

Linezolid ve Dalbavansinin Vankomisine Dirençli Enterokok Suşlarına Karşı İn Vitro Aktivitesi*

In Vitro Activity of Linezolid and Dalbavancin Against Vancomycin-Resistant Enterococci

Gülseren AKTAŞ¹, Bülent BOZDOĞAN², Şengül DERBENTLİ¹

¹ İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

¹ Istanbul University Faculty of Istanbul Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

² Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

² Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Aydın, Turkey.

* Bu çalışma, "110th Meeting of the American Society of Microbiology (23-27 May, 2010, San Diego, USA)"de poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 17.11.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 10.01.2012

ÖZET

Günümüzde, tüm dünyada çoğul ilaç direncine sahip gram-pozitif bakterilerin etken olduğu enfeksiyonların oranı giderek artmaktadır. Ayrıca, enterokok suşları arasında glikopeptid antibiyotiklere direncin ortaya çıkması ve giderek yayılması, bu bakterilerin etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılacak yeni antimikrobiyallerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir. Oksazolidinon grubu antibiyotik olan linezolid ve bir ikinci kuşak yarı sentetik lipoglikopeptid antibiyotik olan dalbavansin, sıklıkla rastlanan antimikrobiyal maddelere dirençli gram-pozitif patojenlerle gelişen enfeksiyonların tedavisi için başlıca seçenekleri oluşturmaktadır. Bu çalışmanın amacı, linezolid ve dalbavansinin vankomisine dirençli enterokok (VRE) suşlarına karşı in vitro antimikrobiyal aktivitesini belirlemektir. 2006-2007 yılları arasında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi kliniklerinde yatan hastaların rektal sürüntü örneklerinden izole edilmiş toplam 100 VRE suşu, çalışma kapsamına alınmıştır. Tüm suşlar, geleneksel yöntemlerle cins düzeyinde tanımlanmıştır. Mikrodilüsyon yöntemiyle yapılan duyarlılık deneylerinde vankomisinin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır. Linezolid ve dalbavansin duyarlılığının belirlenmesinde de mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır. Kalite kontrolü için her bir deney serisinde, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 referans suşları kullanılmıştır. Linezolidde dirençli suşlarda tür düzeyinde tanımlama, 16S rRNA'nın dizilenmesiyle yapılmış; direnç mekanizmaları ise 23S rRNA'nın dizilenmesiyle araştırılmıştır. İncelenen suşlar için, linezolid ve dalbavansin MİK₅₀, MİK₉₀ ve MİK aralıkları sırasıyla 4, 4, 1-6 $\mu\text{g/ml}$ ve 32, 64, 0.25-128 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuş-

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Gülseren Aktaş, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 212 414 2000, **E-posta (E-mail):** gulserena2001@yahoo.co.uk

tur. Linezolide duyarlılık, orta duyarlılık ve direnç oranları ise, aynı sırayla %32, %66 ve %2 olarak saptanmıştır. Linezolide dirençli iki suş *Enterococcus faecium* olarak tanımlanmış ve sonuçlar Pasteur Enstitüsünde doğrulanmıştır. Bu, Türkiye’de ilk linezolide ve vankomisine dirençli *E.faecium* suşu bildirimidir. Her iki suşun 23S rRNA geninde G2576T mutasyonu saptanmıştır. Dalbavansin için henüz “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)” tarafından bir duyarlılık sınır değeri belirtilmediği için, duyarlılık ve direnç oranları saptanamamıştır. Belirlenen MKK değerlerine göre, linezolid VRE suşlarına karşı en etkili antibiyotik olarak belirlenmiş, dalbavansin ise vankomisinden daha etkili bulunmuştur. Ayrıca, çalışmamızın sonuçları yatan hasta örneklerinden izole edilen VRE suşlarında, linezolid direncinin rutin olarak izlenmesinin gerekliliğini de göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Vankomisine dirençli enterokok; dalbavansin; linezolid; antimikrobiyal direnç; MKK.

ABSTRACT

The incidence of infections caused by multidrug resistant gram-positive bacteria is increasing worldwide. In addition, emergence and dissemination of glycopeptide resistance in enterococci has accelerated the need for the development of new antimicrobial agents for treatment. Linezolid which is an oxazolidinone and dalbavancin which is a second-generation, semi-synthetic lipoglycopeptid are important therapeutic options for infections caused by antimicrobial-resistant gram-positive pathogens. The aim of this study was to investigate the in-vitro antimicrobial activity of linezolid and dalbavancin against vancomycin-resistant enterococci (VRE). A total of 100 VRE strains, isolated from rectal swabs of patients hospitalized in Istanbul University Faculty of Istanbul Medicine between 2006-2007 were included in the study. All strains were identified as *Enterococcus* spp. by conventional methods and had minimum inhibitory concentrations (MICs) of ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ for vancomycin. Vancomycin, linezolid and dalbavancin susceptibility testing was performed by broth microdilution method. For the quality control of the tests, *S.aureus* ATCC 29213 and *E.faecalis* ATCC 29212 were included in each run. Molecular identification of linezolid-resistant strains (n= 2) were done by 16S rRNA sequencing and resistance mechanisms were tested by 23S rRNA sequencing. Against VRE strains, MIC₅₀, MIC₉₀ and MIC ranges of linezolid and dalbavancin were found as 4, 4, 1-16 $\mu\text{g/ml}$ and 32, 64, 0.25-128 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Linezolid susceptibility, intermediate susceptibility and resistance rates were found as 32%, 66% and 2% in the same order. Linezolid-resistant two strains were identified as *E.faecium*, and this data was confirmed by Pasteur Institute. Both of those isolates had G2576T mutations in 23S rRNA genes. Because susceptibility breakpoint for dalbavancin has not been established by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) yet, susceptibility and resistance rates for dalbavancin were not indicated. According to the MIC results, linezolid was found to be the most effective antibiotic against VRE strains, and dalbavancin was found more effective than vancomycin. Additionally, our results showed that routine susceptibility testing of VRE strains isolated from hospitalized patients to linezolid was required.

Key words: Vancomycin-resistant enterococci; dalbavancin; linezolid; antimicrobial resistance; MIC.

GİRİŞ

Gram-pozitif patojen mikroorganizmalarda görülen antimikrobiyal direnç artışı, yeni ajanların araştırılmasını zorunlu hale getirmektedir. Ayrıca, çoklu antibiyotik direnci gösteren gram-pozitif bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonların sıklığı artmış ve bu enfeksiyonların tedavisi oldukça güç hale gelmiştir. Glikopeptid antibiyotikler olan vankomisin ve teikoplanin, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), metisiline dirençli koagülaz-negatif stafilkoklar (MRKNS) ve enterokoklar gibi çoğul dirençli gram-pozitif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan başlıca antibiyotiklerdir. Ancak bu antibi-

yotiklerin etkinliği, glikopeptidlere dirençli suşların ortaya çıkması ve yayılmasıyla azalmaktadır. Bu nedenle, çoğul antimikrobiyal dirençli bakterilerle gelişen enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek yeni antibiyotiklere gereksinim vardır^{1,2}.

Oksazolidinonlar, yeni bir antibiyotik sınıfıdır ve bu sınıfın ilk üyesi olan linezolid, sık rastlanan dirençli gram-pozitif patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlar için önemli bir tedavi seçeneği haline gelmiştir. Oksazolidinon antibiyotikler, bakterinin 50S ribozomal alt ünitesine bağlanır ve protein sentezini engelleyerek etkili olur. Bu etki mekanizmasından dolayı, kullanılmakta olan diğer antibiyotiklerle çapraz direnç görülmez³.

Dalbavansin, ikinci kuşak yarı sentetik lipoglikopeptid antibiyotiktir. Teikoplanin benzeri bir glikopeptidten sentez edilmiştir. Lipofilik yan zinciri, D-Ala-D-Ala hedef molekülünün tanınmasını kolaylaştırır ve bu özellik, MRSA dahil stafilokoklar, enterokoklar ve streptokoklar için minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerini anlamlı şekilde düşürür. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonu etkenlerine güçlü etkinliği vardır. Ancak VanA direncine sahip bakterilere zayıf etkilidir. Etki süresi uzun olduğu için haftada bir kez uygulanır^{4,5}.

Bu çalışma, linezolid ve dalbavansinin, hastanede yatan hastaların rektal sürüntü örneklerinden izole edilen vankomisine dirençli enterokok (VRE) suşlarına karşı aktivitesini araştırmak amacıyla planlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, 2006-2007 yılları arasında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesinin çeşitli kliniklerinde yatan hastaların rektal sürüntü örneklerinden izole edilen 100 VRE suşu dahil edildi.

VRE Suşları İçin Tarama ve Tanımlama

Örnekler, enterokoklar için seçici bir besiyeri olan azid-dekstroz buyyonunda (Merck, Germany) 35°C'de bir gece inkübe edildi. Daha sonra 6 µg/ml vankomisin içeren triptik-soy agar (TSA; Oxoid Ltd, İngiltere) besiyerine ekilerek aynı koşullarda 24-48 saat inkübe edildi⁶. Vankomisin içeren TSA besiyerinde üreyen suşlar, konvansiyonel yöntemlerle cins düzeyinde tanımlandı. Bu amaçla, gram-pozitif ve katalaz reaksiyonu negatif olan kokların, %6.5 NaCl içeren besiyerinde üreme ve %40 safra varlığında eskülini hidrolize etme özellikleri incelendi. Pozitif sonuç veren suşlara PYR (pyrrolidonyl arylamida-se) (BBL, Becton Dickinson, ABD) testi uygulandı⁷. Bu testle pozitif sonuç veren tüm suşlar *Enterococcus* spp. olarak tanımlandı ve disk difüzyon yöntemiyle vankomisin (30 µg) (Oxoid Ltd, İngiltere) direnci araştırıldı.

MİK'lerin Belirlenmesi

Vankomisin (Sigma Chemical, ABD), linezolid (Pfizer Inc, ABD) ve dalbavansinin (Pfizer Inc, ABD) VRE suşları için MİK değerleri "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerileri doğrultusunda mikrodilüsyon yöntemiyle belirlendi⁸. Dalbavansin için %0.002 polisorbat-80 (Tween 80; Merck, Almanya) içeren Mueller-Hinton II broth (BBL™, Becton Dickinson, ABD) kullanıldı⁸. Deneylerde, *S.aureus* ATCC 29213 ve *E.faecalis* ATCC 29212 standart suşları kullanılarak kalite kontrolü yapıldı⁹.

Moleküler Tanımlama

Linezolide dirençli iki VRE suşunun total DNA'ları, Instagen Matrix (BioRad) kiti ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda ekstrakte edildi. 1370 baz çiftlik 16S rRNA geni fragmenti, 16S20 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3' ve 16S1390 5'-GAC GGG CGG TGT GTA CAA-3' universal primerleri kullanılarak çoğaltıldı^{10,11}. Amplifikasyon ürünü daha sonra sekanslama için MacroGen (Güney Kore) firmasına gönderildi ve sonuçlar NCBI (National Center for Biotechnological Information) nükleotid blast programında gen bankasıyla karşılaştırıldı.

Linezolide Direnç Mekanizmalarının Belirlenmesi

Linezolide dirençli iki suшта 23S rRNA üzerinde mutasyon varlığı, 23SF 5' GACGGAAA-GACCCCATGG 3' ve 23SR 5' AACTTAGATGCTTT 3' özgül primerleri kullanılarak araştırıldı¹². Çoğaltılan parça sekans reaksiyonu için MacroGen (Güney Kore) firmasına gönderildi ve sonuçlar nükleotid blast programında analiz edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, denenen antimikrobiyallerin tüm suşlar için belirlenen MİK değerleri Tablo I ve Tablo II'de gösterilmiştir. Buna göre çalışmada yer alan VRE suşları için vankomisin MİK₅₀, MİK₉₀ ve MİK aralık değerleri sırasıyla 512, > 512 ve 32- > 512 µg/ml'dir.

Aynı suşlar için, linezolid MİK₅₀, MİK₉₀ ve MİK aralıkları 4, 4 ve 1-16 µg/ml olarak saptanmış ve duyarlılık, orta duyarlılık ve direnç oranları %32, %66 ve %2 olarak belirlenmiştir. İki VRE suşu linezolide dirençli (%2) bulunmuş; bu bulgular Pasteur Enstitüsü (Ins-

Tablo I. VRE Suşlarına Karşı Antibiyotiklerin İn Vitro Aktivitesi (n= 100)

Antimikrobiyal	MİK (µg/ml)			%		
	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK aralığı	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Vankomisin	512	> 512	32- > 512	-	-	100
Dalbavansin	32	64	0.25-128	.*	.*	.*
Linezolid	4	4	1-16	32	66	2

* CLSI tarafından sınır değeri belirtilmemiştir.

VRE: Vankomisine dirençli enterokok, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu, CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Tablo II. Antibiyotiklerin VRE Suşları İçin MİK Değerlerinin Dağılımı (n= 100)

Antimikrobiyal	Antimikrobiyal konsantrasyonu (µg/ml)												
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	> 512
Vankomisin	-	-	-	-	-	-	-	1	1	6	23	58	11
Dalbavansin	3	-	1	1	3	17	16	31	27	1			
Linezolid	-	-	2	30	66	1 ^a	1 ^b	-	-				

^a MİK= 8 µg/ml.

^b MİK= 12 µg/ml.

VRE: Vankomisine dirençli enterokok, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu.

titute Pasteur, Unite des Agents Antibacteriens, Paris, Fransa) tarafından da doğrulanmış ve linezolid MİK değerleri E-test ile 8 ve 12 µg/ml olarak saptanmıştır. Bu iki suş *E. faecium* olarak tanımlanmış ve her iki suşta G2576T mutasyonu saptanmıştır (Şekil 1).

CLSI tarafından henüz bir duyarlılık sınır değeri açıklanmadığı için dalbavansine duyarlılık oranı belirlenememiştir. Dalbavansin MİK₅₀, MİK₉₀ ve MİK aralıkları ise sırasıyla 32, 64 ve 0.25-128 µg/ml olarak saptanmıştır.

TARTIŞMA

VRE'ler, hastane enfeksiyonu etkenleri arasında üst sıralarda yer almaktadır. Tedavi seçeneklerinin sınırlı olması ve suşların çoğunluğunun var olan diğer antimikrobiyal ajanlara da dirençli olması nedeniyle, VRE enfeksiyonlarının tedavisi giderek zorlaşmaktadır^{13,14}.

Ciddi VRE enfeksiyonları, linezolid ile başarıyla tedavi edilmektedir^{15,16}. Linezolidin VRE suşlarına etkinliğinin araştırıldığı bazı çalışmalarda, MİK₅₀: 1-2, MİK₉₀: 2 ve MİK aralığı: 0.25-> 16 µg/ml; direnç oranları ise %2.8, %2.3 ve %0.6 olarak belirtilmiştir¹⁷⁻²¹. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, MİK₅₀, MİK₉₀ ve MİK aralığı sırasıyla 1.5, 2.0 ve 0.75-4.0 µg/ml olarak bildirilmiştir²². Bu araştırmacılar, vankomisine dirençli suşa rastlanmadığını ve bunun nedeni olarak da bu dönemde linezolidin kullanımda olmadığını ifade etmişlerdir. Bununla beraber aynı çalışmada %5.2 (5/96) orta duyarlı suş saptanmıştır²². Bizim çalışmamızda, bazı suşlar için linezolid MİK değerleri yukarıda belirtilen çalışmalarda belirlenenlerden yüksek bulunmasına karşın, linezolide direnç oranı (%2) benzer bulunmuştur (Tablo I). Çalışmamızda, Türkiye'de ilk kez linezolide ve vankomisine dirençli *E. faecium* suşları tanımlanmıştır. Her iki linezolide dirençli suşta, G2576T mutasyonu saptanmıştır. Değişik çalışmalarda da aynı mutasyonun neden olduğu linezolid dirençleri bildirilmiştir^{12,20,21,23-27}. Linezolid Türkiye'de 2005 yılından beri kullanımda olmasına rağmen, saptanan yüksek MİK değerleri ve linezolid direnci, bu dönemde yatan hastalardan sıklıkla VRE izole edilmesine ve uzun süreli linezolid tedavisine bağlanabilir. Bu nedenle VRE enfeksiyonu ve/veya kolonizasyonunun yaygınlaştığı dönemlerde klinik örneklerden izole edilen suşlar için linezolid MİK'leri izlenmelidir.

<i>E. faecium</i>	CTCCCCAAGAGTCCACATCGACGGGGAGGTTTGGCACTCGATGTCGGCTCGTCCGATC	2533
56	CTCCCCAAGAGTCCACATCGACGGGGAGGTTTGGCACTCGATGTCGGCTCGTCCGATC	442
63	CTCCCCAAGAGTCCACATCGACGGGGAGGTTTGGCACTCGATGTCGGCTCGTCCGATC	435
<i>E. coli</i>	ACCSCCAAGAGTTCATATCGACGGGCGGTGTTGGCACTCGATGTCGGCTCATCACATC	2520

<i>E. faecium</i>	CTGGGGCTGTATCGGTCCTCCAGGGTTGGGCTGTGTCGCCCAITAAAGCGGCAAGCT	2593
56	CTGGGGCTGTATCGGTCCTCCAGGGTTGGGCTGTGTCGCCCAITAAAGCGGCAAGCT	502
63	CTGGGGCTGTATCGGTCCTCCAGGGTTGGGCTGTGTCGCCCAITAAAGCGGCAAGCT	495
<i>E. coli</i>	CTGGGGCTGAGGTAGGTCCCAAGGGTATGGCTGTGTCGCCCAITAAAGGTAGTACCGCT	2580

<i>E. faecium</i>	GGGTTTCAAGACGTCGTGAGACAGTTCCGTCCTTATCCGTCGCGGGCGTTGGAAAATTTAG	2653
56	GGGTTTCAAGACGTCGTGAGACAGTTCCGTCCTTATCCGTCGCGGGCGTTGGAAAATTTAG	562
63	GGGTTTCAAGACGTCGTGAGACAGTTCCGTCCTTATCCGTCGCGGGCGTTGGAAAATTTAG	555
<i>E. coli</i>	GGGTTTAGAAGCTCGTGAAGACAGTTCCGTCCTTATCCGTCGCGGGCGTTGGAAAATTTAG	2640

Şekil 1. Linezolide dirençli iki VRE suşunun (No: 56 ve 63) 23S rRNA gen dizilerinin, *Enterococcus faecium* ve *Escherichia coli* referans dizileri ile karşılaştırmalı sonuçları ve *E.coli* numaralandırmasına göre G2576T mutasyonu.

Yeni bir yarı sentetik lipoglikopeptid antimikrobiyal olan dalbavansin, teikoplaninin analogudur. Stafilokoklar, streptokoklar, enterokoklar ve VanA fenotipi dışındaki VanB, VanC dahil bazı VRE'lere etkilidir^{5,17}. Dalbavansinin VanA ve VanB fenotipindeki VRE suşlarına karşı aktivitesini araştıran çalışmalarda MİK değerleri; MİK₅₀= 0.03-16, MİK₉₀= 0.12-≥ 32 µg/ml ve MİK aralığı: ≤ 0.008- ≥ 32 µg/ml olarak bildirilmiş ve ayrıca bu çalışmalarda dalbavansinin VanA dışındaki VRE suşlarına iyi etkili olduğu rapor edilmiştir^{17-19,28,29}. Çalışmamızda dalbavansin MİK değerleri MİK₅₀= 32 µg/ml, MİK₉₀= 64 µg/ml ve MİK aralığı: 0.25-128 µg/ml olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre dalbavansin, vankomisinden daha etkili bulunmuş ve VRE enfeksiyonlarının tedavisinde vankomisine iyi bir alternatif olabileceği düşünülmüştür.

TEŞEKKÜR

Çalışmada kullanılan linezolid ve dalbavansini sağlayan Pfizer İlaçları Ltd. Şti.'ye ve iki VRE suşundaki linezolid direncini laboratuvarlarında doğrulayan Pasteur Enstitüsüne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Woodford N. Novel agents for the treatment of resistant gram-positive infections. *Expert Opin Investig Drugs* 2003; 12(2): 117-37.
2. Climo MW, Archer GL, Monroe S. Vancomycin-resistant gram-positive pathogens: potential approaches for prevention and control, pp: 169-85. In: Wenzel RP (ed), *Prevention and Control of Nosocomial Infections*, 2003, 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
3. Livermore DM. Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(Suppl 2): ii9-16.
4. Malabarba A, Goldstein BP. Origin, structure, and activity in-vitro and in-vivo of dalbavancin. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55(Suppl 2): ii15-20.
5. Goldstein BP, Draghi DC, Sheehan DJ, Hogan P, Sahm DF. Bactericidal activity and resistance development profiling of dalbavancin. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(4): 1150-4.
6. Teixeira LM, Facklam RR. Enterococcus, pp: 422-33. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds), *Manual of Clinical Microbiology*, 2003, 8th ed. ASM Press, Washington, DC.
7. Ruoff KL. Aerococcus, Abiorophia, and other infrequently isolated aerobic catalase-negative, gram-positive cocci, pp: 34-44. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds), *Manual of Clinical Microbiology*, 2003, 8th ed. ASM Press, Washington, DC.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, Document M7-A7. 2006, CLSI, Wayne, PA.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15th informational supplement, Document M100-S15. 2005, CLSI, Wayne, PA.
10. Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Emde M, Böttger EC. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 1989; 17(19): 7843-53.
11. Zheng D, Alm EW, Stahl DA, Raskin L. Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62(12): 4504-13.
12. Prystowsky J, Siddiqui F, Chosay J, et al. Resistance to linezolid: characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(7): 2154-6.
13. Lodise TP, McKinnon PS, Tam VH, Rybak MJ. Clinical outcomes for patients with bacteremia caused by vancomycin-resistant enterococcus in a level 1 trauma center. *Clin Infect Dis* 2002; 34(7): 922-9.

14. Borgmann S, Schulte B, Wolz C, et al. Discrimination between epidemic and non-epidemic glycopeptide-resistant *E.faecium* in a post-outbreak situation. *J Hosp Infect* 2007; 67(1): 49-55.
15. Babcock HM, Ritchie DJ, Christiansen E, Starlin R, Little R, Stanley S. Successful treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus* endocarditis with oral linezolid. *Clin Infect Dis* 2001; 32(9): 1373-5.
16. Patel R, Rouse MS, Piper KE, Steckelberg JM. Linezolid therapy of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* experimental endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(2): 621-3.
17. Streit JM, Fritsche TR, Sader HS, Jones RN. Worldwide assessment of dalbavancin activity and spectrum against over 6,000 clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 48(2): 137-43.
18. Streit JM, Sader HS, Fritsche TR, Jones RN. Dalbavancin activity against selected populations of antimicrobial-resistant gram-positive pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53(4): 307-10.
19. Gales AC, Sader HS, Jones RN. Antimicrobial activity of dalbavancin tested against gram-positive clinical isolates from Latin American medical centers. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(2): 95-100.
20. Jones RN, Ross JE, Bell JM, et al. Zyvox annual appraisal of potency and spectrum program: linezolid surveillance program results for 2008. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 65(4): 404-13.
21. Farrell DJ, Mende RE, Ross JE, Jones RN. Linezolid surveillance program results for 2008 (LEADER Program for 2008). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 65(4): 392-403.
22. Tunger A, Aydemir S, Uluer S, Cilli F. In vitro activity of linezolid & quinupristin/dalfopristin against gram-positive cocci. *Indian J Med Res* 2004; 120(6): 546-52.
23. Bae HG, Sung H, Kim MN, Lee EJ, Koo Lee S. First report of a linezolid- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain in Korea. *Scand J Infect Dis* 2006; 38(5): 383-6.
24. Krawczyk B, Samet A, Bronk M, Hellmann A, Kur J. Emerging linezolid-resistant, vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from a patient of a haematological unit in Poland. *Pol J Microbiol* 2004; 53(3): 193-6.
25. Scheetz MH, Knechtel SA, Postelnick MJ, Malczynski M, Qi C. Differences in clinical outcomes in patients with vancomycin-resistant enterococci according to linezolid susceptibility. *Pharmacotherapy* 2010; 30(12): 1221-8.
26. Swoboda S, Fritz S, Martignoni ME, et al. Varying linezolid susceptibility of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates during therapy: a case report. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(4): 787-9.
27. Schulte B, Heininger A, Autenrieth IB, Wolz C. Emergence of increasing linezolid-resistance in enterococci in a post-outbreak situation with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Epidemiol Infect* 2008; 136(8): 1131-3.
28. Biedenbach DJ, Bell JM, Sader HS, Turnidge JD, Jones RN. Activities of dalbavancin against a worldwide collection of 81,673 gram-positive bacterial isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(3): 1260-3.
29. Cornaglia G, Rossolini GM. Forthcoming therapeutic perspectives for infections due to multidrug-resistant gram-positive pathogens. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(3): 218-23.