microbiol.*, vol. 50, no. 9, pp. 767–770, Sep. 2004.
- [21] B. Périchon and P. Courvalin, "Synergism between beta-lactams and glycopeptides against VanA-type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and heterologous expression of the vanA operon.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 50, no. 11, pp. 3622–30, Nov. 2006.
- [22] M. Kawalec, J. Kedzierska, A. Gajda, E. Sadowy, J. Wegrzyn, S. Naser, A. B. Skotnicki, M. Gniadkowski, and W. Hryniewicz, "Hospital outbreak of vancomycin-resistant enterococci caused by a single clone of *Enterococcus raffinosus* and several clones of *Enterococcus faecium*.,," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 13, no. 9, pp. 893–901, Sep. 2007.
- [23] M. A. Khan, J. B. Northwood, R. G. J. Loor, A. T. R. Tholen, E. Riera, M. Falcón, A. van Belkum, M. van Westreenen, and J. P. Hays, "High prevalence of ST-78 infection-associated vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from hospitals in Asunción, Paraguay.,," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 16, no. 6, pp. 624–7, Jun. 2010.
- [24] Y.-C. Hsieh, W.-S. Lee, T.-Y. Ou, and P.-R. Hsueh, "Clonal spread of CC17 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with multilocus sequence type 78 (ST78) and a novel ST444 in Taiwan," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 29, no. 1, pp. 25–30, Sep. 2009.
- [25] K. Sung, S. A. Khan, and M. S. Nawaz, "Genetic diversity of Tn1546-like elements in clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci.,," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 31, no. 6, pp. 549–54, Jun. 2008.
- [26] M. A. Khan, M. Shorman, J. A. Al-Tawfiq, J. Al-Tawfiq, and J. P. Hays, "New type F lineage-related Tn1546 and a vanA/vanB type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from patients in Dammam, Saudi Arabia during 2006-2007.,," *Epidemiol. Infect.*, vol. 141, no. 5, pp. 1109–14, May 2013.
- [27] T. A. Szakacs, L. Kalan, M. J. McConnell, A. Eshaghi, D. Shahinas, A. McGeer, G. D. Wright, D. E. Low, and S. N. Patel, "Outbreak of vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* containing the wild-type vanA gene.,," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 52, no. 5, pp. 1682–6, May 2014.
- [28] L. P. P. da Silva, A. Pitondo-Silva, R. Martinez, and A. L. da Costa Darini, "Genetic features and molecular epidemiology of *Enterococcus faecium* isolated in two university hospitals in Brazil.,," *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 74, no. 3, pp. 267–71, Nov. 2012.
- [29] J. E. S. Shearer, J. Wireman, J. Hostetler, H. Forberger, J. Borman, J. Gill, S. Sanchez, A. Mankin, J. Lamarre, J. A. Lindsay, K. Bayles, A. Nicholson, F. O'Brien, S. O. Jensen, N. Firth, R. A. Skurray, and A. O. Summers, "Major families of multiresistant plasmids from geographically and epidemiologically diverse staphylococci.,," *G3 (Bethesda)*, vol. 1, no. 7, pp. 581–91, Dec. 2011.
- [30] A.-J. Kuo, L.-H. Su, J.-C. Shu, J.-T. Wang, J.-H. Wang, C.-P. Fung, J.-H. Chia, J.-J. Lu, and T.-L. Wu, "National surveillance on vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Taiwan: emergence and widespread of ST414 and a Tn1546-like element with simultaneous insertion of IS1251-like and IS1678.,," *PLoS One*, vol. 9, no. 12, p. e115555, Jan. 2014.
- [31] B. Libisch, "A vancomycin rezisztens enterococcus (VRE) molekuláris vizsgálata és első járványos előfordulása Magyarországon," *Mikrobiológiai Közlevél*, vol. 4, no. 3, pp. 26–33, 2004.