

## **DEDICACE**

**A** ma chère mère, ma raison de vivre, aucun mot ne pourra suffire pour témoigner toute ma reconnaissance et l'amour que j'ai pour toi. Merci pour tout ce que tu as fait car je te dois tout. Je te remercie pour tout le soutien et l'amour que tu me portes depuis mon enfance et j'espère que ta bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de tes vœux tant formulés, le fruit de tes incomparables sacrifices, bien que je ne t'en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, t'accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne te déçoie.

**A** mon cher père, de tous les pères, tu es le meilleur, tu as toujours été d'un soutien à toute épreuve. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de ton support. Tu as été et tu seras toujours un exemple pour moi par tes qualités humaines, ta persévérance et perfectionnisme. En témoignage de brut d'années de sacrifices, de sollicitudes, d'encouragement et de prières. Pourriez vous trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et tous de vos efforts. En ce jour, J'espère que mon parcours te rend fier de moi. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects, ma reconnaissance et mon profond amour. Puisse Dieu te préserver et te procurer santé, longue vie et bonheur.

**A** mes sœurs et mon frère, Hind, la prunelle de mes yeux, la douce au cœur si grand, Si Mohamed mon frère que j'adore, et Kaoutar que j'aime profondément. Ce travail n'aura jamais pu voir le jour sans votre soutien illimité, merci pour vos encouragements, vous m'avez donné le nécessaire pour que je puisse arriver à ce que je suis aujourd'hui. Je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

**A** ma tante Fatima, qui compte énormément pour moi, et pour qui je porte beaucoup de tendresse et de respect, je te dédie ce modeste travail. Ce n'est qu'un petit geste devant tous tes grands sacrifices et ton support aux moments difficiles. Merci d'être une deuxième maman pour moi. Puisse Dieu te garder, éclairer ta route et t'aider à réaliser tes vœux les plus chers.

**A** mes chers petits neveux et nièce Nassim et Nada, votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur.

**A** ma meilleure amie Ilham, qui m'a assisté dans les moments difficiles et m'a pris doucement par la main pour traverser ensemble des épreuves pénibles. Je te suis très reconnaissante, et je ne te remercierai jamais assez pour ton amabilité, ta générosité, ton aide précieuse.

---

**LISTE DES ABREVIATIONS**


---

<i>Abréviation</i>	<i>Désignation</i>
Ace	: adhésine du collagène d' <i>E. faecalis</i>
Acm	: adhésine du collagène d' <i>E. faecium</i>
ADN	: acide désoxyribonucléique
AFSSA	: agence française de sécurité sanitaire des aliments
AG	: aminosides
ALT	: l'acide lipotéichoïque
AME	: aminoglycoside modifying enzyme
ARNr	: acide ribonucléique ribosomique
BEA	: bile esculine azide
<i>bee</i>	: biofilm enhancer in <i>Enterococcus</i>
BGN	: bactérie Gram –
BHI	: brain heart infusion (bouillon cœur-cervelle)
BLSE	: $\beta$ -Lactamase à Spectre Etendu
BMR	: bactérie multi-résistantes
CASEM	: comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie
CC17	: clonal complex 17
CFU	: unité formant colonie
C <sub>3</sub> G	: céphalosporines de troisième génération
CMEs	: composantes de la matrice extracellulaire
CMI	: concentration minimal inhibitrice
Cps (C ou K)	: capsular polysaccharide production (C ou K)
Cyl	: cytolysine
D-ala-Dala	: D-alanyl- D-alanyl

---

D-ala-D-lac	: D-alanyl-D-lactate
D-ala-D –ser	: D-alanyl-D-serine
dNTP	: deoxyribonucléoside triphosphate
E	: erythromycine
EARSS	: european antimicrobial resistance surveillance system
<i>ebp</i>	: endocarditis and biofilm associated pili
<i>E.faecalis</i>	: <i>Enterococcus faecalis</i> (Espfs)
<i>E. faecium</i>	: <i>Enterococcus faecium</i> (Espfm)
<i>epa</i>	: enterococcal polysaccharide antigen
ERV	: entérocoques résistants à la vancomycine
ERG	: entérocoques résistants aux glycopeptides
EUCAST	: european committee on antimicrobial susceptibility testing
<i>fsr</i>	: faecal <i>streptococci</i> regulator
GBAP	: gelatinase biosynthesis-activating pheromone
<i>gelE</i>	: gélatinase E
GEN	: gentamicine
GGP	: groupe de gènes pilines
GISA	: glycopeptide intermediate <i>S. aureus</i>
GlcNAc	: $\beta$ -N-acétylglucosamine
<i>hyl</i>	: hyaluronidase
KAN	: kanamycine
Kb	: kilobase
L	: Lincomycine
LPS	: lipopolysaccharide
M-H	: muller hinton

---

MLST	: multilocus sequence typing
MSCRAMMs	: microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules
MurNAc	: acide N-acétylmuramique
PCR	: polymerase chain reaction
PFGE	: pulsed-field gel electrophoresis
PLPs	: protéines liant les pénicillines
PSDP	: <i>S. pneumoniae</i> de sensibilité diminuée à la pénicilline
RA	: rifampicine
RGD	: arginyl-glycyl-aspartic acid
SA	: substance agrégative
SARM	: <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
SASM	: <i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méthicilline
Scm	: seconde adhésine du collagène d' <i>E. faecium</i>
SCN	: staphylocoques à coagulase négative
SprE	: sérine protéase E
TBE	: tris borate éthylène diamine tétra-acétique
TE	: tétracycline
TEC	: teicoplanine
UDP	: uridine diphosphate
USI	: unités de soins intensifs
VA	: vancomycine
VanR	: résistant à la vancomycine
VanS	: sensible à la vancomycine
VISA	: vancomycin intermediate <i>S. aureus</i>
VRSA	: vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>

# LISTE DES FIGURES

<i>Figure</i>	<i>Titre</i>	<i>Pages</i>
<b>Figure 1</b>	Arbre phylogénique du genre <i>Enterococcus</i> reposant sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S.....	5
<b>Figure 2</b>	Vue d'ensemble des protéines de surface LPXTG et des pili des entérocoques .....	6
<b>Figure 3</b>	Organisation structurelle de la substance agrégative des entérocoques.....	13
<b>Figure 4a</b>	Modèle d'auto-induction de la cytolysine par synergie avec la substance agrégative et autres adhésines.....	15
<b>Figure 4b</b>	Modèle de maturation et de régulation de la cytolysine.....	15
<b>Figure 5</b>	Mécanisme d'activation du système de régulation <i>fsr</i> et ses effets sur la synthèse de la gélatinase et de la sérine protéase.....	21
<b>Figure 6</b>	Schéma des parois des bactéries A : à Gram -, B : à Gram +.....	29
<b>Figure 7</b>	Principales étapes de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne.....	31
<b>Figure 8</b>	Cible d'action des glycopeptides.....	33
<b>Figure 9</b>	Structure du complexe glycopeptide / dipeptide DAla-DAla.....	34
<b>Figure 10</b>	Structure des glycopeptides, et des nouveaux lipoglycopeptides.....	37
<b>Figure 11</b>	Répartition en clones de 855 souches d' <i>E. faecium</i> sur la base des profils alléliques obtenus par MultiLocus Sequence Typing; selon l'algorithme eBURST.....	40
<b>Figure 12</b>	Proportion de résistance à la vancomycine chez les entérocoques aux Etats Unis de 1989 à 2003.....	41
<b>Figure 13</b>	<i>Enterococcus faecium</i> : fréquence de la résistance à la vancomycine (A) et de la résistance de haut niveau aux aminosides (B) en Europe en 2005.....	42
<b>Figure 14</b>	Nombre de signalements d'isolement des entérocoques résistants aux glycopeptides en France, entre 2001 et 2006.....	43

<b>Figure 15</b> : Répartition des différents clones d'entérocoques résistants aux glycopeptides, en France, 2005-2006.....	44
<b>Figure 16</b> : Interaction entre la vancomycine et les précurseurs du peptidoglycane chez les bactéries sensibles aux glycopeptides .....	46
<b>Figure 17</b> : Représentation schématique de la synthèse des précurseurs pentadepsipeptidiques chez une souche d' <i>Enterococcus faecium vanA</i> et les niveaux d'action de VanA et VanH.....	47
<b>Figure 18</b> : Représentation schématique de la synthèse des précurseurs pentapeptidiques normaux chez une souche d' <i>Enterococcus faecium vanA</i> . Niveaux d'action de VanX et VanY.....	48
<b>Figure 19</b> : Résistances de type VanC, VanA, VanB et VanD chez les entérocoques.....	49
<b>Figure 20</b> : Système de régulation à deux composantes VanR/S chez les entérocoques résistants aux glycopeptides.....	51
<b>Figure 21</b> : Régulation positive et négative de la phosphorylation de l'activateur de transcription VanR, par le récepteur VanS chez les entérocoques résistants aux glycopeptides.....	51
<b>Figure 22</b> : Images obtenues par microscopie électronique de la souche Mu50 montrant la variation de l'épaisseur de la paroi en fonction de la composition du milieu.....	59
<b>Figure 23</b> : Valeurs de CMI 90 obtenues pour les différents antibiotiques testés, pour les isolats cliniques d' <i>E. faecium vanA</i> isolés en Corée du sud en 1998 et 2005.....	65
<b>Figure 24</b> : Lecture des résultats de l'identification biochimique des entérocoques par la galerie Api 20 STREP.....	72
<b>Figure 25</b> : Aspect des colonies d'entérocoques sur milieu sélectif bile esculine azide.....	91
<b>Figure 26</b> : Vu microscopique d'entérocoques.....	91
<b>Figure 27</b> : Répartition des entérocoques dans l'ensemble des prélèvements des selles de la population étudiée.....	92
<b>Figure 28</b> : Résultat de l'identification biochimique des entérocoques par la galerie API 20 Strep.....	93

<b>Figure 29 :</b> Fréquence des <i>Enterococcus</i> résistants à la vancomycine isolés du portage intestinal dans la ville de Casablanca.....	95
<b>Figure 30:</b> Fréquence de résistance des souches d'entérocoques vis-à-vis des antibiotiques.....	97
<b>Figure 31 :</b> Profil de résistance des souches <i>E.faecalis</i> et <i>E.faecium</i> aux antibiotiques.....	98
<b>Figure 32 :</b> E-test de la vancomycine et de la téicoplanine sur le milieu Mueller-Hinton.....	100
<b>Figure 33 :</b> Détection par PCR des gènes de résistance <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>vanC</i> et des gènes spécifiques de l'espèce <i>ddl E.faecalis</i> et <i>ddl E.faecim</i> .....	101
<b>Figure 34 :</b> Séparation par électrophorèse en gel d'agarose des produits de la PCR pour la recherche du gène de l'ARNr 16S.....	102
<b>Figure 35 :</b> Génotypage par séquençage d'une portion du gène de l'ARNr 16S de la souche 5I, en utilisant séparément les amorces sens 008F et anti-sens 1390R par le logiciel Chromas Pro.....	103
<b>Figure 36:</b> Arbre phylogénétique d' <i>E. faecium</i> reposant sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S.....	104
<b>Figure 37 :</b> Arbre phylogénétique d' <i>E. faecalis</i> reposant sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S.....	105
<b>Figure 38 :</b> Cinétique de formation de biofilm chez <i>E.faecium</i> au cours de 24h.....	106
<b>Figure 39:</b> Intensité de formation de biofilm en fonction du temps chez <i>E.faecium</i> .....	107
<b>Figure 40 :</b> Différence de formation de biofilm chez <i>E. faecium</i> sensibles et résistants à la vancomycine.....	108
<b>Figure 41 :</b> Comparaison de l'intensité de formation de biofilm chez les souches d' <i>E.faecium</i> sensibles et résistantes à la vancomycine.....	109
<b>Figure 42 :</b> Gel de migration pour la recherche des gènes de virulence <i>hyl</i> , <i>asa1</i> , <i>gelE</i> , <i>cylA</i> et <i>esp</i> par PCR chez <i>E.faecium</i> .....	111
<b>Figure 43 :</b> Cinétique de formation de biofilm chez <i>E.feacalis</i> au cours de 24h.....	114

<b>Figure 44 :</b> Intensité de formation de biofilm en fonction de temps chez <i>E.faecalis</i> .....	115
<b>Figure 45 :</b> Différence de formation de biofilm chez <i>E. faecalis</i> sensibles et résistants à la vancomycine .....	116
<b>Figure 46 :</b> Comparaison de l'intensité de formation de biofilm chez les souches d' <i>E.faecialis</i> sensibles et résistantes à la vancomycine.....	117
<b>Figure 47 :</b> Gel de migration pour la recherche des gènes de virulences virulence <i>hyl</i> , <i>asa1</i> , <i>gelE</i> , <i>cylA</i> et <i>esp</i> par PCR chez <i>E.faecalis</i> .....	119
<b>Figure 48 :</b> dendrogrammes des souches d'entérocoques résistantes à la vancomycine, réalisés par la méthode Unweight Pair Group Method with arithmetic mean, après électrophorèse en champ pulsé.....	122

---

**LISTE DES TABLEAUX**


---

<i>Tableau</i>	<i>Titre</i>	<i>Pages</i>
<b>Tableau 1</b>	Bactériocines produites par <i>Enterococcus</i> spp. ....	18
<b>Tableau 2</b>	Comparaison des activités antibactériennes (CMI) des lipoglycopeptides synthétiques avec la vancomycine.....	37
<b>Tableau 3</b>	Caractéristiques des résistances aux glycopeptides chez les entérocoques.....	55
<b>Tableau 4</b>	Charges des disques et les diamètres critiques des 8 antibiotiques testés.....	74
<b>Tableau 5</b>	Mélange réactionnel de la PCR pour chercher les gènes <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>vanC</i> , <i>ddl E. faecalis</i> et <i>ddl E. faecium</i> .....	79
<b>Tableau 6</b>	Souches contrôles utilisées pour détecter la présence des gènes <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>vanC</i> , <i>ddl E. faecalis</i> et <i>ddl E. faecium</i> .....	79
<b>Tableau 7</b>	Couples d'amorces utilisées pour l'amplification simultanée des gènes <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>vanC</i> , <i>ddl E. faecalis</i> et <i>ddl E. faecium</i> .....	80
<b>Tableau 8</b>	Programme d'amplification des gènes <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>vanC</i> , <i>ddl E. faecalis</i> et <i>ddl E. faecium</i> .....	80
<b>Tableau 9</b>	Mélange réactionnel de la PCR séquençage du gène de l'ARNr 16S.....	81
<b>Tableau 10</b>	Conditions de la PCR et séquençage du gène de l'ARNr 16S et les amorces utilisés...	82
<b>Tableau 11</b>	Mélange réactionnel pour la détection des gènes de virulence <i>asa1</i> , <i>gelE</i> , <i>cylA</i> , <i>hyl</i> et <i>esp</i> par PCR.....	85
<b>Tableau 12</b>	Amorces utilisées pour la détection de quelques gènes de virulences par PCR.....	86
<b>Tableau 13</b>	Programme de la réaction PCR utilisé pour la recherche des facteurs de virulence de virulences <i>asa1</i> , <i>gelE</i> , <i>cylA</i> , <i>hyl</i> et <i>esp</i> .....	86
<b>Tableau 14</b>	Répartition des souches entérocoques de la population étudiée selon le sexe.....	93
<b>Tableau 15</b>	Répartition des souches entérocoques de la population étudiée selon l'âge.....	94
<b>Tableau 16</b>	Répartition des souches entérocoques selon le niveau socio-économique des zones résidentielles de la population étudiée .....	94
<b>Tableau 17</b>	Profils de résistance d' <i>E. faecium</i> et d' <i>E. faecalis</i> isolés à partir d'échantillons fécales humains en milieu communautaire à Casablanca, Maroc.....	96
<b>Tableau 18</b>	CMI de la vancomycine et la téicoplanine chez les ERV.....	96
<b>Tableau 19</b>	Classification de l'intensité de formation de biofilm en fonction du temps d'incubation chez <i>E. faecium</i> .....	107

---

<b>Tableau 20:</b> Etude de l'antibiorésistance chez les souches d' <i>E. faecium</i> sensibles et résistantes à la vancomycine.....	110
<b>Tableau 21 :</b> Fréquence des gènes de virulence chez <i>E. faecium</i> .....	112
<b>Tableau 22:</b> Profils de résistance et gènes de virulence d' <i>E. faecium</i> résistants à la vancomycine.....	113
<b>Tableau 23 :</b> Classification de l'intensité de formation de biofilm en fonction du temps d'incubation chez <i>E. faecalis</i> .....	115
<b>Tableau 24:</b> Etude de l'antibiorésistance chez les souches d' <i>E. faecalis</i> sensibles et résistantes à la vancomycine.....	118
<b>Tableau 25:</b> Le pourcentage des gènes de virulences chez <i>E. faecalis</i> .....	120
<b>Tableau 26:</b> Profil de résistance et gènes de virulence d' <i>E. faecalis</i> résistants à la vancomycine...	121

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été initié au laboratoire de bactériologie médicale du centre de biologie médicale de l'Institut Pasteur du Maroc (IPM), puis achevé au niveau du laboratoire de bactériologie moléculaire du même institut.

Il a été réalisé

sous la codirection du :

**Dr. Mohamed El Azhari,**

Responsable du laboratoire de la bactériologie médicale de l'IPM,

et la direction du :

**Pr. Ahmed Ait Chaoui,**

Professeur d'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences et Techniques

Béni Mellal.

Que je tiens à les remercier pour les moyens matériels mis à ma disposition tout au long de la préparation de ce travail.



**Institut Pasteur  
du Maroc**

J'exprime mes sincères remerciements à Me le **Pr. Said Méliani**, Doyen de la Faculté des Sciences et des Sciences et Techniques de Béni Mellal, pour son soutien inconditionnel aux chercheurs. Qu'il veuille trouver ici, l'expression de mon grand respect.

Je remercie également le Professeur Mr le **Dr. Abderrahman El Maâroufi**, Directeur de l'Institut Pasteur du Maroc, pour tous les moyens qu'il a mis à ma disposition afin de réaliser ce travail. Qu'il trouve ici, l'expression de ma gratitude, mes vives reconnaissances et mon profond respect.

Je tiens à remercier Mr le **Pr. Ahmed Ait Chaoui**, de la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal, directeur de cette thèse, pour ses encouragements, ses conseils et ses discussions toujours fructueuses et son soutien inconditionnel durant toute la période de cette thèse. Sans lui, mes travaux de recherches n'auraient pas vu le jour. Je ne sais comment exprimer ma gratitude autrement qu'en lui promettant d'agir comme lui avec mes étudiants, si un jour l'occasion m'en est donnée. Veuillez agréer, cher maître, l'expression de ma vive reconnaissance, mon profond respect et ma respectueuse considération.

Je suis très reconnaissante à Mr le **Dr. Mohamed El Azhari**, encadrant externe de cette thèse et responsable du laboratoire de la bactériologie médicale de l'IPM, pour m'avoir fait confiance malgré les connaissances plutôt légères que j'avais en 2013 sur la résistance des entérocoques aux antibiotiques, puis pour m'avoir encadrée, guidée, encouragée et conseillée tout au long de cette thèse, tout en me laissant une grande liberté de travail de recherche. Je ne sais comment le remercier pour l'hospitalité dont il a fait preuve envers moi lors des années de préparations de ma thèse. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude.

J'exprime mes sincères remerciements à Mr le **Dr. Mohammed Timinouni**, Directeur du centre de recherche à l'IPM, pour m'avoir fait partager votre grande rigueur intellectuelle, votre expertise scientifique et surtout votre gentillesse sans limite. Veuillez accepter, mes sincères remerciements de même que le témoignage de mon profond respect.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme le **Pr. Fatiha Chigr**, de la Faculté des Sciences et des Sciences et Techniques de Béni Mellal, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de ce doctorat. C'est pour moi un immense honneur de vous avoir dans mon jury pour juger mon travail. Veuillez trouver dans ce travail, l'expression de ma gratitude et de mon grande estime.

Et je suis très reconnaissante à Mr le **Pr. Ahmed Gamouh**, de la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal, à Mr le **Pr. Mohamed Najimi**, de la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal, et à Mr le **Dr. Hassan Ghazal**, du Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique de Rabat, de vous avoir comme rapporteurs dans mon jury de thèse. Les commentaires et les questions de ces personnalités scientifiques, tant sur la forme du mémoire que sur son fond, vont contribuer à améliorer de manière significative mon document. Veuillez accepter, mes sincères remerciements de même que le témoignage de mon profond respect.

Une autre fois, je tiens à remercier ma profonde gratitude à Mr le **Pr. Ahmed Ait chaoui** et Mr le **Dr. Mohamed El Azhari**, les examinateurs de cette thèse. J'ai eu le plus grand plaisir à travailler sous votre direction. Vous vous y êtes grandement impliqués par vos directives, vos remarques et suggestions, mais aussi par vos encouragements dans les moments clés. Vos compétences, vos qualités humaines et votre simplicité ont toujours suscité une grande admiration. Veuillez accepter, mes sincères remerciements de même que le témoignage de mon profond respect.

Mes remerciements vont à Mr le **Pr. Abouddihaj Barguigua**, Mme le **Dr. Kaoutar Nayme** et Mme le **Dr. Fatna Bourjilat**. La présente thèse n'aurait pas été complète sans leur étroit soutien, leur aide et leurs services inconditionnels.

Merci à tous les étudiants et les chercheurs avec qui j'ai partagé une discussion scientifique durant toutes ces dernières années et à toute personne, qui a contribué de loin ou de près, à la réalisation de cette thèse.

## Résumé

Les entérocoques peuvent être responsables de diverses maladies graves chez l'Homme. Ces bactéries sont dangereuses du fait de leurs résistances naturelles à de nombreuses familles d'antibiotiques, aggravée ces dernières années par l'émergence, dans le monde, de souches résistantes aux glycopeptides. Notre travail vise à rechercher l'existence au Maroc de souches résistantes vis-à-vis des antibiotiques.

Ce travail a porté sur 156 échantillons de selles collectés en 2014 dans la communauté marocaine du grand Casablanca. L'identification biochimique des entérocoques est réalisée par la galerie Api 20 strep et complétée par la caractérisation génotypique grâce à la recherche des gènes spécifiques aux espèces *E. faecalis* et *E. faecium* et au séquençage du gène qui code pour l'ARN 16S. L'étude phénotypique de la résistance des entérocoques à huit antibiotiques est effectuée par la méthode de l'antibiogramme. Aussi, les gènes *van*, responsables de la résistance à la vancomycine, ont été recherchés par PCR multiplex. En outre, nous avons déterminé les espèces les plus virulentes en termes de production de biofilm, par l'étude de l'adhérence de nos isolats à la surface du polystyrène, et en termes de possession des gènes de virulences recherchés par PCR. La clonalité des EVR a été étudiée par la méthode du champ pulsé, et l'évaluation des liens de parentés qui relient l'ensemble de nos isolats d'entérocoques a été réalisée par la lecture de l'arbre phylogénétique.

Les résultats montrent que la colonisation par les entérocoques concerne 70.8% des échantillons de selle de la population étudiée. Nous avons isolé 100 souches d'Entérocoques, parmi lesquelles, 45% souches sont identifiés *E. faecalis* et 55% souches identifiées *E. faecium*. Ces dernières étaient plus résistantes comparativement à *E. faecalis*. Les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques ont révélé que 88% de nos souches sont multirésistantes. La fréquence d'isolement des VRE était de 21%. Les taux de résistances aux antibiotiques testés étaient de 89% pour la lincomycine et l'érythromycine ; 79% pour la tétracycline ; 64% pour la rifampicine ; 23% pour la teicoplanine ; 15% pour la kanamycine et 2% pour la gentamycine. L'analyse par PCR a révélé que toutes les souches étaient résistantes à la vancomycine par possession du gène *vanA*.

L'étude de l'adhérence des entérocoques souligne que la totalité de nos isolats ont la capacité de produire le biofilm. L'étude de l'intensité de formation de ce dernier, montre que la majorité des souches ont formé un biofilm de haute intensité au cours des premières heures avec un maximum de formation à 22 heures d'incubation. *gelE* et *asa1* sont les gènes les plus fréquemment détectés chez *E. faecalis*. Chez *E. faecium*, *esp* et *hyl* étaient les seuls facteurs de virulences retrouvés. Les souches étudiées ne sont pas liées génétiquement et les isolats d'entérocoques résistants à la vancomycine ont présenté des profils de pulsotypes différents avec un haut degré de polymorphisme.

L'isolement et la caractérisation des souches d'entérocoques résistantes à la vancomycine circulantes dans la communauté est nécessaire pour une meilleure prise en charge thérapeutique des infections causées par cette bactérie et pour élaborer une stratégie afin de contrôler la dissémination de cette résistance dans la communauté marocaine et dans les établissements de santé.

**Mots clés :** portage intestinal humain, entérocoques, résistances aux antibiotiques, vancomycine, teicoplanine, gènes de résistance, gènes de virulence, biofilm, clonalité.

## Abstract

Enterococci can be responsible for many serious diseases in Human. These bacteria are dangerous because of their natural resistance to many families of antibiotics, aggravated in recent years by the emergence, worldwide, of strains resistant to glycopeptides. Our work aims to research the existence in Morocco of strains resistant to antibiotics.

In 2014, 156 stool samples were collected in Moroccan community of Casablanca. The biochemical identification of enterococci is realized by the Api 20 strep gallery, and completed by genotypic characterization through the search for genes specific to the species *E. faecalis* and *E. faecium*, and the sequencing of the gene which codes for 16S RNA. Phenotypically, we had studied the resistance of enterococci to eight antibiotics by the antibiogram method and we had searched for the *van* genes encoding for resistance to vancomycin by multiplex PCR. In addition, we had determined the most virulent species in terms of biofilm production, by studying the adhesion of our isolates to the polystyrene surface, and in terms of possession of the virulence genes searched by PCR. The clonality of EVR was studied by the pulsed field method, and the evaluation of the family ties which connect all of our enterococcal isolates was made by reading the phylogenetic tree.

The results show that colonization by enterococci concerns 70.8% of the stool samples of the population studied. We had isolated 100 strains of enterococci, of which 45% are identified as *E. faecalis* and 55% are identified as *E. faecium*. They were more resistant compared to *E. faecalis*. The results of antibiotic sensitivity tests revealed that 88% of our strains are multidrug resistant. The frequency of isolation of ERV was 21%. The rates of resistance to the antibiotics tested were 89% for lincomycin and erythromycin; 79% for tetracycline; 64% for rifampicin; 23% for teicoplanin; 15% for kanamycin and 2% for gentamycin. PCR analysis revealed that all strains were resistant to vancomycin by possession of *vanA* gene.

The study of the adhesion of enterococci shows that all of our isolates have the capacity to produce biofilm. The study of biofilm intensity shows that the majority of the strains formed a high intensity biofilm during the first hours with a maximum of formation at 22 hours of incubation. *gelE* and *asaI* are the most frequently detected genes in *E. faecalis*. In *E. faecium*, *esp* and *hyl* were the only virulence factors found. The strains studied are not genetically linked, and vancomycin-resistant enterococcal isolates had revealed different pulsotype profiles with a high degree of polymorphism.

The isolation and characterization of strains of vancomycin-resistant enterococci circulating in the community are necessary for better therapeutic management of infections caused by this bacterium and to develop a strategy to control the spread of this resistance in the Moroccan community and in health establishments.

**Key words:** human intestinal carriage, enterococci, antibiotic resistance, vancomycin, teicoplanin, resistance genes, virulence genes, biofilm and clonality.

## TABLE DE MATIERE

<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
<b>1<sup>ère</sup> partie : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>3</b>
<b>I. Généralités sur les entérocoques</b> .....	<b>3</b>
<b>II. Taxonomie</b> .....	<b>4</b>
II.1. Historique.....	4
II.2. Classification.....	4
<b>III. Caractéristiques microbiologiques expliquant la virulence des entérocoques</b> .....	<b>5</b>
III.1 Facteurs de virulence.....	5
III.1.1 Facteurs liés à la membrane.....	6
III.1.1.1 Protéines de liaison au collagène.....	7
III.1.1.2 Protéines de surface extracellulaire.....	8
III.1.1.3 Acide lipotéichoïque.....	11
III.1.1.4 Substance agrégative.....	12
III.1.2 Facteurs sécrétés.....	14
III.1.2.1 Cytolysine.....	14
III.1.2.2 Bactériocines.....	17
III.1.2.3 Hyaluronidases, gélatinase et sérine protéase.....	19
III.1.2.4 Production de superoxide extracellulaire.....	22
III.1.3 Capsule et paroi cellulaire polysaccharidique.....	23
III.1.4 Biofilm.....	24
III.2 Transfert de gènes de virulence et de résistance.....	25
<b>IV. Pouvoir pathogène des entérocoques</b> .....	<b>26</b>
<b>V. Glycopeptides et Résistance des Entérocoques</b> .....	<b>28</b>
V.1 Rappels sur la synthèse du peptidoglycane.....	28
V.1.1 Les différents types de paroi.....	28
V.1.2. Rappels sur la synthèse du peptidoglycane.....	30
V.2 Les glycopeptides et les nouveaux dérivés.....	31
V.2.1 Les glycopeptides : mécanisme d'action, spectre et caractéristiques.....	31
V.2.2 Les nouveaux lipoglycopeptides : oritavancine, dalbavancine, télavancine.....	35
V.3 Entérocoques et antibiotiques : des bactéries naturellement.....	38
V.4. Epidémiologie de la résistance.....	39
V.5 Mécanismes de la résistance chez les entérocoques.....	44
V.5.1 Gènes <i>van</i> chez les entérocoques.....	44
V.5.2 Gènes <i>van</i> chez les staphylocoques : l'inquiétude.....	56
V.6 Autres mécanismes de résistance aux glycopeptides.....	58
V.7 Gestion des épidémies à ERG.....	60
V.7.1 Origine des souches d'ERG et des épidémies.....	60
V.7.2 Facteurs de risque d'acquisition d'ERG.....	62
V.7.3 Effets délétères pour les patients .....	63
V.8 Traitement des infections à ERG.....	64
<b>VI. Recommandations pour gérer une épidémie aux ERG</b> .....	<b>66</b>

<b>2<sup>ème</sup> partie : MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>69</b>
1 Echantillonnage.....	69
2 Identification bactérienne.....	69
2.1 Caractères morphologiques.....	69
2.2 Recherche de catalase.....	70
2.3 Tests confirmatifs.....	70
2.4 Identification biochimique.....	71
3 Antibiogramme.....	72
3.1 Modalités de réalisation de l'antibiogramme.....	73
3.2 Lecture de l'antibiogramme.....	73
4 Caractérisation moléculaire des gènes de résistance à la vancomycine et des gènes spécifiques d'entérocoques.....	74
4.1 Méthodes d'étude de la sensibilité à la vancomycine par E-test.....	75
a) Définition de la CMI.....	75
b) Principe de la méthode E-test.....	75
c) Inoculation et lecture.....	75
4.2 Modalités de réalisation de la PCR.....	76
a) Extraction d'ADN bactérien.....	76
b) Détection de la présence des gènes de résistance à la vancomycine et des gènes spécifiques d'entérocoques.....	77
c) Principe de la PCR Multiplex.....	77
d) Interprétation des résultats et contrôle de qualité .....	78
e) Mélange réactionnel de la PCR multiplex.....	79
f) Electrophorèse des produits de la réaction PCR.....	81
5 Amplification et séquençage du gène de l'ARN 16S.....	81
5.1 Amplification du gène de l'ARN 16 S.....	81
a) Mélange réactionnel de la PCR.....	81
b) Electrophorèse sur gel d'agarose.....	82
5.2 Séquençage du gène de l'ARN 16S.....	82
a) Principe du séquençage.....	82
b) Protocole de séquençage du gène l'ARN16S.....	84
6 Etude de la virulence des entérocoques.....	84
6.1 Formation de biofilm.....	84
6.2 Recherche des gènes de virulence.....	85
7. Champ pulse (PFGE) .....	87
7.1 Principe du PFGE.....	87
7.2 Protocole du PFGE.....	88
7.3 Comparaison des profils électrophorétiques et interprétation.....	89
<b>3<sup>ème</sup> partie : RESULTATS.....</b>	<b>91</b>
<b>4<sup>ème</sup> partie : DISCUSSION.....</b>	<b>123</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>138</b>
<b>Perspectives.....</b>	<b>139</b>

---

## INTRODUCTION GENERALE

La découverte des antibiotiques a complètement révolutionné l'histoire des pathologies infectieuses et depuis, les phénomènes de résistance n'ont cessé de s'accroître. Les glycopeptides qui étaient considérés comme alternative dans certains échecs thérapeutiques dans le traitement des infections dues aux bactéries à Gram positif sont actuellement confrontés à des problèmes de résistance notamment chez les entérocoques.

Longtemps considérées comme des bactéries commensales du tube digestif de l'homme, les entérocoques peuvent être à l'origine de différentes infections, en particulier des bactériémies, des endocardites, des infections urinaires et des infections abdominales et pelviennes, surtout chez une fraction sensible de la population comme les immunodéprimés, les diabétiques, les nourrissons, les personnes âgées et les patients des centres de soins intensifs.

Quelle que soit la zone géographique considérée, le genre *Enterococcus* reste l'une des causes majeures d'infections nosocomiales. Il occupe la troisième position derrière *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) et *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) sont les genres responsables de la quasi-totalité des infections à entérocoques chez l'homme.

Plusieurs facteurs de virulence ont été associés aux infections à entérocoques. Ceux-ci incluent principalement les gènes *as* (substance d'agrégation), *cyl* (cytolisine), *esp* (protéine entérocoque de surface), *hyl* (hyaluronidase), et *gelE* (gélatinase). Les gènes *gelE* et *esp* ont démontré une capacité à promouvoir la formation de biofilm chez *E. faecalis* et *E. faecium*, ce qui permet de coloniser des surfaces, de se protéger de l'action des substances antimicrobiennes et de médier l'adhésion et l'invasion aux cellules hôtes.

Ces bactéries sont dangereuses du fait de leur multirésistance naturelle à de nombreuses familles d'antibiotiques, aggravée ces dernières années par l'émergence de souches résistantes aux glycopeptides. Le problème majeur concerne les entérocoques résistants à la vancomycine (VRE : Vancomycin Resistant Enterococci).

L'utilisation des antibiotiques comme moyen thérapeutique contre les infections bactériennes a permis une avancée considérable de la médecine. Cependant, malgré les efforts continus visant à contrôler les agents pathogènes, les bactéries adaptent de plus en plus des phénomènes de résistance aux antibiotiques notamment en raison de la pression de sélection

exercée par l'utilisation massive et parfois inadéquate des antibiotiques, ce qui conduit à l'échec thérapeutique.

La résistance croissante des bactéries aux antibiotiques est une réalité qui inquiète le monde entier. La capacité d'évolution de la résistance des entérocoques se caractérise par leurs phénotypes de résistance aux antibiotiques, ainsi que par leur grande faculté d'acquisition de nouveaux mécanismes de résistance que ce soit par l'intermédiaire de transferts de matériel génétique au sein d'une même espèce bactérienne ou entre des espèces différentes.

Leur adaptation remarquable a touché l'aptitude de résister à une large gamme d'antibiotiques, primordialement la famille des  $\beta$ -Lactamines puis celles des aminosides et des quinolones et qui s'étend à la vancomycine et à beaucoup d'autres familles d'antibiotiques.

Face à une infection, l'identification de l'agent microbiologique en cause est le premier objectif. Cette étape est de loin la plus urgente et la plus importante à court terme puisqu'elle intervient directement dans la prise en charge appropriée du patient.

Après les avoir identifiées, une étude de la sensibilité aux antibiotiques des différentes souches d'entérocoques communautaire isolées serait effectuée, avec en second temps une détermination des espèces bactériennes et une recherche des gènes de résistance et de virulence ainsi que leur capacité à former des biofilms.

Dans la première partie de ce travail, nous avons déterminé la prévalence des souches résistantes à la vancomycine, nous avons identifié les différentes espèces isolées et nous identifierons leur profil de résistance vis-à-vis des antibiotiques. Nous caractérisons par la suite les déterminants génétiques impliqués dans la résistance aux glycopeptides à savoir les gènes *vanA*, *vanB* et *vanC*.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons cherché une éventuelle relation qui pourrait relier la virulence à la résistance aux antimicrobiens chez des souches d'entérocoques et nous déterminerons l'espèce la plus virulente en terme de production de biofilm et de possession des gènes de virulences.

D'autre part, nous rechercherons s'il existe des lignées génétiquement bien individualisées, conséquence d'une structure fondamentale clonale. Nous étudierons donc les liens de parenté entre les isolats des EVR circulant dans la communauté de Casablanca, en faisant un séquençage du gène qui code pour l'ARNr16S et en déduisant l'arbre phylogénétique.

## **1<sup>ère</sup> partie : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**

### **I. Généralités sur les entérocoques**

Les entérocoques sont des bactéries à Gram positif, non sporulantes et immobiles (à l'exception d'*E. casseliflavus*), qui se présentent sous forme de coques isolés ou arrangés en paires ou en chaînettes et dont le génome contient un faible pourcentage en G+C (37,5 à 44 %). Ce sont des organismes anaérobies aérotolérants, dépourvus d'oxydase et de catalase, bien que le gène codant cette dernière enzyme de détoxification existe dans leur génome [1].

Ils se distinguent des streptocoques par leur capacité de se multiplier dans des conditions hostiles à 10°C et à 45°C, en milieu hyper salé, en présence de 40% de bile et à pH de 9,6. Ils hydrolysent l'esculine en noircissant le milieu bile esculine azide (BEA) [1].

La plupart des espèces produisent une pyrrolidonyl arylamidase et portent l'antigène du groupe D de la classification de Lancefield [2]. L'analyse du peptidoglycane pariétal a mis en évidence une muréine composée d'enchaînement lysine-aspartate (sauf pour *E. faecalis* qui possède des enchaînements lysine-alanine) et contenant des ponts D-isoasparagine. Cette structure originale du peptidoglycane différencie les entérocoques des autres streptocoques et des lactocoques [3].

Concernant les caractères biochimiques, les entérocoques produisent essentiellement de l'acide lactique et en quantité moindre, de l'acétate, du formiate et de l'éthanol. Ainsi que les produits finaux du métabolisme peuvent changer en fonction de la présence ou non d'oxygène ou d'autres accepteurs d'électrons. En anaérobiose, le lactate est le principal produit du métabolisme du glucose, tandis qu'en condition d'aérobiose, les produits du métabolisme sont l'acétate et le CO<sub>2</sub>. Ensuite, les entérocoques sont capables de métaboliser divers types de sucres comme le N-acétyl glucosamine, l'amygdaline, l'arbutine, le cellobiose, le D-fructose, le galactose, le β-gentiobiose, le glucose, le lactose, le maltose, le Dmannose, le β-D-méthyle glucopyranoside, le ribose, la salicine et le tréhalose [4].

Les entérocoques sont des bactéries ubiquistes, présentes dans différentes niches écologiques telles que l'intestin de l'homme et des animaux à sang chaud (10<sup>5</sup>-10<sup>8</sup> CFU/g de matière fécale), plus rarement dans le vagin ou la cavité buccale [5]. On les retrouve également dans les eaux usées, l'eau douce, l'eau de mer, le sol, sur les végétaux et chez les insectes [6]. Plus exceptionnellement, leur présence est signalée dans le tractus intestinal des animaux à sang

froid (batraciens, reptiles et insectes) [7]. En raison de ses caractéristiques épidémiologique, cette bactérie est communément utilisée comme un indicateur de contamination fécale en but de tester la qualité hygiénique des échantillons environnementaux [8].

## **II. Taxonomie**

### **II.1. Historique**

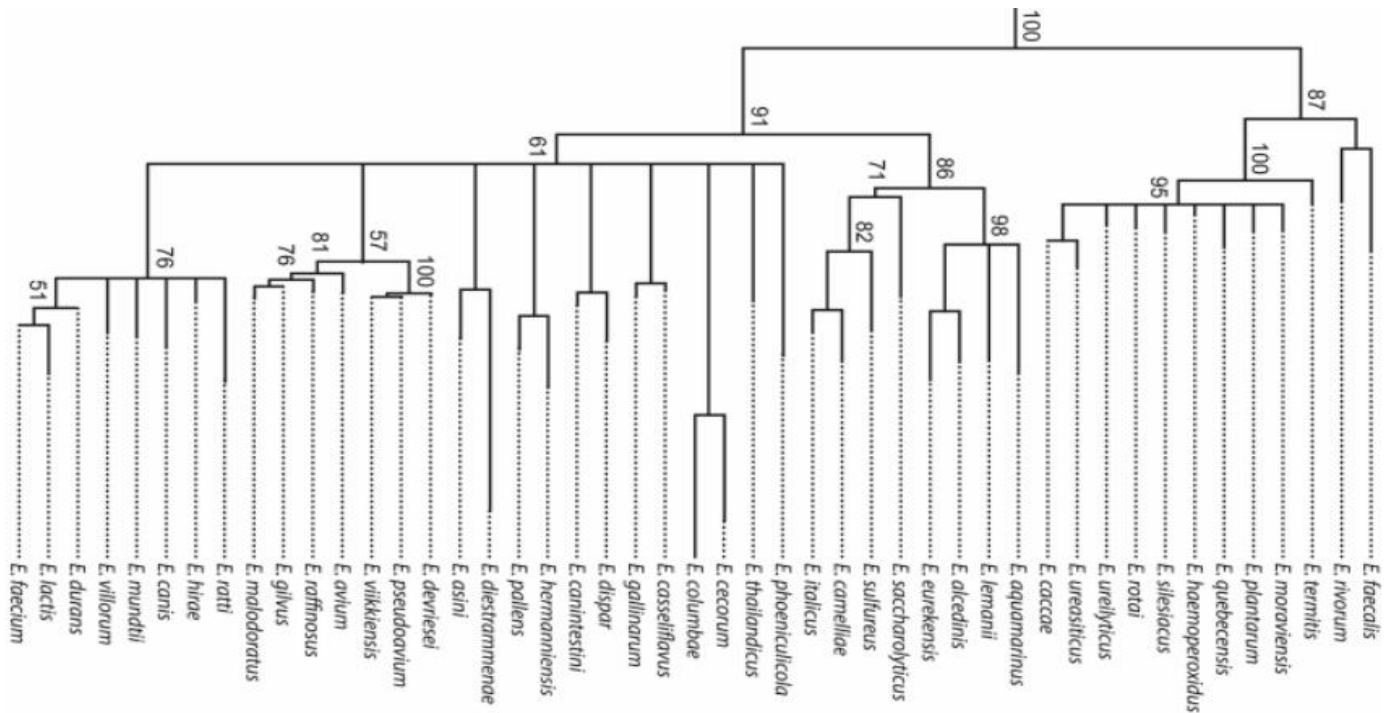
Le terme d'entérocoque fut utilisé pour la première fois en 1899 par Thiercelin pour décrire un nouveau diplocoque à Gram positif isolé dans le tube digestif humain [9]. Andrewes et Horder introduisirent en 1906 le nom de *Streptococcus faecalis*. Ce germe appartient à la famille des Streptococcaceae. Initialement classé dans le genre *Streptococcus* parmi les streptocoques du groupe D, le genre *Enterococcus* en a été différencié en 1996 [10]. En effet les résultats des études d'hybridation ADN-ADN et ADN-ARNr ont démontré que les entérocoques sont nettement distincts des autres streptocoques du groupe D (*S. hovis*, *S. equinus*) bien qu'ils réagissent avec l'immun-sérum du groupe D et présentent certaines propriétés physiologiques communes avec ces streptocoques [10]. Les entérocoques sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux et *E. faecalis* et *E. faecium* représentent respectivement 90% et 10% des entérocoques d'origine colique et sont responsables dans les mêmes proportions de la quasi-totalité des infections à entérocoques chez l'homme [11].

### **II.2. Classification**

Dans les années 1930, et sur base du système *Lancefield Serological Typing*, les *Enterococcus* étaient classés dans le genre *Streptococcus* (groupe D), comme d'autres bactéries lactiques du genre *Lactococcus* et *Vagococcus*. Avec l'avènement de la biologie moléculaire et de nouvelles techniques telles que la détermination du pourcentage G+C, le séquençage de l'ARNr 16S et l'hybridation DNA-DNA, les bactéries *Streptococcus faecium* et *Streptococcus faecalis* ont été reclassé comme *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis*, respectivement [4].

Le genre *Enterococcus* est placé dans le domaine des Bacteria, le phylum des Firmicutes, classe des Bacilli, ordre des Lactobacillales, famille des Enterococcaceae, branche des *Clostridium*.

La phylogénie de ce genre ne cesse d'évoluer du fait de l'avènement de nouvelles technologies permettant une évolution quasi-constante de la taxonomie. En effet, initialement composé des deux espèces précédemment citées, le genre *Enterococcus* comptait 37 espèces en 2011, 48 espèces en 2013 [12] (Figure 1) et 55 espèces en 2017.



**Figure 1:** Arbre phylogénique du genre *Enterococcus* reposant sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S [12].

### **III. Caractéristiques microbiologiques expliquant la virulence des entérocoques**

#### **III.1. Facteurs de virulence**

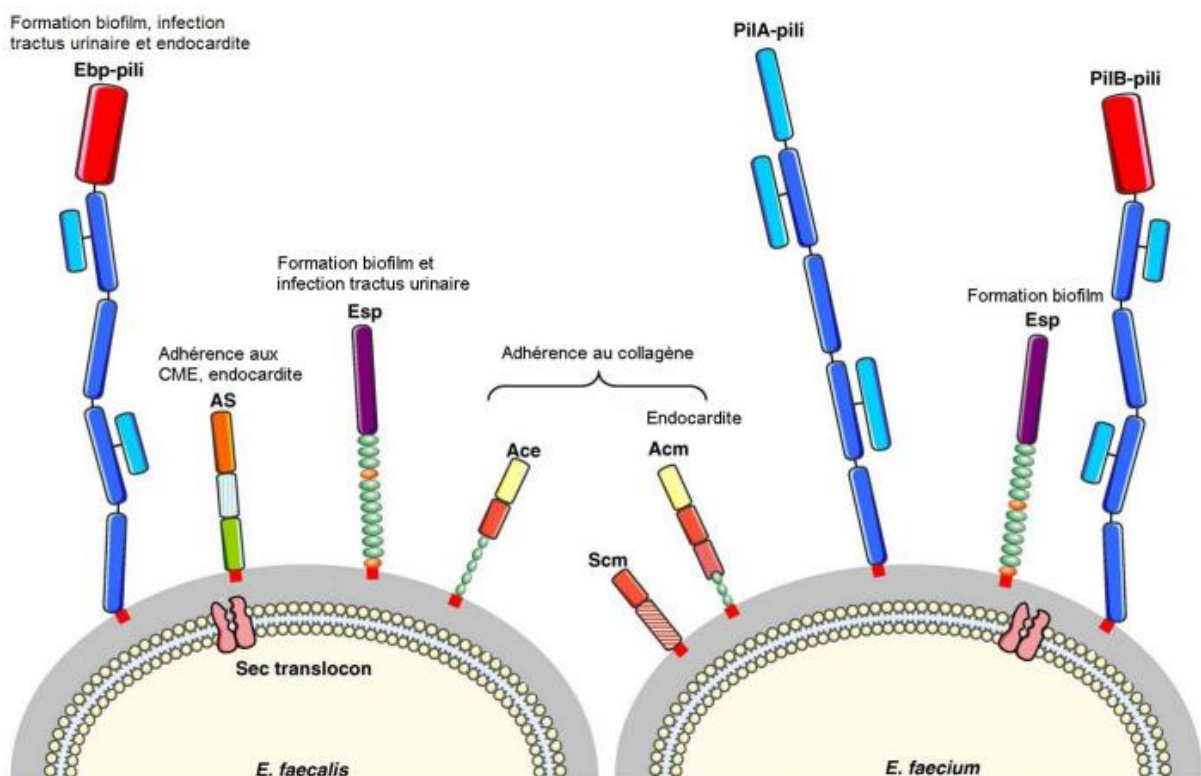
Les facteurs de virulence sont définis comme des éléments qui augmentent la capacité du microorganisme à provoquer la maladie, ils ne sont pas indispensables à la survie de la bactérie mais ils diminuent son potentiel pathogène lorsqu'ils sont absents. Ces facteurs ont pour rôle de permettre l'adhérence aux cellules hôtes et à la matrice extracellulaire, faciliter l'invasion des tissus, moduler la réponse immunitaire et inflammatoire et causer des dommages par l'intermédiaire de toxines. Bien que la pathogénicité des entérocoques soit discutée dans certaines situations, des facteurs de virulence ont été décrits dans des modèles expérimentaux, mais les données concernant leur fréquence dans les isolats cliniques sont

rare. De plus, la relation entre présence du facteur de virulence et gravité de la maladie n'est que peu soulignée.

En plus de ces facteurs de virulence, *E. faecalis* possède des capacités physiologiques lui permettant d'accroître son caractère pathogène. Parmi ces capacités on peut citer celles de passer à un état viable mais non cultivable (VBNC) [13] qui semble lié à la capacité de persister dans l'organisme lors d'infections chroniques [14], ainsi que la formation des biofilms qui permet entre autre de coloniser des surfaces, de se protéger de l'action des substances antimicrobiennes, de médier l'adhésion et l'invasion aux cellules hôtes [15].

### III.1.1 Facteurs liés à la membrane

La figure ci-dessous représente un schéma des différentes adhésines de surface et du pili d'*E. faecalis* (gauche) et d'*E. faecium* (droite) lié de façon covalente via un motif LPXTG (carré rouge) dans le peptidoglycane de la paroi cellulaire (gris). Le translocon Sec y est indiqué. Les protéines de surface LPXTG des entérocoques servent, entre autres, à l'attachement aux ligands de la matrice extracellulaire et aux cellules eucaryotes, et jouent un rôle lors d'une infection. Les fonctions connues, pour le moment, sont représentées au-dessus de la protéine de surface ou de la structure.



**Figure 2:** Vue d'ensemble des protéines de surface LPXTG et des pili des entérocoques [16].

Ebp-pili, pilus associé aux endocardites et à la formation de biofilm chez *E. faecalis*; CME, composantes de la matrice extracellulaire; AS, substance agrégative; Esp, protéine de surface des entérocoques; Ace, adhésine de liaison au collagène d'*E. faecalis*; Scm, Seconde adhésine de liaison au collagène d'*E. faecium*; Acn, adhésine de liaison au collagène d'*E. faecium*; PilA-pili, pilus PilA d'*E. faecium*; PilB-pili, pilus PilB d'*E. faecium*.

### III.1.1.1 Protéines de liaison au collagène

Les séquences publiées des génomes *E. faecalis* V583 et *E. faecium* TX0016 ont révélé la présence de 17 et 15 MSCRAMMs (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules) [17], respectivement, ceci suppose que les entérocoques ont évolué par l'acquisition de plusieurs stratégies afin d'interagir avec les structures de l'hôte. Trois principaux MSCRAMMs ont été caractérisés en détail chez les entérocoques et permettraient la liaison de haute affinité à différents types de collagène et autres composantes de la matrice extracellulaire. L'adhésine Ace (adhésine du collagène d'*E. faecalis*) est la première MSCRAMM ayant été décrite chez les entérocoques, et permet la liaison au collagène de type I et IV, à la laminine et à la dentine [18, 19]. Acn (adhésine du collagène d'*E. faecium*) interagit avec le collagène de type I, et à un moindre degré, au collagène de type IV [20]. Scm (seconde adhésine du collagène d'*E. faecium*) peut se lier au collagène de type V et au fibrinogène [17]. Ces trois MSCRAMMs de liaison au collagène ont été retrouvés pratiquement chez tous les isolats d'entérocoques d'origines clinique et non clinique. Par contre, malgré la présence prédominante du gène *acn* fonctionnel dans les isolats cliniques, un pseudogène, interrompu par un élément d'insertion, a été souvent détecté dans les isolats d'origine non clinique [21]. Ces isolats, possédant un pseudogène, ne pouvaient pas lier le collagène de type I. Ces trois MSCRAMMs de liaison au collagène partagent plusieurs caractéristiques. Ces dernières incluent une séquence peptide signal en position N-terminale suivi d'un domaine A de liaison de haute affinité au ligand, consistant en un ou plusieurs variants de repliement de type (IgG) immunoglobuline, un domaine répété B, et un signal d'ancrage à la paroi cellulaire de type LPXTG en C-terminale. L'activité de liaison au collagène de ces trois protéines se trouve dans le domaine A. Les adhésines Ace et Acn partagent des séquences similaires avec la grande famille des MSCRAMMs de liaison au collagène des pathogènes à Gram-positif, dont Cna de *Staphylococcus aureus* [22].

Le rôle de l'adhésine Ace lors d'une infection n'est pas encore clairement déterminé, puisque les mutants par délétion, construits jusqu'à maintenant, n'ont pas été testés *in vivo* [23]. Contrairement à Ace et Scm, la fonction *in vivo* d'Acm a été complètement analysée par des études animales utilisant justement des mutants par délétion du gène. Grâce à ces mutants, le rôle de l'adhésine Acm dans la pathogenèse des endocardites à *E. faecium* a pu être démontré [21]. Dans cette étude, une plus forte colonisation des valves cardiaques par les souches sauvages (74%) versus les souches mutantes (26%) a été observée. De plus, Acm engendrerait une réponse immunitaire chez l'hôte, puisque des anticorps IgG anti-Acm du domaine A ont été détectés dans le sérum de patients atteints d'endocardites causées par *E. faecium* [21]. Ainsi, Acm permettrait l'adhérence d'*E. faecium* aux valves cardiaques endommagées et riches en collagène. Cette étape serait donc un facteur important dans l'évolution d'une endocardite. Il y aurait également des éléments qui pourraient indiquer que l'adhésine Ace aurait un rôle dans les endocardites, mais ces observations sont indirectes et aucune étude animale n'a été publiée jusqu'à maintenant [24].

Deux nouvelles MSCRAMMs ont été également décrites chez l'espèce *E. faecium*. Ces dernières ont été isolées de souches *E. faecium* nosocomiales responsables d'épidémies et d'infections invasives. Ces deux protéines de surface LPXTG ont été nommées SgrA et EcbA [25]. SgrA permettrait la liaison aux molécules de la matrice extracellulaire nidogène 1 et nidogène 2 lesquelles sont des composantes de la lamina basale. EcbA est une MSCRAMM d'*E. faecium* qui se lie au collagène de type V. De plus, les deux protéines se lient au fibrinogène; SgrA cible les chaînes alpha et bêta tandis que EcbA se lie à la chaîne gamma. SgrA ne semble pas permettre la liaison de souches *E. faecium* au matériel biologique tel que les cellules intestinales humaines, les cellules de vessie humaine et les cellules rénales. Par contre, cette adhésine serait impliquée dans la formation de biofilm [26]. Ainsi, l'expression de ces deux adhésines semblerait contribuer à la pathogenèse des souches d'*E. faecium* responsables d'infections nosocomiales.

### III.1.1.2 Protéines de surface extracellulaire

La protéine de surface extracellulaire Esp est associée à la paroi cellulaire. Elle a un poids approximatif de 200 kDa et a été décrite pour la première fois chez les espèces *Enterococcus* par Shankar et al. [27]. Le gène *esp* a un poids moléculaire de 5622 pb et il est fréquemment retrouvé chez les isolats cliniques. Cette protéine semble promouvoir l'adhérence, la colonisation et l'évasion du système immunitaire, et jouerait un certain rôle dans la résistance

aux antibiotiques [28]. Des corrélations significatives ont été observées entre la présence du gène *esp* et la résistance aux antibiotiques chez des souches cliniques d'*E. faecium* et d'*E. faecalis* [29]. Ces résistances étaient envers l'ampicilline, la ciprofloxacine et l'imipénème chez *E. faecium*, et envers la doxycycline chez *E. faecalis*. Esp contribue également à la formation de biofilms chez les entérocoques, lesquels peuvent mener à la résistance aux stress environnementaux et aux antibiotiques, et à une adhérence aux cellules eucaryotes (i.e. tractus urinaire) [30]. Deux espèces, *E. faecalis* et *E. faecium*, lorsque de provenance clinique, possèdent fréquemment un îlot de pathogénie contenant le gène *esp*. Cette observation laisse suggérer que la protéine Esp aurait un rôle dans les infections nosocomiales [31]. La ressemblance en acides aminés entre les protéines Esp d'*E. faecium* (Espfm) et d'*E. faecalis* (Espfs) est élevée (> 90 %) [31], suggérant ainsi que les deux protéines ont la même fonction chez les deux espèces. Elles contiennent toutes les deux une séquence signal et un domaine variable en position N-terminale, dont ce dernier étant approximativement formé de 700 acides aminés, suivi de trois domaines répétés désignés A, B et C. Le nombre de répétitions A, B et C dans la protéine Esp, varie d'un isolat à l'autre [31]. L'extrémité C-terminale de la protéine est formée par un motif [Y/F] PXTG, lequel pourrait être reconnu par une sortase, permettant ainsi l'ancrage d'Esp à la paroi cellulaire. Les protéines Esp démontrent une organisation des domaines similaire à celle des protéines de surface  $\alpha$  C, Rib, R28 et Bap des streptocoques pathogènes et de *Staphylococcus aureus* [32]. La fonction de ce groupe de protéines est peu définie, mais des observations semblent démontrer un rôle de la protéine dans la modulation de la réponse immunitaire envers les bactéries [33]. Il reste à savoir si Esp protège également contre le système immunitaire de l'hôte. La caractérisation fonctionnelle d'Esp a révélé son rôle dans la formation de biofilm. Une inactivation du gène *esp* par insertion, tant chez *E. faecalis* qu'*E. faecium*, a démontré qu'Esp était impliquée dans l'adhérence initiale et la formation de biofilm après 24h sur des surfaces abiotiques [34]. Des souches *E. faecalis* négatives pour Esp étaient capables de produire un biofilm après avoir reçues un transfert plasmidique du gène [35]. Les fonctions exactes des différents domaines de la protéine Esp restent encore à déterminer. Cependant, quelques évidences semblent démontrer que le domaine N-terminal aurait un rôle important dans la formation des biofilms. Une souche mutante *E. faecalis* exprimant Espfs sans son domaine N-terminal est significativement diminuée dans la formation de biofilm comparativement à la souche sauvage [36]. De plus, un mutant n'exprimant que le domaine N-terminal à sa surface produit un biofilm similaire à la souche sauvage [36]. L'ajout de la portion N-terminal d'Espfm à des bactéries ayant une expression élevée de la protéine Esp,

bloque l'attachement initial des cellules au polystyrène [37]. Ainsi, ces observations suggèrent que la capacité de formation de biofilm d'Esp est conférée par son domaine N-terminal et que celui-ci est également impliqué dans les infections à entérocoques associées aux biofilms. De plus, le transfert conjugatif semblerait également être impliqué puisque des souches *E. faecium* qui possèdent le gène *esp<sub>fm</sub>* ont un taux de conjugaison plus élevé que les souches ne l'ayant pas [38].

Les pili, exposés à la surface des bactéries à Gram-positif, sont des fibres multimériques de protéines de surface LPXTG. Ils sont polymérisés par une sortase de classe C pour être ensuite immobilisés de façon covalente au peptidoglycan de la paroi cellulaire par une sortase de classe A. L'adhérence aux tissus de l'hôte par les protéines de surface et les pili suivie par la colonisation des muqueuses, sembleraient être les étapes initiales et nécessaires dans l'établissement d'une infection, et seraient un pré-requis à la pathogenèse [39]. C'est au début des années 80 que des structures de type pilus ont été détectées par microscopie à transmission électronique à la surface de la bactérie *E. faecalis* JH-2 [40]. À ce moment, les gènes impliqués dans l'assemblage du pilus chez les bactéries à Gram-positif est encore inconnus. Des travaux effectués chez *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Bacillus* et *Streptococcus* ont révélé que les enzymes sortase, liés aux protéines de surface LPXTG, faisant parties du groupe de gènes pilines (GGP), sont exclusivement impliqués dans l'assemblage du pilus [39]. Les GGPs des entérocoques ressemblent à d'autres loci de pilus de bactéries à Gram-positif. *E. faecalis* possède deux GGPs, l'opéron pili associé aux endocardites et aux biofilms (*ebp*) et le locus initiateur de biofilm chez les entérocoques (*bee*) [41]. Le locus *bee* est localisé sur un plasmide conjugatif et n'a été détecté que sporadiquement (5 %) chez les isolats *E. faecalis*, tandis que le locus *ebp* est trouvé de façon ubiquitaire [42]. Contrairement à *E. faecalis*, *E. faecium* possède quatre GGPs, lesquels ont été nommés GGP-1 à 4 et sont présents de façon prédominante chez les isolats de patients hospitalisés [43]. La présence de quatre types distincts de GGPs doit donner un avantage sélectif aux isolats *E. faecium*. Jusqu'à maintenant, des résultats expérimentaux ont été obtenus seulement pour les protéines EbpA, EbpB et EbpC (*E. faecalis*), et PilA et PilB (gènes *fms*; *E. faecium*), lesquels ont montré que ces protéines pouvaient s'assembler en un appendice de haut poids moléculaire à la surface de la bactérie [43, 44]. Dans le cas de l'espèce *E. faecalis*, l'assemblage du pilus Ebp est dépendant de la sortase SrtC, tandis que son expression est dépendante du régulateur transcriptionnelle EbpR [45]. Des expérimentations animales, par l'utilisation de mutants, ont montré un rôle du pilus Ebp de

souches *E. faecalis* durant les infections du tractus urinaire et les endocardites, lesquelles sont toutes deux des infections associées à la formation de biofilm [46, 47]. Le rôle des pili *E. faecium* de type PilA et PilB dans la pathogenèse des infections doit être encore étudié. Cependant, l'expression de ces pili à 37°C et non à 21°C [43], et la forte similarité avec les gènes du locus *ebp* d'*E. faecalis*, suggèrent la possibilité d'un rôle dans l'interaction à un hôte mammifère. De plus, une étude [44] a observé que les gènes associés à PilA et PilB (*fms*) semblaient être des marqueurs précoces du génogroupe CC17 aux États-Unis contrairement au gène *esp* qui aurait été acquis à différents moments lors de l'évolution de ce génogroupe. Ainsi, ces pili auraient potentiellement un rôle important chez les clones adaptés à l'environnement hospitalier.

### III.1.1.3 Acide lipotéichoïque

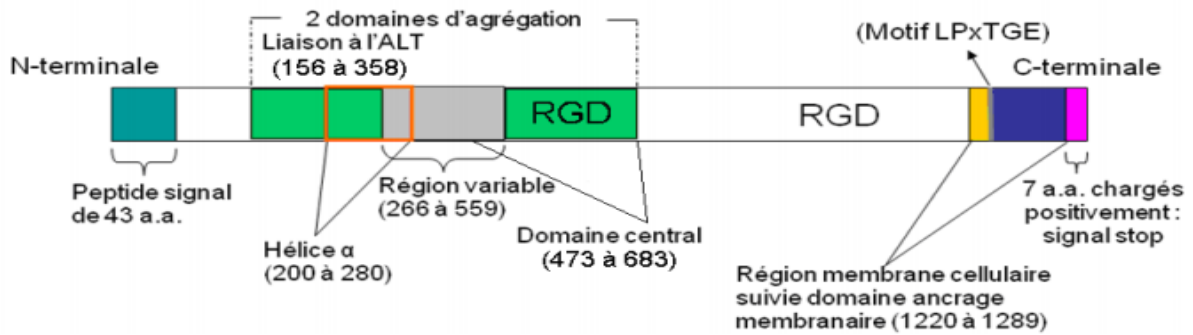
Contrairement à ce que l'on croît, 50% des septicémies et des chocs septiques sont causés par les bactéries à Gram positif [48, 49]. Un des produits de ces microorganismes est l'acide lipotéichoïque (ALT), une adhésine amphiphile associée à la membrane. Cette adhésine est un facteur de virulence potentiel et partage plusieurs propriétés pathophysiologiques du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif. L'ALT stimule également la production de plusieurs agonistes proinflammatoires par les leucocytes, et semble être impliqué dans la pathophysiologie de l'inflammation et de séquelles post-infections tels que le choc septique, les syndrômes de détresse respiratoire et du choc toxique [49, 50]. L'ALT est un polymère composé d'une chaîne de polyglycérolphosphate hydrophile liée par un pont ester à une queue de glycolipide hydrophobe. Chez les entérocoques, ces molécules de surface semblent être identiques à l'antigène de groupe D [51]. La queue hydrophobe permettrait la liaison à une variété de cellules eucaryotes, incluant les plaquettes, les érythrocytes, les lymphocytes, les leucocytes polymorphonucléaires et les cellules épithéliales [52]. L'ALT peut être relâché de la surface bactérienne et ce relâchement peut être augmenté par la présence d'antibiotiques agissant sur la paroi cellulaire [53]. Les ALTs, isolés de souches d'*E. faecalis* ou d'autres bactéries à Gram-positif, ont démontré une stimulation des leucocytes à relâcher plusieurs médiateurs, lesquels sont connus comme jouant un rôle dans différentes phases de la réponse inflammatoire. Ces médiateurs incluent le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ), l'interleukine 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), l'interleukine 6 (IL-6) [54], et l'interleukine 8 (IL-8) [55] lesquels sont relâchés par des cultures de monocytes et de leucocytes totaux humains. Ils causeraient également le relâchement de la prostaglandine E2,

par les macrophages péritonéaux de souris [56], de lysozymes, par les macrophages péritonéaux de rats [57], et la génération d'anionssuperoxyde, par les monocytes humains [58].

Les antibiotiques agissant sur la paroi cellulaire doivent avoir une activité autolytique appropriée pour tuer efficacement les bactéries à Gram-positif. Cependant, l'ALT a démontré une inhibition de l'autolyse, autant de membranes isolées que de cellules intactes, chez *E. faecalis* (*Enterococcus hirae* ATCC 9790) [59]. De plus, Ehrenfeld et al. [60] ont rapporté que l'ALT, purifié d'*E. faecalis*, inhibait l'induction, phéromone-dépendante, de l'agrégation des cellules bactériennes. L'ALT est une partie importante du complexe de liaison de la substance agrégative des entérocoques [61, 62]. Ce rôle laisse entrevoir l'importance de l'ALT dans la dissémination horizontale d'éléments génétiques mobiles. Ces éléments comprennent les plasmides de réponse aux phéromones qui codent souvent pour de nombreux facteurs de virulence, mais également pour de la résistance aux antibiotiques.

#### III.1.1.4 Substance agrégative

La substance agrégative (SA) a été la première protéine de surface LPXTG décrite chez les entérocoques et est une adhésine bien caractérisée pour ses nombreuses fonctions et sa contribution dans la virulence d'*E. faecalis*. SA est la désignation communément utilisée pour un groupe de protéines codées par des plasmides conjugatifs répondant aux phéromones dont leur séquence en acides aminés est hautement similaire. Les gènes *asp1*, *asc10* et *asa1* codent pour les protéines SA de trois plasmides répondant aux phéromones les plus étudiés, soient pPD1, pCF10 et pAD1 respectivement. L'expression de ces gènes est induite par une phéromone oligopeptide autocrine, laquelle est sécrétée par d'autres entérocoques [63, 64]. L'expression de la SA à la surface de la cellule permet un contact physique étroit entre les bactéries donneuses et receveuses, permettant ainsi un transfert, à haute fréquence, de plasmides de virulence et de résistance aux antibiotiques. L'adhésine, de 1296 acides aminés contient un domaine d'agrégation à l'ALT, une région variable, un domaine central d'agrégation et deux motifs Arg-Gly-Asp (RGD pour Arginyl-glycyl-aspartic acid) (Figure 3). Elle contient également une hélice alpha ayant une similarité avec la protéine M de *Streptococcus pneumoniae* et à la myosine des cellules eucaryotes [65].



**Figure 3:** Organisation structurale de la substance agrégative des entérocoques [24].

Les trois protéines SA partagent au-delà de 90% d'identité en acides aminés à travers toute la séquence, bien qu'une région variable, localisée au centre, présente seulement 30 à 40% de similarité [66]. Les études biochimiques sur la SA ont longtemps été difficiles dues aux contraintes liées à la purification de la protéine à sa pleine longueur. Il semblerait que la partie C-terminale soit rapidement dégradée suite à la purification et donc peu stable [67]. Il a été démontré, par mutations et délétions, que deux domaines d'agrégation seraient présents et nécessaires à l'agrégation. Spécifiquement, le premier domaine, allant des acides aminés 156 à 358, permettrait en partie la liaison à l'ALT tandis que le second domaine, allant des acides aminés 473 à 683, serait nécessaire à la formation d'agrégats mais non à la liaison à l'ALT. De plus, une délétion dans le premier domaine d'agrégation (a.a. 156 à 358) a révélé que celui-ci était requis, non seulement pour la liaison à l'ALT, mais également pour l'internalisation dans des entérocytes H-29 [68]. Suivant cette observation, un fragment N-terminal purifié, allant des acides aminés 44 à 331, a démontré une forte liaison à l'acide lipotéichoïque [68]. De plus, cette étude a mis en évidence que la purification de l'Asc10 et du domaine d'agrégation à l'ALT, situé près de la région N-terminale d'Asc10, liaient l'acide lipotéichoïque d'*E. faecalis* de façon dose-dépendante, contrairement au domaine central [68]. La structure cristalline de SA n'a pas encore été déterminée et donc, le mécanisme par lequel SA se lie à son ligand n'est pas encore connu. La SA est aussi impliquée dans l'adhésion et l'invasion de cellules dérivées du colon et du duodénum, indiquant que SA peut jouer un rôle dans la translocation d'*E. faecalis* à travers la barrière intestinale, conduisant ainsi à une infection systémique [69]. Asc10 augmente l'adhérence, l'internalisation et la survie intracellulaire dans les leucocytes polymorphonucléaires [70]. Ces observations semblent ainsi suggérer que les motifs RGD de la SA favoriseraient les interactions avec les cellules eucaryotes. Cela semble être confirmée par une diminution de la liaison des *E. faecalis* lorsque des cellules eucaryotes sont pré-incubées avec des peptides RGDs synthétisés

chimiquement [71]. De façon similaire, Asa1 augmente l'adhérence et la survie dans les macrophages et favorise l'adhérence aux cellules épithéliales des tubules rénaux [71].

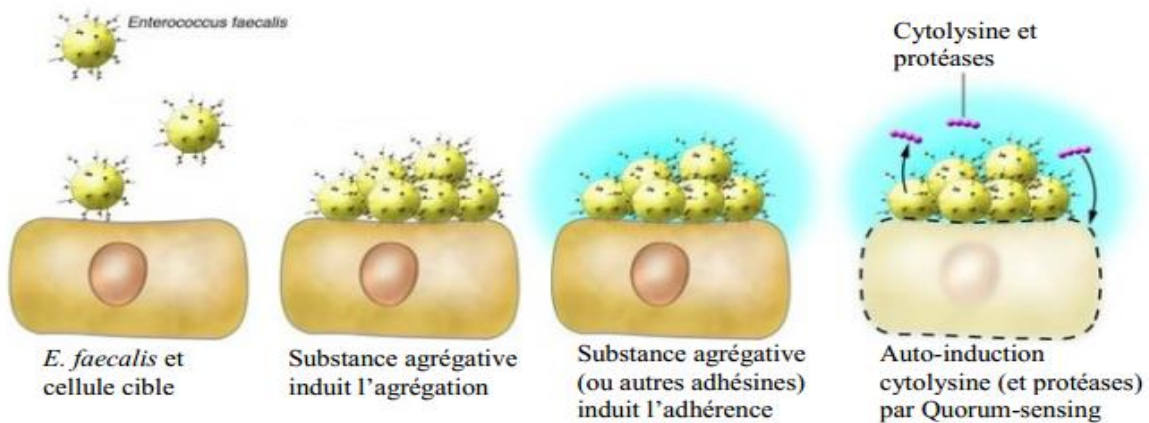
Les protéines Asc10 et Asa1 ont été impliquées dans la liaison aux composantes de la matrice extracellulaire (CMEs) tels que la fibrine, la fibronectine, la thrombospondine, la vitronectine et le collagène de type I. Des délétions dans la région variable du gène *asa1* ont engendré une réduction de la liaison à la fibronectine, suggérant ainsi que cette région est un domaine de liaison aux CMEs [72]. Par contre, Asc10 purifiée pleine longueur ne s'est pas liée aux CMEs, mais un mutant de la protéine n'ayant pas le domaine d'agrégation en N-terminale (a.a. 156-358) s'est lié au fibrinogène et à la vitronectine. De plus, une souche d'*E. faecalis* contenant le plasmide pCF500, un dérivé de pCF10 (SA positif inductible), a été incapable de coloniser le tractus urinaire dans un modèle d'infection du tractus urinaire supérieure et inférieure chez la souris [73]. Par contre, Asc10 et Asa1 sembleraient jouer un rôle dans une endocardite expérimentale, puisque les deux protéines auraient augmenté la colonisation bactérienne sur des valves aortiques de lapins [74]. Également, l'utilisation de mutants du gène *asc10* par délétion du domaine d'agrégation en N-terminale et des motifs RGD, a montré une diminution significative de la virulence dans un modèle d'endocardite du lapin. À l'opposé, l'immunisation active avec des fragments N-terminaux de SA n'a pas permis d'obtenir de protection immunitaire dans ces modèles d'endocardites [75]. Ainsi, les observations tant *in vitro* qu'*in vivo* indiquent que la SA est multifonctionnelle et est un facteur de virulence important chez *E. faecalis*, tant au niveau des infections que dans le transfert horizontal d'éléments de virulence et de résistance aux antibiotiques.

### III.1.2 Facteurs sécrétés

#### III.1.2.1 Cytolysine

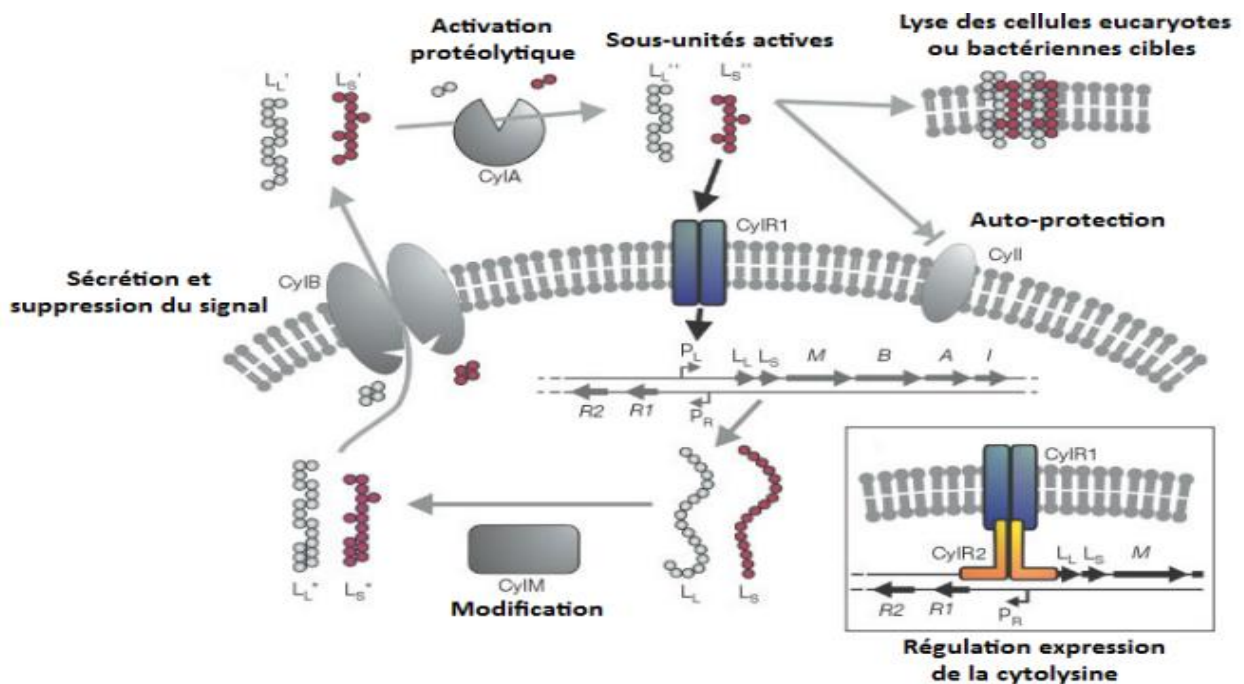
La cytolysine, aussi nommée hémolysine, est une toxine bactérienne, dont les gènes permettant sa production sont localisés sur des plasmides répondant aux phéromones [76] ou sur un îlot de pathogénie présent dans le chromosome [77]. La cytolysine active consiste en deux petits peptides (CylL1 et CylLs). Lorsque fonctionnels, ils sont toxiques ou lytiques pour une grande variété de cellules eucaryotes et procaryotes [78]. En plus de posséder des activités toxiques et bactéricides, la forme extracellulaire activée de CylLs (CylLs<sup>''</sup>) induit un haut niveau d'expression des gènes structuraux de la cytolysine via un mécanisme de quorum-sensing impliquant un système à deux composantes [79]. Elle est codée par un opéron complexe de huit gènes (*cylLl*, *cylLs*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, *cylI*, *cylR1*, *cylR2*). Les protéines de

régulation de la cytolyse, CylR1 et CylR2, répriment, par collaboration, l'expression de la toxine; tandis que l'activation est enclenchée par l'accumulation externe de CylLs via un mécanisme de signalisation inconnu [79]. La figure 4a démontre l'auto-induction de la cytolyse par le mécanisme de quorum-sensing impliquant également la SA et autres adhésines.



**Figure 4a:** Modèle d'auto-induction de la cytolyse par synergie avec la substance agrégative et autres adhésines [80].

Ensuite, la figure 4b démontre la maturation et la régulation de la toxine suite à son autoinduction.



**Figure 4b:** Modèle de maturation et de régulation de la cytolyse [79].

Suite à l'auto-induction, les sous-unités CylLL et CylLS sont synthétisées pour ensuite être modifiées de façon post-traductionnelle par CylM. Les peptides modifiés, CylLL\* et CylLS\*, sont clivés et sécrétés par CylB suivi d'une activation extracellulaire par une seconde protéase, CylA. La bactérie produisant la cytolysine est protégée par CylI dont le mécanisme est encore inconnu. La sous-unité CylLS" induit l'expression de l'opéron cytolysine, et CylR1 et CylR2 sont tous les deux requis pour la répression (voir l'encadré figure 4b). Dans un modèle plus simple, CylLS" pourrait interagir avec la protéine régulatrice CylR1 à la surface de la membrane de par sa composition hydrophobe. CylR1 pourrait ensuite permettre à la protéine de liaison à l'ADN, CylR2, de réprimer la transcription à partir du promoteur de la cytolysine PL étant dans un état inactivé. Puisqu'aucun autre élément de régulation n'est codé par l'opéron, on ne peut pas exclure la possibilité que d'autres facteurs cellulaires puissent jouer un rôle dans le processus de signalisation [79]. La cytolysine est retrouvée chez au-delà de 60% des isolats d'*E. faecalis* de cas cliniques [81]. Elle est reliée de manière distante à la streptolysine S et est aussi membre de la classe des bactériocines connue sous le nom des « lantibiotiques » [82]. La cytolysine des entérocoques a démontré un rôle dans la virulence de différents modèles d'infections [83] et elle est associée à la mortalité chez l'homme [84]. Le phénotype cytolytique est commun chez les isolats d'*E. faecalis* dérivés d'infections nosocomiales [85].

Lors d'une infection aiguë, le traitement aux antibiotiques face à la bactérie semble peu efficace dû à une translocation de la bactérie dans les cellules épithéliales de l'intestin de l'hôte [86]. Par contre, il n'est pas démontré si la toxine affecte la translocation bactérienne dans l'épithélium intestinal. Il a été observé que les souches exprimant la cytolysine avaient un avantage sur celles ne l'exprimant pas, car la toxine permettait une surcroissance des isolats d'*E. faecalis* cytolytiques [87]. De plus, il n'a pas été démontré si l'expression de la toxine permettait une translocation de la bactérie dans la circulation sanguine. Par contre, on sait qu'elle contribue à la prolifération d'*E. faecalis* dans le sang [88]. Considérant le mode d'auto-régulation de la cytolysine, requérant une accumulation de CylLS à un niveau seuil, la diffusion dans la circulation sanguine pourrait prévenir un haut niveau d'expression dans ce milieu, rendant ainsi une hémolyse sanguine élevée peu probable. Cependant, aux sites de coagulation intravasculaire, dans l'environnement des valvules cardiaques, ou dans les biofilms, des microenvironnements peuvent apparaître où *E. faecalis*, et ainsi CylLS, peut s'accumuler à des concentrations suffisamment élevées pour enclencher l'expression à haut niveau de la cytolysine [89].

### III.1.2.2 Bactériocines

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens extracellulaires qui démontrent une activité envers des espèces bactériennes étroitement liées. Quatre gènes sont nécessaires afin de produire les bactériocines : un gène de structure codant pour un pré-peptide, un gène d'immunité (auto-protection), un gène de transporteur ABC et un gène codant pour une protéine requise à l'exportation de la bactériocine. Les bactériocines sont formées en tant que pré-peptide dans la cellule et la maturation se fait durant l'exportation. Cette dernière se fait par le clivage enzymatique du peptide leader en N-terminale au niveau d'un site double glycine, et par l'exportation via une voie Sec-dépendante. Les bactériocines sont des protéines cationiques et amphiphiles contenant peu ou pas de cystéine [90]. La production des bactériocines est favorisée en conditions de stress, causée probablement par un taux de croissance moindre, résultant ainsi en une meilleure utilisation de l'énergie et une plus grande disponibilité des métabolites pour la synthèse des bactériocines. Ainsi, sous des conditions optimales de croissance, il y a moins d'acides aminés disponibles pour la production de celles-ci [91]. Les espèces *Enterococcus* sont connues pour produire une grande variété d'entérocoines (Tableau 1) incluant les entérocoines A, B et P, lesquelles sont actives contre les espèces *Listeria*, *Clostridium* et *Staphylococcus aureus* [92]. La plupart des bactériocines produites par *E. faecalis* et *E. faecium* sont identiques aux entérocoines A et B étant les premières décrites chez *E. faecium* CTC492 et *E. faecium* T136 [93]. *E. faecium* RZS C5 est un isolat naturel du fromage, ne possède pas de facteurs de virulence et a des propriétés anti-*Listeria* spp. [94]. L'étude énonce la possibilité d'utiliser cette souche en coculture, par exemple dans la production de saucisses fermentées, afin de réduire le risque de croissance de *Listeria* spp.. L'entérocoine EJ97 d'*E. faecalis* S-47 a aussi démontré des propriétés anti-*Listeria* spp., avec une réduction de 1.6 log<sub>10</sub> après 6 heures et une inhibition complète après 24 heures à une concentration de 20 U/ml [95]. L'entérocoine AS-48 (produite par *E. faecalis* A-48-32) inhibe la croissance de cellules végétatives de *Bacillus coagulans* dans des conditions de réfrigération, et à hautes températures dans des conserves de fruits et de légumes [96]. L'activité des bactériocines envers des bactéries à Gram-négatif est plutôt inhabituelle, mais la bactériocine ST15 d'*E. mundtii* semble efficace contre une variété de bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif telles que *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* et *Pseudomonas* [93].

**Tableau 1:** Bactériocines produites par *Enterococcus* spp. [97].

Bactériocine	Souche productrice	Origine	Taille (Da)
Entérocinés A et B	<i>E. faecium</i> P21	Chorizo	-----
Entérociné AJ97	<i>E. faecalis</i> S-47	-----	-----
Sans nom	<i>E. faecium</i> A2000	Fromage	-----
Entérociné CRL35	<i>E. faecium</i> CRL35	Fromage	3500
Bactériocine N15	<i>E. faecium</i> N15	Riz de son Nuka	3000-5000
Entérocinés A et B	<i>E. faecium</i> WHE81	Fromage	4833 et 5462
Sans nom	<i>E. faecium</i> RZS C5; <i>E. faecium</i> DPC 1146	Fromage -----	4833 et 5462 -----
AS-48	<i>E. faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i> S-48	Tractus intestinal porcin	----- -----
Entérociné 012	<i>E. gallinarum</i>	Duodénum d'autruche	3400
Sans nom	<i>E. faecium</i> CRL1385	Poulet libre de ferme	-----
Entérociné P	<i>E. faecium</i> P13	Saucisson sec fermenté	-----
Entérocinés 1071A et	<i>E. faecalis</i> BFE 1071	Fèces de porcs miniatures	1071B 4285 et 3899
Mundticine ATO6	<i>E. mundtii</i> ATO6	Légumes	4287
Mundticine KS	<i>E. mundtii</i> NFRI 7393	Ensilage de graminées	4290
Bactériocine 51	<i>E. faecium</i> VRE38	Humain (clinique)	-----
Cytolysine	<i>E. faecalis</i> DS16; <i>E. faecium</i> 228	Humain (clinique)	-----
Bactériocine 21	<i>E. faecalis</i> 39-5	Humain (clinique)	-----
Bactériocine 31	<i>E. faecalis</i> YI717	Humain (clinique)	4730
Bactériocine 32	<i>E. faecium</i> VRE200	Humain (clinique)	5940
Bactériocine 43	<i>E. faecium</i> VRE82	Humain (clinique)	4840

Les effets bactéricides des bactériocines semblent être dus à la perméabilisation de la paroi cellulaire. La structure enroulée des peptides entrant en contact avec la paroi cellulaire, formerait une hélice, qui s'incorporerait et traverserait la membrane, créant ainsi un pore. Ce mode d'action a été observé avec l'entérociné P. Le pore résultant cause un relâchement des

ions K<sup>+</sup>, une perte du potentiel membranaire et une inhibition de l'absorption des acides aminés. Tout ceci aurait pour résultat la mort cellulaire [98]. La bactériocine 51, isolée de la souche clinique résistante à la vancomycine *E. faecium* VRE38 et codée sur le plasmide mobile pHY (6kb), a été également caractérisée [97]. La bactériocine 51 (Bac 51) démontre une activité à spectre plutôt étroit et est active contre les souches *E. faecium*, *E. hirae* et *E. durans*.

Contrairement à l'effet bactéricide produit par les bactériocines formatrice de pores Bac 31, Bac 32 et Bac 43, le mode d'action de la bactériocine 51 est bactériostatique [97]. Cette dernière a été identifiée chez des isolats *E. faecium* cliniques à une fréquence de 2%, mais elle n'a pas été détectée chez des isolats cliniques d'*E. faecalis*. Ceci semble indiquer que Bac 51 est spécifique aux isolats cliniques *E. faecium*.

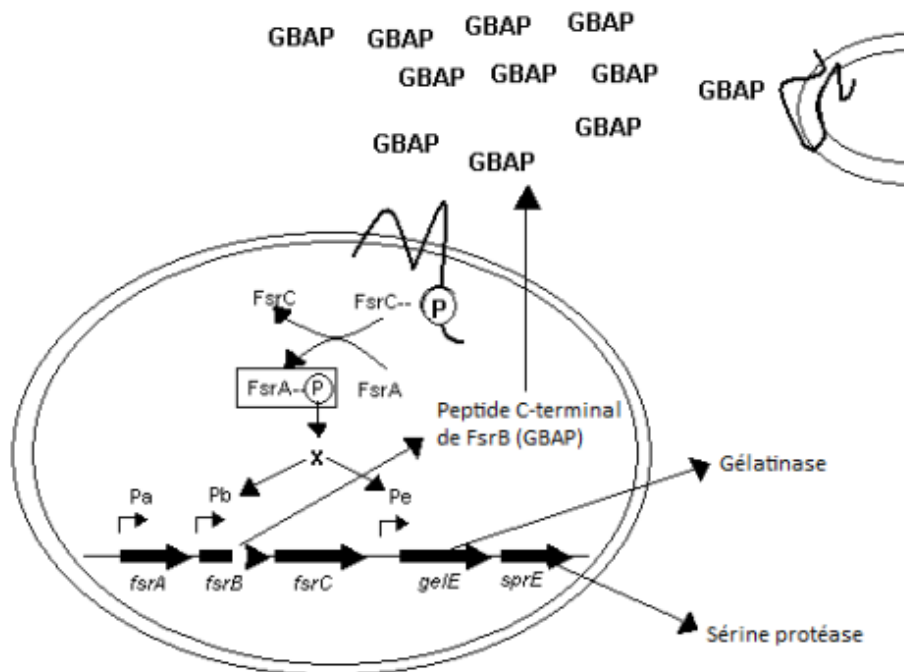
### III.1.2.3 Hyaluronidases, gélatinase et sérine protéase

Les facteurs sécrétés comprennent également la gélatinase, la sérine protéase et le gène *fsr* nécessaire à leur régulation. Ces facteurs sont généralement connus pour leur fonction à procurer des nutriments nécessaires à la bactérie, mais parfois, ces protéases peuvent causer des dommages aux tissus de l'hôte et ainsi devenir des facteurs de virulence. Ils auraient également une fonction au niveau de la formation de biofilm [99]. Les effets potentiels chez l'hôte incluent : i) une dégradation indirecte des tissus conjonctifs par l'activation des métalloprotéases de la matrice de l'hôte, ii) une dérégulation des mécanismes critiques de l'hôte facilitant ainsi l'invasion et la survie de la bactérie, et iii) une dérégulation des composantes clés du système immunitaire de l'hôte par la dégradation des immunoglobulines ou des composantes de la voie du complément [100]. D'autres effets ayant été décrits, sont la dégradation de protéines spécifiques de l'hôte résultant en la production de toxines [101], l'activation directe ou indirecte de virus [102], la transformation d'autres facteurs de virulence bactériens [103], la médiatisation directe d'une dégradation des tissus conjonctifs de l'hôte ou de protéines présentes dans les tissus [104] et finalement, par la démonstration de leur rôle comme facteurs de virulence lors d'expérimentations animales [105].

La gélatinase est une zinc métallo-endopeptidase extracellulaire sécrétée par *E. faecalis* [76]. L'enzyme gélatinase, codé par le gène *gelE*, est capable d'hydrolyser certaines composantes telles que la gélatine, le collagène, la caséine, la lactoglobuline et d'autres petits peptides [106]. Le gène localisé sur le chromosome est régulé de façon dépendante de la densité cellulaire. Par comparaison avec d'autres protéases, la gélatinase aurait un rôle dans

l'inhibition des activités protéolytiques à l'intérieur de la cellule, mais sa fonction exacte reste encore à déterminer. Une étude a démontré que l'enzyme permettrait de dégrader les SA mal repliées à la surface de la bactérie en plus de réduire le titre de phéromone produit ce qui aurait pour effet de diminuer la capacité d'induction de la conjugaison répondant aux phéromones. De plus, la gélatinase pourrait contrôler la longueur des chaînes de bactéries formées grâce à l'activation d'une autolysine. GelE serait également essentiel pour la dégradation de fibrine polymérisé. Ainsi, ces différentes fonctions suggèrent que GelE agit afin d'augmenter la dissémination d'*E. faecalis* dans des environnements à haute densité cellulaire [107]. De plus, la participation de GelE dans l'activation d'une autolysine, une enzyme dégradant le peptidoglycan, apporterait un relâchement d'ADN extracellulaire et favoriserait la formation de biofilm [108]. Une étude de Kuhnen et al. [109] a montré qu'approximativement 72% des isolats d'*E. faecalis* provenant des hôpitaux étaient producteurs de gélatinase, ce qui pourrait montrer un rôle de celle-ci dans les infections à entérocoques. Plusieurs études ont démontré son implication dans la sévérité des endocardites [110]. D'un autre côté, une absence du phénotype Gel dans 46% des souches isolées d'endocardites a été observée, ce qui montre que l'enzyme ne semble pas non plus essentiel dans la pathogénèse de cette maladie [111]. Par contre, une étude [112] a comparé le potentiel pathogénique de la souche résistante à la vancomycine *E. faecalis* V583 et trois mutants isogéniques (mutants  $\Delta gelE$ ,  $\Delta sprE$  et  $\Delta gelE \Delta sprE$ ) dans un modèle d'infection à endocardite chez le lapin. Le mutant  $\Delta gelE$  a engendré une réduction de la colonisation bactérienne sur les valves aortiques comparativement à la souche V583 ou même le mutant  $\Delta sprE$ . Ainsi, les auteurs de cette étude suggèrent que la gélatinase est la principale responsable de la pathogénèse dans une endocardite à entérocoques [112]. Chez *E. faecium*, une étude a démontré que seulement quelques isolats semblaient posséder le gène *gelE*, mais après quelques repiquages, le gène était perdu laissant suggérer que ce dernier n'est pas conservé chez l'espèce *E. faecium* [111]. Par contre, une autre étude a démontré une prévalence différente du gène chez des isolats cliniques d'*E. faecium* d'origine humaine. Une forme « silencieuse » ou non-exprimée du gène *gelE* a également été décrite chez cette espèce bactérienne [113]. Une région suite au gène *gelE* a été séquencée et fut déterminée comme étant une sérine protéase, SprE. Tous les isolats d'entérocoques possédant la gélatinase furent également positifs pour la protéine SprE et vice versa [114]. Il a été démontré également qu'une mutation au niveau du gène *gelE* provoquait l'arrêt de production de l'ARNm *sprE*. Par contre, une mutation du gène *sprE* affecte l'activité de la sérine protéase mais ne change

en rien celle de la gélatinase, ce qui démontre que la sérine protéase ne semble pas jouer un rôle important lors d'une infection [115]. Trois autres cadres de lecture ont été identifiés précédant le gène *gelE* dans des souches d'*E. faecalis* et furent nommés *fsr* (« faecal streptococci regulator ») [115]. Ce locus *fsr* comporte trois gènes soient *fsrA*, *fsrB* et *fsrC*. Ce dernier possède des similarités avec le locus *agr* (accessory gene regulatory) des staphylocoques [116]. Chez *S. aureus* le système de quorum-sensing *agr* a démontré la capacité de sur-réguler l'expression de plusieurs protéines sécrétées, incluant des toxines et une sérine protéase, et de sous-réguler l'expression de protéines de surface telle que la protéine A [117]. L'expression du locus *fsr* est dépendante de la densité cellulaire (quorum-sensing) et semble posséder un système de régulation à deux composantes [115]. La figure 5 illustre bien le fonctionnement du système de régulation *fsr*, le rôle de chacune des composantes et l'expression de celles-ci.



**Figure 5:** Mécanisme d'activation du système de régulation *fsr* et ses effets sur la synthèse de la gélatinase et de la sérine protéase [75].

Pa, promoteur du gène *fsrA*; Pb, promoteur des gènes *fsrB* et *fsrC*; Pe, promoteur des gènes *gelE* et *sprE*; GBAP, Peptide C-terminal de FsrB.

Les gènes *fsr* semblent jouer un rôle dans la formation de biofilm, puisque des mutations dans les gènes *fsrA*, *fsrB* et *fsrC* chez un isolat *E. faecalis* a permis de démontrer une

réduction dans la production de biofilm de 28 à 32% comparativement à la souche contrôle sauvage [99].

Finalement, les espèces *Enterococcus* peuvent également sécréter un enzyme hydrolytique nommé hyaluronidase. L'hyaluronidase agit sur l'acide hyaluronique et est un enzyme de dégradation associé aux dommages tissulaires. L'enzyme dépolymérise la fraction mucopolysaccharidique des tissus conjonctifs, facilitant par le fait même la dissémination des entérocoques, ainsi que leurs toxines, à travers les tissus de l'hôte [52]. L'hyaluronidase est codé par le gène *hyl* présent sur le chromosome. Une étude a démontré que, sur 26 isolats cliniques d'*E. faecium* résistants à la vancomycine, sept (27%) portaient le gène *hyl*, contrairement à 14% chez les isolats fécaux [118]. De plus, une étude récente a démontré une dissémination générale du gène de virulence *hyl* sur des mégaplasmides de souches *E. faecium* CC17 [119]. Ils ont analysé la présence et la localisation du gène *hyl* chez 255 souches *E. faecium* isolées de patients hospitalisés à Madrid en Espagne. Ils ont constaté que la plupart des isolats contenaient de larges plasmides (>150kb). Tous les isolats positifs pour le gène *hyl* sauf un, appartenaient au sous-groupe polyclonal CC17. La présence de méga-plasmides ayant le gène *hyl* chez des souches CC17 a été documentée en Europe, en Australie, en Asie et en Afrique depuis le milieu des années 90 [119].

#### **III.1.2.4 Production de superoxide extracellulaire**

L'anion superoxide est un radical de l'oxygène hautement réactif impliqué dans les dommages aux cellules et aux tissus dans une variété d'infections, incluant les maladies inflammatoires. L'anion superoxide et d'autres radicaux de l'oxygène exercent un effet destructeur sur une grande variété de composés biologiques tels que les lipides, les protéines et les acides nucléiques [120]. Le superoxide est produit par les neutrophiles et autres cellules phagocytaires. En plus d'être produit par les cellules de l'hôte, les bactéries peuvent également produire l'anion superoxide. La production de superoxide extracellulaire a été rapportée comme étant une caractéristique commune chez les souches d'*E. faecalis*. Parmi un total de 91 isolats cliniques, 87 produisaient l'anion superoxide extracellulaire à un niveau détectable [121]. Les isolats associés aux bactériémies et aux endocardites produisent du superoxide extracellulaire de façon significativement plus élevée que ceux isolés de selles d'individus sains [121]. Dans un modèle d'infection mixte sous-cutanée, *E. faecalis* et *Bacteroides fragilis*, la production de superoxide extracellulaire par *E. faecalis* a permis d'améliorer sa survie *in vivo* [122].

### III.1.3 Capsule et paroi cellulaire polysaccharidique

Les composantes de la paroi cellulaire qui sont nécessaires aux interactions complexes entre la bactérie et le système immunitaire de l'hôte, sont considérées comme étant des facteurs de virulence [123]. Il y a deux types d'antigènes polysaccharidiques : les antigènes spécifiques à l'espèce et les antigènes variant en composition et en structure au niveau d'une même espèce. Ce dernier type est utilisé dans les réactions d'agglutination à des fins de sérotypage pour des études épidémiologiques [124]. Des études ont démontré que le complément était un facteur majeur dans l'opsonisation d'*E. faecalis* et que l'utilisation d'anticorps spécifiques contribuait à l'opsonisation de la bactérie sans la présence du complément [125]. Ces études suggèrent ainsi un rôle d'une capsule polysaccharidique dans la résistance à la phagocytose. Des anticorps dirigés contre cette capsule ont été utilisés et ont servi à démontrer la présence de celle-ci chez environ un tiers des isolats d'*E. faecalis* et d'*E. faecium* [126]. De plus, dans le but d'étudier la diversité des polysaccharides capsulaires dans une collection de souches d'*E. faecalis*, Hufnagel et al. [127] ont utilisé quatre sérums spécifiques envers des antigènes polysaccharidiques qui ont été extraits de la membrane de quatre souches prototypes d'*E. faecalis*, nommés CPS-A, B, C et D. Ils ont été capables d'assigner, par ELISA, que 55% des 29 souches testées à un des quatre sérotypes. D'un autre côté, des études génétiques sur la production de la capsule ne supportent pas l'idée de quatre sérotypes capsulaires chez *E. faecalis*. Précédemment, il a été démontré que la production de la capsule de sérotype C était dépendante de la présence de neuf cadres de lecture (*cpsC* à *cpsK*) [128]. Par l'utilisation d'un nouveau système génétique, Thurlow et al. [129] ont démontré que sept des neuf gènes de l'opéron *cps* étaient essentiels à la production de la capsule, indiquant que les sérotypes A et B ne produisaient pas de polysaccharides capsulaires puisque des fragments de l'opéron étaient manquants. Afin de supporter cette observation, ils ont montré que les polysaccharides capsulaires des sérotypes C et D masquaient la détection de l'acide lipotéichoïque par des anticorps d'agglutination. L'implication de la capsule dans la virulence a également été démontrée dans une étude de cas par Bottone [130]. Des cultures d'*E. faecalis* encapsulé, inoculées par voie péritonéale à des souris blanches CD1 âgées de 15 semaines, ont démontré la persistance de la bactérie jusqu'à sept jours post-inoculation. Malgré le fait que la présence de la capsule n'ait pas causé la mortalité, cette dernière aurait retardé l'élimination péritonéale par interférence avec la phagocytose. Finalement, une étude de McBride et al. [131] indiquait que des isolats cliniques de sérotype C possédaient un plus grand répertoire de cassettes de résistance aux antibiotiques et étaient plus susceptibles de

posséder plusieurs facteurs de virulence que les autres sérotypes. Cela laisse suggérer que la présence de la capsule est associée à une lignée pathogène d'*E. faecalis* [131]. Un autre type d'antigène a été identifié, faisant partie d'un amalgame de gènes impliqués dans la biosynthèse de polysaccharides, nommé *epa* (enterococcal polysaccharide antigen) [132]. Une étude de caractérisation de cet antigène a pu démontrer, en introduisant le fragment d'ADN d'intérêt dans une souche d'*E. coli*, qu'il y avait expression d'un produit résistant à la protéinase K et que ce produit consistait en un hydrate de carbone. Le séquençage du gène *epa* a permis de démontrer l'implication de ce gène dans la biosynthèse et l'exportation de polysaccharides [133]. Xu et al. [133] ont suggéré, par homologie, que le produit de ce gène consistait en un système de transport ABC important dans l'exportation des polysaccharides d'*E. faecalis*. Ce groupe de gènes serait exprimé lors d'infections chez l'homme et permettrait une résistance à la phagocytose.

#### III.1.4 Biofilm

Durant les dernières années, plusieurs déterminants génétiques impliqués dans la formation de biofilm ont été identifiés chez les entérocoques. La prévalence dans la formation de biofilm varie d'un pays à l'autre. Cela semble dépendre de la souche isolée et de ses facteurs de virulence, ainsi que l'espèce. Également, la formation de biofilm dépend de l'origine d'isolement (environnement, alimentaire ou clinique, et si clinique, le type d'infections). À Rome, en Italie, 80 % des isolats d'*E. faecalis* et 48 % des isolats d'*E. faecium* provenant de patients infectés étaient capables de former des biofilms [134]. À Pamplona, en Espagne, 57% d'isolats d'*E. faecalis* dérivés de différents isolats cliniques produisaient des biofilms [135]. À Sardaigne, en Italie, la production de biofilm a été détectée chez 87 % d'isolats cliniques d'*E. faecalis* et chez 16 % des isolats cliniques d'*E. faecium* [136]. Au Royaume-Uni, parmi 109 isolats sanguins d'entérocoques, 100 % des isolats d'*E. faecalis* et 42 % des *E. faecium* produisent des biofilms [137]. Collectivement, ces données suggèrent qu'*E. faecalis* produit du biofilm plus souvent qu'*E. faecium* et que la formation de biofilm peut être un facteur important dans la pathogénèse des infections à entérocoques. Ainsi, moins d'études ont été effectuées chez l'espèce *E. faecium*.

Une protéine spécifique, la protéine de surface Esp, a démontré la capacité de promouvoir l'adhérence initiale des bactéries à des surfaces abiotiques [135], et d'augmenter la formation de biofilm par les entérocoques [138]. D'autres études suggèrent que le gène *esp* ne semble pas nécessaire ou suffisant pour la production de biofilm chez *E. faecalis* et *E. faecium*

[139, 140]. D'autres facteurs de virulence ou des gènes associés à la régulation de la virulence, incluant le gène de la gélatinase (*gelE*), les gènes *fsr* codant pour un système quorum-sensing à deux composantes, le gène de régulation transcriptionnelle *bop* [127], l'hétérogénéité de la charge de surface [141] et le locus *ebp* codant pour un pilus associé aux endocardites et à la formation de biofilm [142], ont montré leur influence dans la formation de biofilm chez *E. faecalis*, et dans certains cas, chez *E. faecium* [99]. Un opéron récemment décrit, conférant un phénotype de formation élevée de biofilm chez *E. faecalis*, est le locus *bee* (« biofilm enhancer in *Enterococcus* ») [41]. Ce groupe de gènes code pour trois protéines ancrées à la paroi cellulaire et deux sortases putatives associés. L'analyse de l'expression des gènes a confirmé le lien transcriptionnel des gènes *bee-1*, *bee-2* et *bee-3*, mais également au niveau des sortases, *srt-1* et *srt-2*. La séquence déduite en acides aminés de chacune des trois protéines Bee a révélé la présence de séquences signal en N-terminale, de motifs LPXTG conservés, suivi d'une région hydrophobe en C-terminale [41]. Cette observation semble confirmer que les trois protéines sont ancrées à la membrane via un mécanisme sortase dépendant. Les protéines Bee sembleraient également impliquées dans la formation d'un pilus [143]. Le développement d'un biofilm par *E. faecalis* serait enclenché par l'expression des gènes du locus *bee* dû à la formation de structures de type pilus, mais cette hypothèse reste encore à confirmer.

### III. 2 Transfert de gènes de virulence et de résistance

De par leur capacité à s'échanger du matériel génétique entre genres et espèces différentes, les entérocoques sont susceptibles d'être vecteurs de virulence ou de résistance aux antibiotiques [144]. Entre entérocoques, le principal mécanisme décrit est un transfert de plasmides en réponse à une sécrétion de phéromones. Le contact nécessaire à la conjugaison entre 2 entérocoques, le « donneur » et le « receveur », se fait par l'intermédiaire d'une protéine appelée substance d'agrégation. Le nom donné aux phéromones provient du plasmide dont elles induisent spécifiquement le transfert, l'exemple le mieux décrit étant celui de la phéromone cAD1 induisant le transfert du plasmide pAD1 [145]. Les échanges de matériel génétique avec des bactéries d'un autre genre sont moins fréquents [144]. Ils s'effectuent soit par transfert de plasmides peu spécifiques entre bactéries à gram-positif, par exemple le plasmide pAM#1, ce transfert étant parfois favorisé par une phéromone, soit par des transposons que l'on trouve à la fois chez des bactéries à gram-positif et négatif.

## **VI. Pouvoir pathogène des entérocoques**

Les infections communautaires à entérocoques sont essentiellement dues à *Enterococcus faecalis* (80 à 90% des cas) et à *Enterococcus faecium* (5 à 10% des cas). Il s'agit principalement d'infections urinaires compliquées et/ou associées aux soins de pyélonéphrites, de bactériémies et d'endocardites [146-148].

Les entérocoques sont impliquées dans approximativement 10 % de toutes les infections urinaires et 16 % des infections urinaires nosocomiales. Ils se placent au second rang par ordre de fréquence dans les infections urinaires nosocomiales [149]. Les bactériuries à entérocoques sont plus fréquentes chez les patients porteurs de malformations urinaires, ou ayant subi des manœuvres instrumentales sur le tractus urogénital [150].

L'isolement d'un entérocoque dans les urines ou dans un prélèvement pluribactérien peut poser un problème d'interprétation. La difficulté réside dans la différenciation entre une simple colonisation et une réelle infection, problématique soulevée de nouveau lors des épidémies à ERG. Ainsi, Schmitt et al., avaient montré qu'au moins un tiers des souches isolées au laboratoire correspondait plus à une colonisation qu'une infection symptomatique [151].

Le risque de développer une infection à entérocoques est augmenté en cas de grossesse, de diabète ou d'immunodépression. Le plus souvent une procédure invasive à destinée diagnostique ou thérapeutique (sondage urinaire exploration endoscopique par exemple) est l'élément responsable de la bactériémie. Les entérocoques apparaissent au 3ème rang des causes de bactériémies aux Etats Unis et au Canada [152] et représentent 8% des microorganismes responsables d'endocardite [153].

Dans une cohorte internationale menée en 2008, incluant 2781 adultes ayant un diagnostic d'endocardite infectieuse certaine, 10% des cas (8% en Amérique du Sud, 9% en Europe, et 13% en Amérique du Nord) étaient dus à des entérocoques [154]. Les bactéries qui survivent dans le courant sanguin, se fixent sur les valves cardiaques à la faveur d'une cardiopathie préexistante. Les entérocoques représentent environ 10% des microorganismes responsables d'endocardites sur valves natives et 5 à 7% des microorganismes responsables d'endocardites sur prothèse valvulaire [155]. La survenue fréquente d'une insuffisance cardiaque aggrave le pronostic des endocardites à entérocoques dont la mortalité est évaluée à 20% [155].

Les entérocoques peuvent être isolés de suppurations intra-abdominales ou pelviennes par exemple en cas de perforation digestive (péritonite appendiculaire, diverticulaire, perforation d'origine traumatique), ou d'infections hépatobiliaires (cholécystite, abcès hépatique), souvent en association avec les entérobactéries ou bactéries anaérobies du genre *Bacteriodes* [156]. Ils sont également responsables de surinfections de plaies cutanées, de cicatrices chirurgicales ou de brûlures [157]. De plus l'utilisation d'antibiotiques à large spectre, notamment de céphalosporines ou de fluoroquinolones peu efficaces sur les entérocoques et leur association à la vancomycine, entraîne une importante pression de sélection et augmente le risque d'apparition de souches résistantes. Les infections urinaires et les infections du site opératoire, après exérèse des tumeurs sont les plus fréquemment rencontrées [158].

Les infections néonatales constituent une entité pathologique bien distincte. Elles se caractérisent par une survenue précoce d'une bactériémie accompagnée d'une détresse respiratoire et d'une méningite [159]. Les méningites à entérocoques sont rares chez l'adulte et sont favorisées par la fragilité du terrain. Ainsi, parmi 140 cas de méningites à entérocoque, Pintado et al. notaient que 82 cas (59%) étaient diagnostiqués dans un contexte neurochirurgical (après chirurgie neurologique, après traumatisme crânien, associée à du matériel étranger, à une tumeur cérébrale), et 35% des cas survenaient chez des enfants de moins de 10 ans (dont 32 cas avant l'âge d'un an et 18 cas avant 1 mois). Parmi les 58 cas de méningites sans contexte neurochirurgical 27 (47%) avaient un facteur d'immunodépression (immunosuppresseur, néoplasie, infection par le VIH, splénectomie) [160].

Les entérocoques comptent parmi les premiers microorganismes responsables d'infections nosocomiales [158]. Les facteurs de risque d'acquisition d'une infection à entérocoques ont été largement analysés [161]. Ils incluent: une hospitalisation supérieure à quinze Jours, l'administration prolongée d'antibiotiques, une maladie sévère sous-jacente et des interventions instrumentales invasives. Le mode de contamination n'est pas toujours bien établi, mais les contacts inter humains et la transmission par le matériel médical ou par le personnel soignant semblent les plus probables [158].

## V. Glycopeptides et résistance des Entérocoques

Les glycopeptides, et leurs deux représentants en thérapeutique humaine, vancomycine et teicoplanine, constituent une famille importante d'antibiotiques pour le traitement des infections sévères causées par les cocci à Gram positif, en particulier staphylocoques et entérocoques. Les *Pediococcus* spp., les *Leuconostoc* spp. et certaines espèces de *Lactobacillus* spp. présentent une résistance naturelle aux glycopeptides. De même, *Erysipelothrix rhusiopathiae* est généralement considérée comme résistante naturellement à la vancomycine et sensible à la teicoplanine. Ces différentes espèces peuvent faire partie de la flore intestinale, et devront être prises en compte dans les techniques d'isolement des ERG. Les mécanismes de résistance aux glycopeptides chez les *Enterococcus* spp. sont aujourd'hui bien connus, même si de nombreuses découvertes restent à venir : on dénombre au moins 6 phénotypes qui diffèrent par le niveau de résistance, l'expression inductible ou constitutive, le caractère mobile (transposon, plasmide) ou chromosomique...

Après un bref rappel sur la synthèse du peptidoglycane nécessaire à la compréhension de la résistance, ce sont ces différents éléments qui seront détaillés dans ce chapitre, ainsi que l'épidémiologie, les facteurs de risque d'acquisition et l'origine des ERG.

### V.1 Rappels sur la synthèse du peptidoglycane

#### V.1.1 Les différents types de paroi

La paroi constitue une structure rigide (squelette externe) qui maintient la forme de la bactérie et la protège du milieu extérieur, notamment des variations de pression osmotique. Elle contrôle les entrées de nutriments et les sorties de déchets. C'est la cible d'action de nombreux antibiotiques.

L'ultrastructure et la composition chimique de la paroi permettent de classer les bactéries en 4 groupes :

- Les bactéries sans paroi (Mollicutes...).
- Les bactéries ayant une paroi de composition particulière, prenant des colorations particulières (Mycobactéries, Tréponèmes...).
- Les bactéries à Gram - (Figure 6A) : leur paroi est plus fine et plus complexe. A l'extérieur de la fine couche de peptidoglycane (2.5 nm), se trouve une membrane externe, de structure tri-lamellaire classique, phospholipidique. Elle est composée de : phospholipides, et d'une molécule amphiphile, le lipopolysaccharide (LPS). On compte 2 à 3 millions de molécules de LPS par bactérie, il forme 45% de la membrane externe.

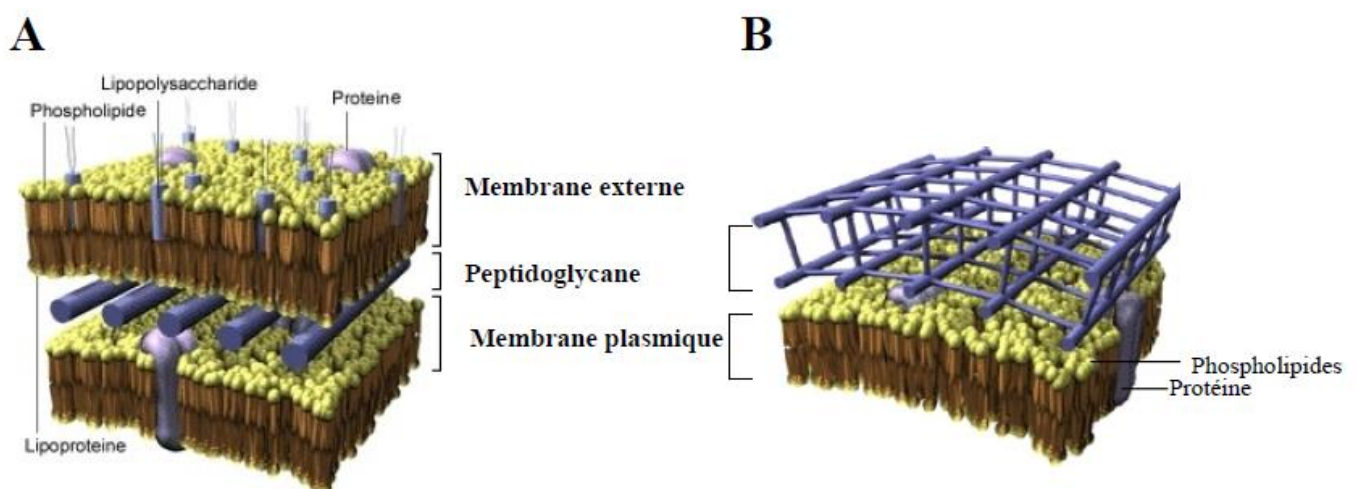
Il est constitué de 3 parties : une extrémité hydrophobe formée par le lipide A, le « core » structure polysaccharidique, et la partie polyosidique polaire émergeant à l'extérieur de la bactérie (spécificité antigénique O). Les molécules de LPS sont reliées entre elles par des ions  $Mg^{2+}$  qui assurent la stabilité de l'ensemble.

Des protéines variées sont insérées dans cette membrane ; elles ont pour la plupart des fonctions importantes, comme les porines qui assurent le transport à travers la paroi des nutriments et de divers composés, ou les adhésines qui assurent la fixation des bactéries sur des supports.

L'espace sous la membrane externe dans lequel se trouve le peptidoglycane, est l'espace périplasmique ; dans cet espace, se trouvent, associées à la membrane cytoplasmique, les PLP ou protéines liant les pénicillines, enzymes assurant la synthèse du peptidoglycane, et les  $\beta$ -lactamases. Ces bactéries ne prennent pas la coloration de Gram et apparaissent en rose (contre-coloration à la fuchsine).

- Les bactéries à Gram + (Figure 6B) : elles possèdent une paroi épaisse (20 à 80 nm), essentiellement constituée de peptidoglycane. Elles prennent la coloration de Gram et apparaissent en violet (coloration au violet de gentiane).

- Les bactéries à Gram – et à Gram + représentent environ 90% des bactéries rencontrées en clinique. La structure de la paroi est un élément très important dans l'étude du mécanisme d'action des antibiotiques : certains agissent au niveau de la synthèse du peptidoglycane, d'autres doivent traverser la paroi pour atteindre des cibles intracellulaires, la présence de la membrane externe représente alors un obstacle supplémentaire.



**Figure 6:** Schéma des parois des bactéries A : à Gram -, B : à Gram +.

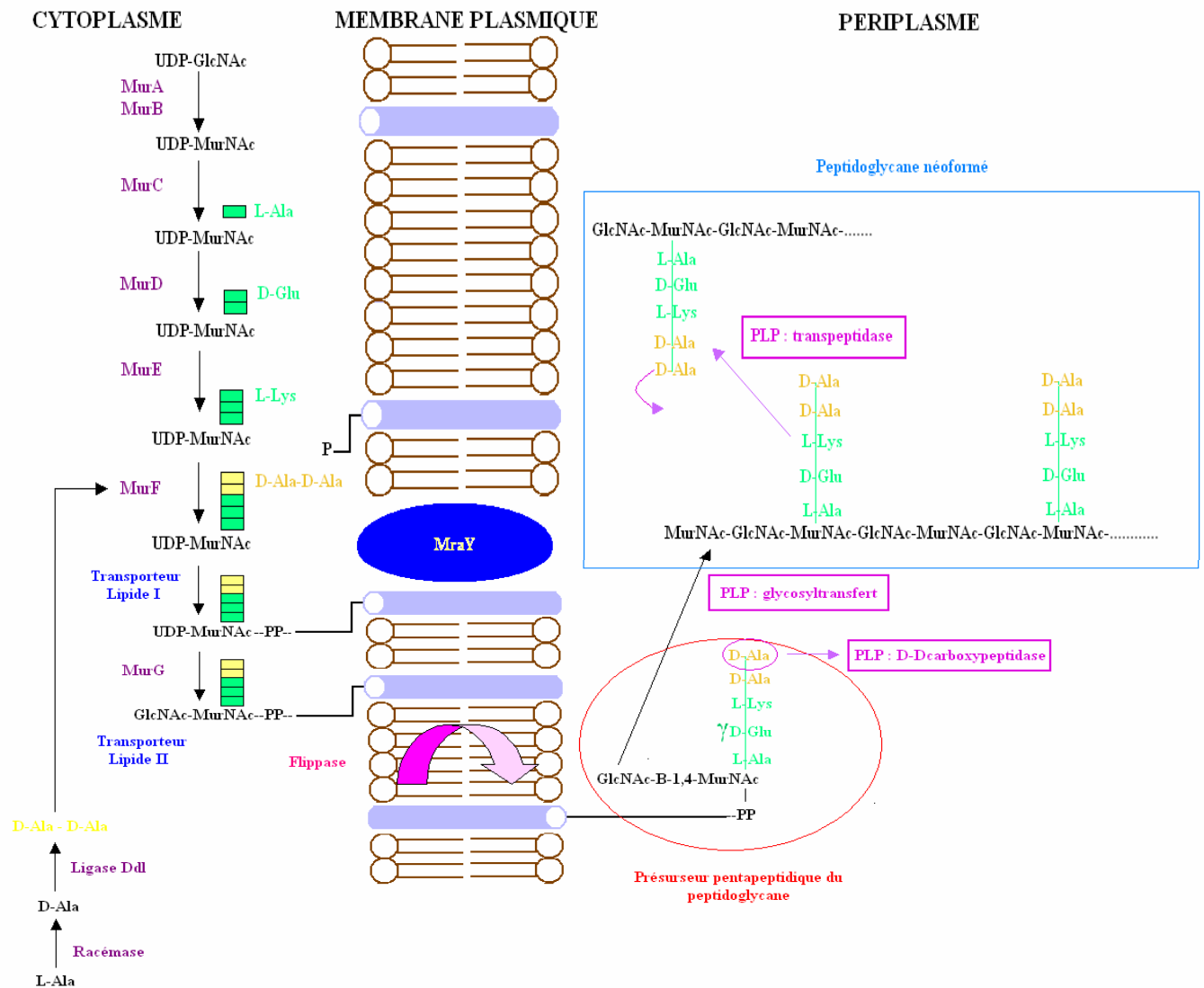
### V.1.2. Rappels sur la synthèse du peptidoglycane

Le peptidoglycane dessine la forme générale de la bactérie, sert de site d'attachement pour des facteurs de virulence ou des adhésines, participe aux modifications morphologiques de la bactérie en réponse à différents facteurs de stress, et son éventuelle fragilité et instabilité entraînent la lyse cellulaire et la mort de la bactérie. C'est une des principales cibles d'action des antibiotiques, en particulier des glycopeptides, c'est pour cela que nous allons en détailler les principales étapes de sa synthèse (Figure 7).

Le peptidoglycane est composé de  $\beta$ -N-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'acide N-acétylmuramique (MurNAc), chaînes polysaccharidiques reliées par des liaisons intermoléculaires à des chaînes peptidiques, formant un réseau organisé de couches superposées. La synthèse du peptidoglycane est initiée par 6 enzymes nommées Mur (MurA à MurF), qui catalysent la formation d'uridine diphosphate (UDP)-MurNAc, à partir d'un précurseur UDP-GlcNAc (**MurA et MurB**). Une chaîne de 5 acides aminés est ensuite ajoutée au niveau du groupement D-lactoyl de l'UDP-MurNAc (**MurC à MurF**). Cette séquence peptidique peut varier selon les espèces bactériennes, mais on retrouve toujours une lysine en position 3 (sert à la formation des ponts interpeptidiques). Elle est inévitablement terminée par le dipeptide DAla-DAla. Le D-Ala est obtenu à partir du L-Ala par action d'une racémase, puis deux unités DAla sont reliées par une **DAla-DAla ligase (Ddl)**, avant d'être associées au précurseur tripeptidique par MurF. Ces deux enzymes ont un rôle très important puisque c'est à ce niveau que va se jouer la résistance aux glycopeptides médiée par les gènes *van*.

La molécule soluble obtenue, **UDP-MurNAc-pentapeptide**, est associée à la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire de **MraY**, une protéine hélicoïdale transmembranaire, au niveau d'un groupement undecaprenyl diphosphate. Cette protéine, aujourd'hui appelée **Lipide I**, interagit ensuite avec **MurG**, une N-acétylglucosaminyl transférase, qui ajoute un groupement soluble UDPGlcNAc. Cette réaction finalise la synthèse du **Lipide II**, le **précurseur disaccharidique dupeptidoglycane**, substrat pour les PLP. Le Lipide II est encore dans le compartiment cytoplasmique. A ce niveau intervient une flippase, qui, par un mécanisme inconnu, permet le transfert au niveau de l'espace périplasmique. Une fois dans cet espace, le **précurseur pentapeptidique** est pris en charge par les PLP : liaison du disaccharide aux chaînes saccharidiques du peptidoglycane néoformé par les **transglycosylases**, coupure du DAla terminal par les **transpeptidases** ou les **D,Dcarboxypeptidases**, et formation des ponts inter-peptidiques entre le DAla en position 4 / et la L-Lys en position 3, des chaînes adjacentes (Figure 7). Ainsi est obtenu le maillage

tridimensionnel parfaitement organisé du peptidoglycane. Le transporteur lipidique est recyclé au niveau cytoplasmique.



**Figure 7:** Principales étapes de la synthèse du peptidoglycane paroi bactérienne.

## V.2 Les glycopeptides et les nouveaux dérivés

### V.2.1 Les glycopeptides : mécanisme d'action, spectre et caractéristiques

Le premier glycopeptide, la vancomycine, a été isolé en 1956 à partir d'échantillons de sols prélevés en Inde et en Indonésie, contenant *Streptomyces orientalis* (aujourd'hui *Nocardia orientalis*). Les glycopeptides sont des molécules complexes, constituées d'un heptapeptide cyclique (dont cinq acides aminés sont communs à tous les glycopeptides) sur lequel viennent se greffer des sucres : glucose et vancosamine dans le cas de la vancomycine, mannose et glucosamine dans le cas de la teicoplanine (extraite d'*Actinoplanes teicomycetus*).

Deux spécialités sont commercialisées à l'heure actuelle :

- **Vancomycine** (VANCOCINE®)
- **Teicoplanine** (TARGOCID®) : cette molécule est moins utilisée du fait, essentiellement, de son coût plus important (à noter qu'elle n'est pas commercialisée aux Etats Unis).

D'abord critiqués pour leur trop grande toxicité, les glycopeptides ont été très utilisés dans les années 1970 suite à l'émergence des *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM), en particulier dans les unités de soins intensifs (USI) aux Etats Unis.

#### - Mécanisme d'action (Figures 8 et 9)

Les glycopeptides sont, au même titre que les  $\beta$ -lactamines, des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane, mais dans sa phase finale, au stade pariétal. La poche vient recouvrir le dipeptide DAla-DAla situé à l'extrémité des précurseurs pentapeptidiques du peptidoglycane, théoriquement prêts à être incorporés dans le peptidoglycane en cours d'élongation (figure 8). Par encombrement stérique, les glycopeptides vont ainsi empêcher l'action des glycosyltransférases et des transpeptidases, bloquant ainsi l'élongation du peptidoglycane. Cela se traduit aussi par une accumulation de précurseurs au niveau cytoplasmique, et par un blocage des transporteurs (en absence de recyclage, impossibilité de transférer de nouveaux pentapeptides au niveau de l'espace périplasmique). Les glycopeptides sont lentement bactéricides (24-48h) mais les mécanismes à l'origine de la bactéricidie sont inconnus à l'heure actuelle.

#### - Spectre d'activité : ETROIT

Les glycopeptides sont actifs exclusivement sur les bactéries à Gram + :

☐ *Staphylococcus* spp., y compris les souches résistantes à la méticilline (SARM), *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. La teicoplanine est inconstamment active sur les staphylocoques à coagulase négative (SCN).

☐ *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium* spp., *Listeria* spp., *Clostridium difficile*.

Les glycopeptides sont inactifs sur les BGN (leur taille les empêchant de pénétrer par la voie des porines), les anaérobies à Gram -, et les bactéries à multiplication intracellulaire.

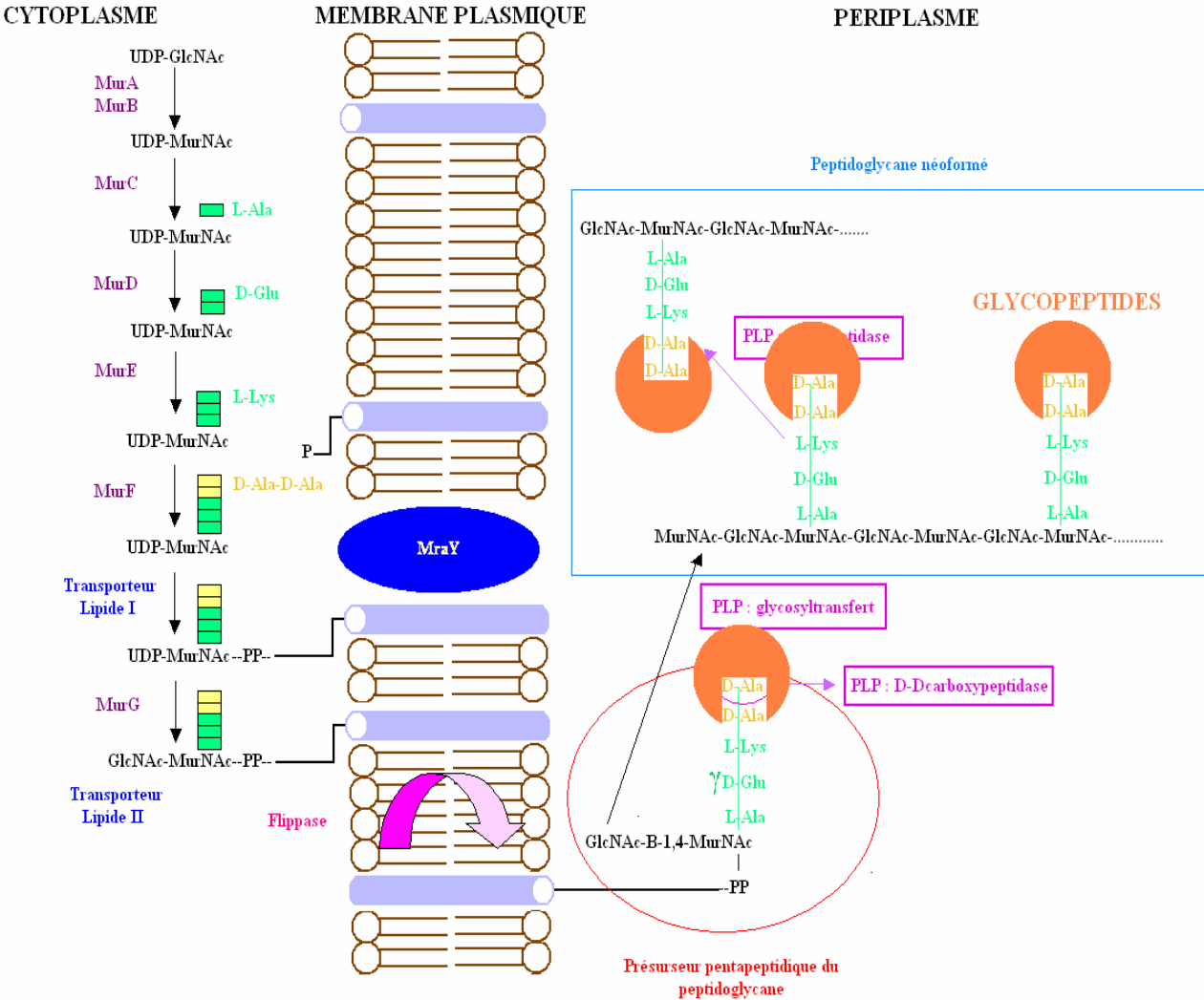


Figure 8: Cible d'action des glycopeptides.

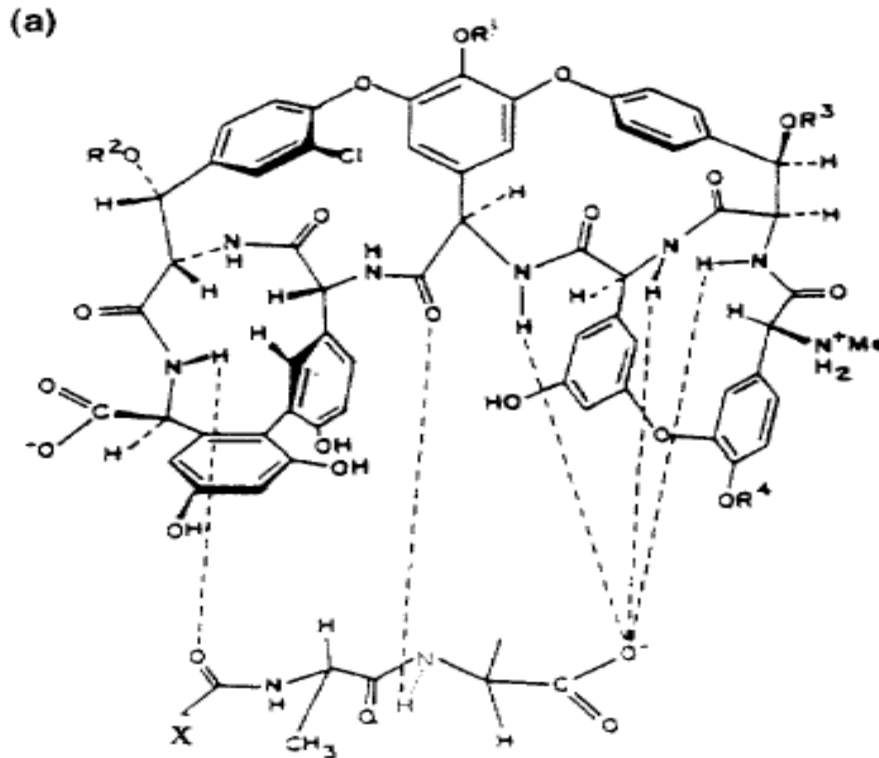


Figure 9: Structure du complexe glycopeptide / dipeptide DAla-DAla [162].

La liaison entre le glycopeptide et l'extrémité Dala-Dala du précurseur du peptidoglycane implique 5 liaisons hydrogène (Figure 9).

#### -Effets indésirables : OTOTOXICITE et NEPHROTOXICITE

La toxicité est essentiellement rénale et auditive. Elle est rare mais doit être prévenue par une hydratation suffisante, une surveillance rigoureuse chez le sujet âgé ou anémique, une adaptation posologique chez l'insuffisant rénal, et la plus grande prudence en cas d'association à d'autres produits potentiellement néphrotoxiques ou ototoxiques tels que les aminosides.

- **ototoxicité à prédominance cochléaire dose-dépendante** : acouphènes, vertiges pouvant conduire à la surdité.
- **néphrotoxicité** : leur administration nécessite des dosages sériques répétés ; les concentrations sériques doivent être comprises au pic entre 30 et 45 mg/L pour la vancomycine et 40 à 50 mg/L pour la teicoplanine, le taux résiduel entre 10 et 15 mg/L pour les deux produits (20 à 30 mg/L dans les endocardites et les infections osseuses).

### - Bilan biologique

Des éosinophilies et neutropénies rapidement réversibles à l'arrêt du traitement, des augmentations des transaminases et des phosphatases alcalines ont été répertoriées.

### - Principales indications

- Infections sévères à SARM : bactériémies, endocardites, péritonites, médiastinites, infections ostéoarticulaires, infections sur cathéter ou chambre implantable.
- Infections à SASM, *Streptococcus* spp., y compris *S. pneumoniae*, *Enterococcus* spp. chez les patients allergiques aux  $\beta$ -lactamines.
- Méningites à *S. pneumoniae* de Sensibilité Diminuée à la Pénicilline (PSDP) : traitement de 1<sup>ère</sup> intention en association à une C3G.

### V.2.2 Les nouveaux lipoglycopeptides : oritavancine, dalbavancine, télavancine

Des avancées significatives ont été réalisées dans le domaine des antibiotiques glycopeptidiques, en particulier ces 20 dernières années. Cela est très important si l'on considère le challenge posé par l'apparition et la dissémination de la résistance aux glycopeptides. Les travaux menés sur d'éventuels dérivés semi-synthétiques à partir de la vancomycine et de la teicoplanine ont révélé trois bons candidats potentiels : oritavancine, dalbavancine et télavancine, dont nous allons conter, en quelques mots, l'histoire.

#### ▪ Oritavancine

L'oritavancine (LY 333328), dérivé de la vancomycine, a été le premier candidat de la nouvelle famille, « les glycopeptides de 2<sup>ème</sup> génération ou lipoglycopeptides » (structure chimique présentée Figure 10).

Le spectre antibactérien, tout comme celui de la vancomycine, est centré sur les cocci à Gram positif, avec cependant une activité étendue aux entérocoques porteurs des gènes *vanA*, aux VRSA, aux staphylocoques et à *S. pneumoniae* (Tableau 2). Alors que les glycopeptides ont une activité bactériostatique sur les entérocoques, l'oritavancine est bactéricide, avec une demi-vie prolongée (18h) [163]. Diverses études cliniques de phase II et III ont montré une non infériorité de l'oritavancine, par comparaison à l'association vancomycine plus cephalexine, tout en permettant une réduction de la durée de traitement [164].

---

- **Dalbavancine**

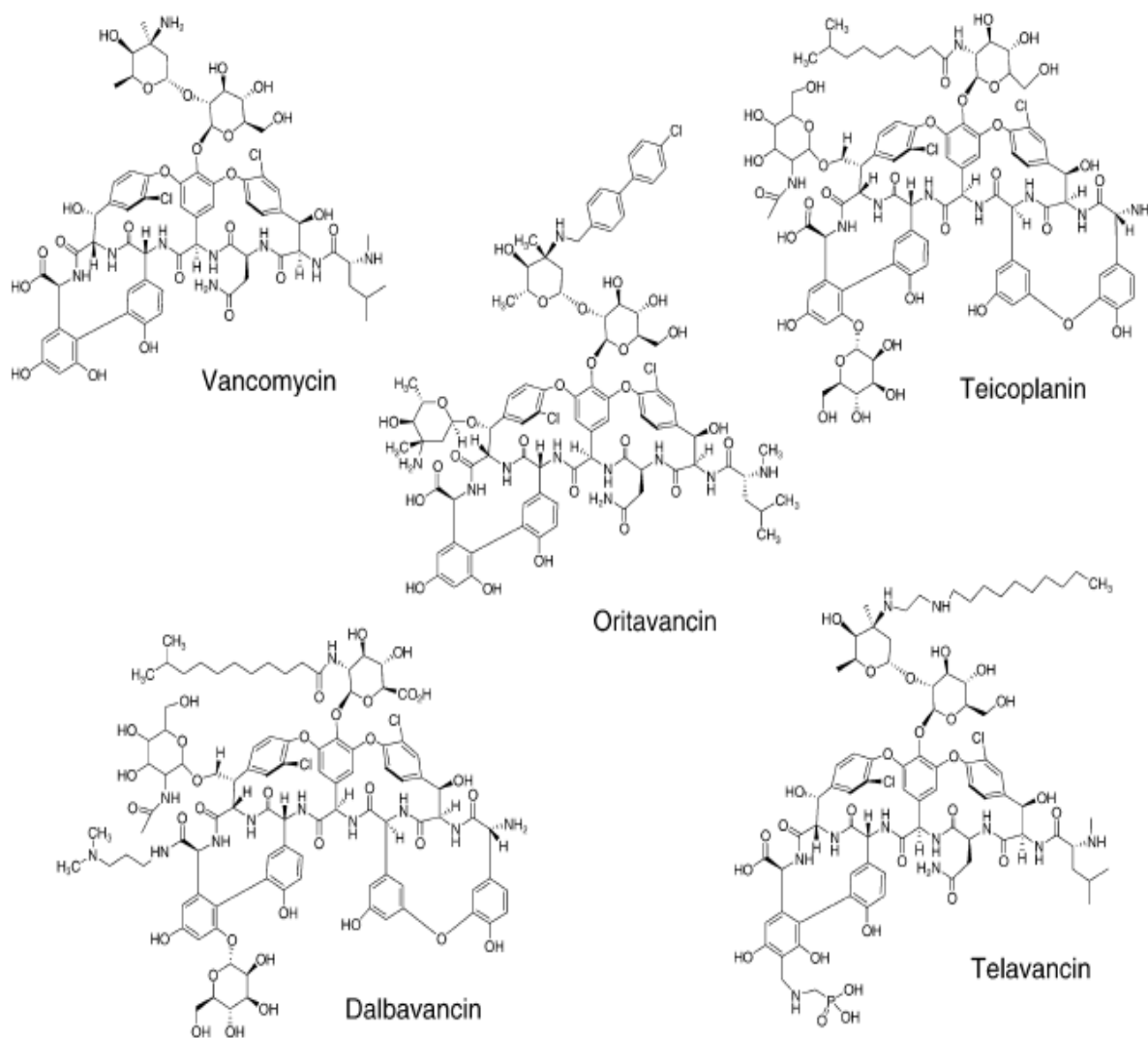
Ce dérivé de la teicoplanine est le plus avancé en termes d'études cliniques. Le squelette de la teicoplanine a été modifié par ajout d'un groupement amide au niveau C terminal et par modification du groupement acylglucosamine hydrophobe (Figure 10). Son spectre d'activité est plus restreint que celui de l'oritavancine, avec par exemple une absence d'activité sur les ERG *vanA*, mais améliore l'activité sur les SCN et *S. pneumoniae*, par comparaison à la teicoplanine (Tableau 2) [163]. Cependant, les ratios CMB/CMI sont supérieurs à ceux des glycopeptides (activité bactériostatique), et la forte liaison aux protéines plasmatiques (>98%) laisse suggérer une activité inférieure *in vivo*, aux glycopeptides [163]. Les études cliniques ont montré une supériorité à la vancomycine chez *S. aureus*, et une non-infériorité au linézolide, avec une demi-vie prolongée autorisant uniquement deux administrations par semaine [165].

- **Telavancine**

Les objectifs de la recherche sur la telavancine étaient (i) d'augmenter l'activité bactéricide de la vancomycine, (ii) restaurer l'activité sur les souches porteuses de gènes *van*, et (iii) améliorer les paramètres pharmacocinétiques/pharmacodynamiques en autorisant une administration par jour. Pour cela, un groupement decyl-aminopropyl a été ajouté au niveau du dérivé vancosamine, et un substituant hydrophile méthylamino-phosphonate a été introduit en position résorcinol (Figure 10). La solubilité a été améliorée et la formulation facilitée par utilisation de hydroxyl-propyl- $\beta$ -Dcyclodextrine comme excipient dans les préparations parentérales [163]. La telavancine a une activité bactéricide, temps et concentration dépendante (y compris sur les ERG *vanA* et les VRSA, Tableau 2), avec un effet post-antibiotique prolongé [166]. Des études cliniques de phase II et III sont actuellement en cours, et ont montré une équivalence de la telavancine aux traitements standards dans les infections de la peau et des tissus mous [167].

**Tableau 2:** Comparaison des activités antibactériennes (CMI) des lipoglycopeptides synthétiques avec la vancomycine [163].

		Oritavancin	Dalbavancin	Telvancin	Vancomycin
MRSA	MIC range	0.12-4	0.06-1	≤ 0.06-2	0.5-4
MSAA	MIC range	0.12-2	0.06-0.5	0.12-2	0.25-2
MR-CoNS	MIC range	0.25-4	0.06-1	0.12-2	1-4
MS-CoNS	MIC range	0.25-1	≤0.03-0.25	0.12-2	0.12-1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	MIC range	≤0.002-0.06	0.008-0.12	0.004-0.03	0.25-2
Beta-hemolytic streptococci	MIC range	0.016-0.12	≤0.03-0.12	0.03-0.12	0.5
<i>Enterococcus</i> spp, vancomycin-susceptible	MIC range	0.06-0.25	≤0.03-1	0.06-1	0.25-4
<i>Enterococcus</i> spp, VanB	MIC range	0.12-2	0.02-2	0.12-2	8-128
<i>Enterococcus</i> spp, VanA	MIC range	1-4	0.5->128	0.12-8	>128



**Figure 10:** Structure chimique des glycopeptides, et des nouveaux lipoglycopeptides [163].

Afin de comprendre le mécanisme d'action des glycopeptides de 2ème génération, de nombreuses équipes ont montré que ces nouveaux dérivés agissent (i) par liaison directe et inhibition des transglycosylases, (ii) par inhibition de la synthèse des lipides, et (iii) par action directe sur la membrane cytoplasmique (désorganisation et fuite des constituants) [168]. Les analogues lipoglycopeptidiques ne nécessitent donc pas la fixation sur le peptidoglycane, au niveau des précurseurs pentapeptidiques néoformés [169].

### V.3 Entérocoques et antibiotiques :

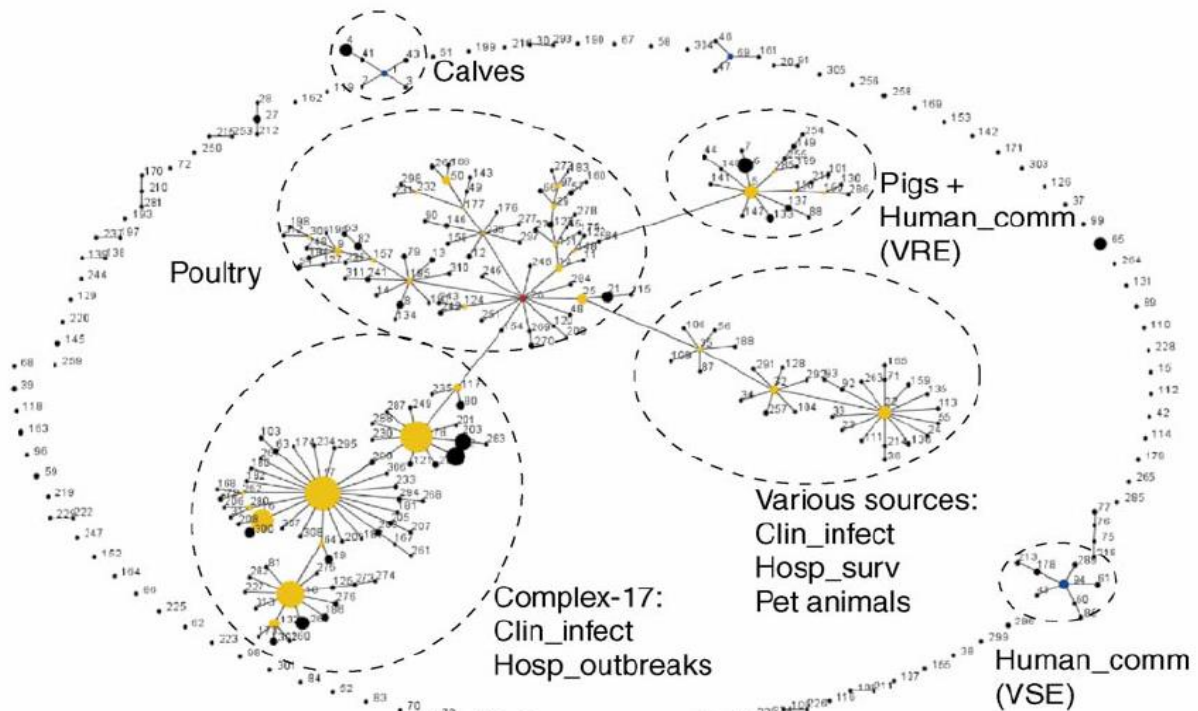
Des bactéries naturellement résistantes, les entérocoques occupent aujourd'hui une place importante en pathologie et posent bien souvent un problème thérapeutique du fait de leur résistance naturelle à la plupart des antibiotiques : céphalosporines, monobactames, lincosamides pour *E. faecalis*, résistance de bas niveau aux aminosides (avec conservation de la synergie avec les  $\beta$ -lactamines), acide fusidique, fosfomycine. Ils sont par ailleurs « tolérants » aux pénicillines (rapport CMB/CMI > 32), en raison d'une faible affinité de leurs PLPs (en particulier la PLP5). A cela s'ajoute une résistance fréquente à l'ampicilline (pour *E. faecium* en particulier, avec conservation de l'activité de l'imipénème), du fait d'une hyperproduction ou d'une altération de la PLP5, ainsi qu'une résistance acquise à haut niveau aux aminosides, aux fluoroquinolones, aux tétracyclines, aux macrolides-lincosamides-synergistines-kétolides... La synergie bactéricide entre les  $\beta$ -lactamines ou les glycopeptides, et les aminosides, est indispensable au traitement d'infections sévères telles que les endocardites et les méningites [170]. Cette synergie s'explique par le fait que la pénicilline se fixe sur les PLP, ce qui induit une déstructuration de la paroi et permet l'accumulation intracytoplasmique de l'aminoside.

Jusqu'à la fin des années 1980, la vancomycine était le seul antibiotique à notre disposition pour faire face aux infections dues à des entérocoques multirésistants. L'émergence de souches résistantes aux glycopeptides a fait naître l'inquiétude d'une impasse thérapeutique. Peu de molécules restent alors disponibles : quinupristine-dalfopristine (nécessitant une voie veineuse centrale pour cause de veinotoxicité) et linézolide (antibiotique hématotoxique, pouvant entraîner des neuropathies périphériques au delà de 21 j de traitement, avec risque de cécité irréversible). Cependant, la quinupristine-dalfopristine est presque toujours inactive sur *E. faecalis* du fait de la résistance intrinsèque de cette espèce à la dalfopristine (efflux). Et les premières souches d'*Enterococcus faecium vanA* résistantes au linézolide ont été décrites [171].

#### V.4 Epidémiologie de la résistance

Les infections à entérocoques sont difficiles à traiter, non seulement du fait de la multiplication des résistances, mais aussi du fait que ce sont des bactéries « tenaces », avec une grande capacité de dissémination entre patients au sein d'un service hospitalier. Les glycopeptides ont été commercialisés dans les années 50. D'abord réservés comme traitement de deuxième intention du fait de leur néphrotoxicité et de leur ototoxicité non négligeables, leur usage a connu un regain d'intérêt avec l'apparition des SARM. Le premier isolat clinique d'*Enterococcus* spp. résistant à la vancomycine a été décrit en France en 1988 [172], puis rapidement en Angleterre [173] et aux Etats Unis [174]. Deux phénomènes rendent compte de la dissémination de cette résistance : des épidémies de souches clonales d'ERG dans les hôpitaux et le transfert horizontal de plasmides entre souches d'*E. faecium*, et d'*E. faecium* à d'autres espèces d'entérocoques, dont *E. faecalis*. L'apparition de cette résistance est relativement tardive si l'on considère le délai depuis la mise sur le marché des glycopeptides, c'est-à-dire presque 40 ans. Ce délai peut être comparé à celui, beaucoup plus court, d'apparition de la résistance à la pénicilline G chez les staphylocoques (commercialisation en 1941, premières résistances en 1944), ou même de la résistance à la méticilline (mise sur le marché en 1959, premières résistances en 1961). Depuis ces premières descriptions, leur prévalence connaît une augmentation considérable.

Les données épidémiologiques recueillies ces 20 dernières années ont montré l'émergence d'entérocoques, en particulier *E. faecium*, comme pathogènes responsables d'infections nosocomiales, qui semblent être due à l'expansion d'un complexe clonal (CC-17) [175, 176]. La structure de la population d'*E. faecium* a été élucidée par MultiLocus Sequence Typing (MLST) et a révélé l'existence de ce clone, associé à la majorité des épidémies hospitalières et des infections cliniques sur les cinq continents. La répartition des *E. faecium* dans différents complexes clonaux est présentée (Figure 11).



**Figure 11:** Répartition en clones de 855 souches d'*E. faecium* sur la base des profils alléliques obtenus par MultiLocus Sequence Typing ; selon l'algorithme eBURST [175].

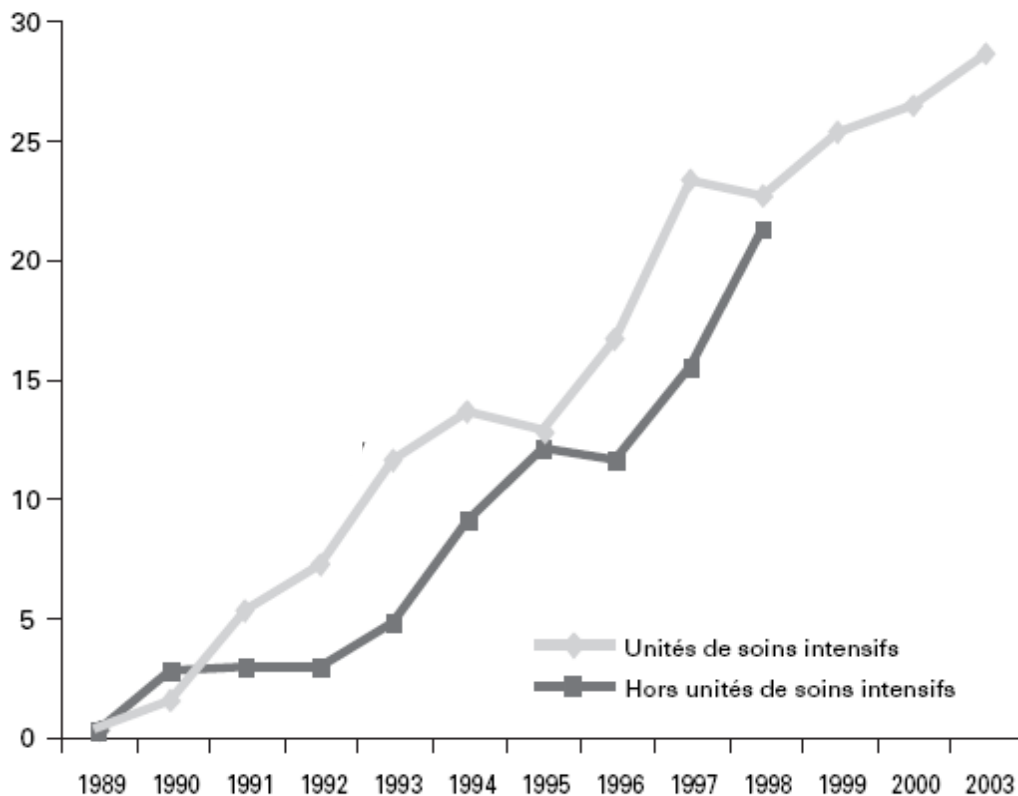
Le clone CC-17 regroupe l'ensemble des souches isolées d'infections cliniques et d'épidémies hospitalières, ainsi que d'autres souches retrouvées soit chez les animaux (volailles, bétail, cochons, animaux domestiques), soit chez l'Homme lors de cas sporadiques.

Ce complexe clonal CC-17 est corrélé à la résistance à l'ampicilline et aux fluoroquinolones, ainsi qu'à la présence d'un îlot de pathogénicité, portant les gènes *esp* et *hly* (deux gènes de virulence codant respectivement une « enterococcal surface protein » et une hyaluronidase) [177]. Les études préliminaires par MLST suggèrent l'existence de complexes clonaux hospitaliers similaires chez *E. faecalis* [175]. Ces données suggèrent que l'adaptation de CC-17 au milieu hospitalier s'est effectuée par étapes, impliquant l'acquisition séquentielle (transfert horizontal de gènes, recombinaisons, mutations) de mécanismes procurant à ce complexe clonal un avantage sélectif certain. Cela a résulté en une population d'entérocoques particulièrement bien adaptés à la survie et à la dissémination dans les hôpitaux. Dans une étude, Werner et al. ont réalisé l'étude épidémiologique de souches d'ERG isolées dans divers hôpitaux allemands. Ils ont ainsi montré que (i) toutes les souches appartiennent au CC-17 ; (ii) expriment une résistance à l'ampicilline, à la vancomycine, à la ciprofloxacine ; (iii) seules 4 souches ne possèdent aucun marqueur de virulence (ni *esp*, ni *hly*) ; et (iv) possèdent un cluster *vanA* variable [178]. Une étude similaire par Borgmann et al. a montré des différences entre les souches nosocomiales et communautaires. Toutes les souches d'ERG

responsables d'infections nosocomiales font partie du complexe clonal CC-17, avec une résistance à l'ampicilline ; les souches communautaires font partie d'autres clones, et sont généralement porteuses du gène *esp* [179].

#### ▪ Dans le monde

Selon le rapport du National Healthcare Safety Network (NHSN) en 2007, 30% des entérocoques isolés dans les USI aux Etats Unis sont des ERV [180]. Dans ces unités, la proportion de souches d'ERG est passée de moins de 1% en 1989 à 28% en 2003 (Figure 12). Les rapports les plus récents concernant les Etats Unis sont particulièrement alarmants puisque certains auteurs font état de plus de 70% de ERG parmi les entérocoques isolés d'hémocultures, dans certains services hospitaliers des épidémies hospitalières ont aussi été signalées en Asie [181] et en Australie. Mais par comparaison aux Etats Unis et à l'Europe où VanA est le mécanisme de résistance prédominant, la résistance de type VanB prédomine en Australie et à Singapour [182]. Quant à l'Amérique latine, les ERG sont responsables de 1 à 5% des septicémies [183].



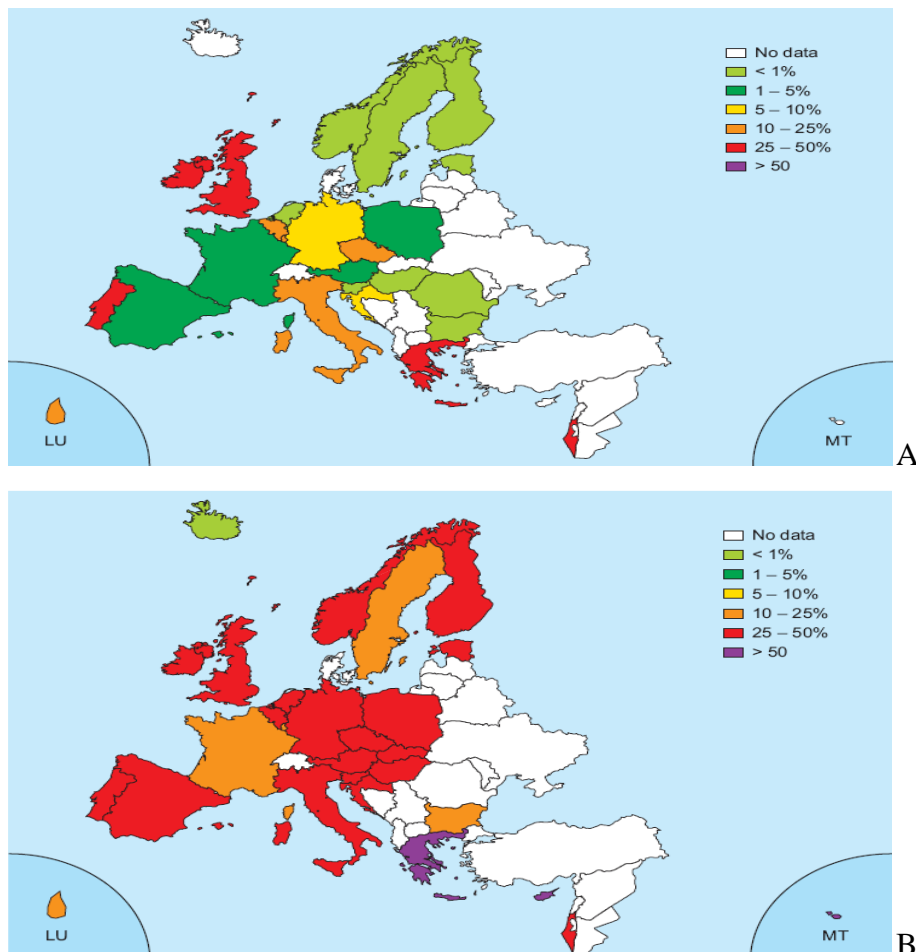
Source : CDC

**Figure 12:** Proportion de résistance à la vancomycine chez les entérocoques aux Etats Unis de 1989 à 2003 [184].

- En Europe

La situation est bien moins alarmante quant à l'état des lieux en Europe : 0.9% des souches d'*E. faecalis* et 9% des souches d'*E. faecium* isolées d'infections nosocomiales sont des ERG [185]. Dans la plupart des pays, la fréquence de la résistance à la vancomycine est < 1%, exception faite de la Grèce (37%), de l'Irlande (31%), ou d'Israël (46%) (Figure 13, A). Durant les 4 dernières années, certains pays ont connu une augmentation significative de la résistance aux glycopeptides, cette augmentation correspondant généralement à des épidémies hospitalières. De telles notifications ont par exemple été réalisées en Grande Bretagne [186], en Italie [187] ou en France [184].

Concernant la résistance de haut niveau aux aminosides, la fréquence est très variable selon les pays européens : d'une absence en Islande à 54% en Grèce. La majorité des pays se situent entre 25 et 50%, à l'exception de la France (15%), de la Suède (19%) et de la Bulgarie (24%) (Figure 13, B) [185].



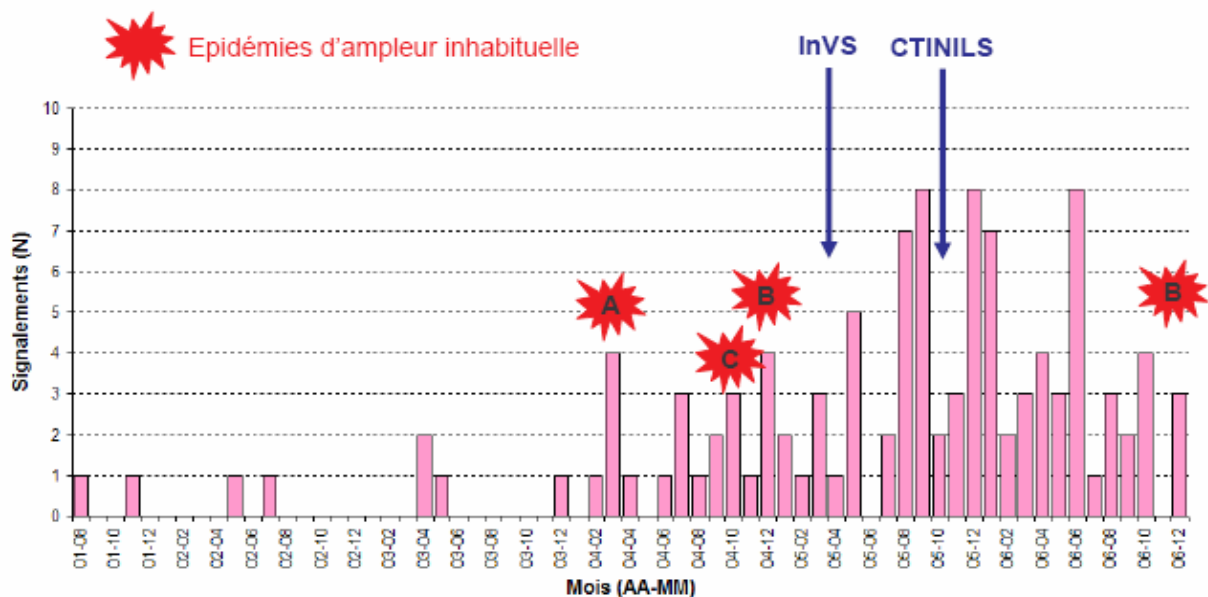
**Figure 13:** *Enterococcus faecium* : fréquence de la résistance à la vancomycine (A) et de la résistance de haut niveau aux aminosides (B) en Europe en 2005 [185].

### ▪ En France

En France, la situation est restée stable jusqu'en 2004 (prévalence estimée à moins de 2%), bien que de petites épidémies aient été signalées. Paradoxalement, des études datant de la fin des années 1990 avaient montré, en milieu extra-hospitalier, qu'un pourcentage non négligeable de personnes saines héberge des ERG dans les selles, jusqu'à 9% dans une population de sujets jeunes et en bonne santé [188].

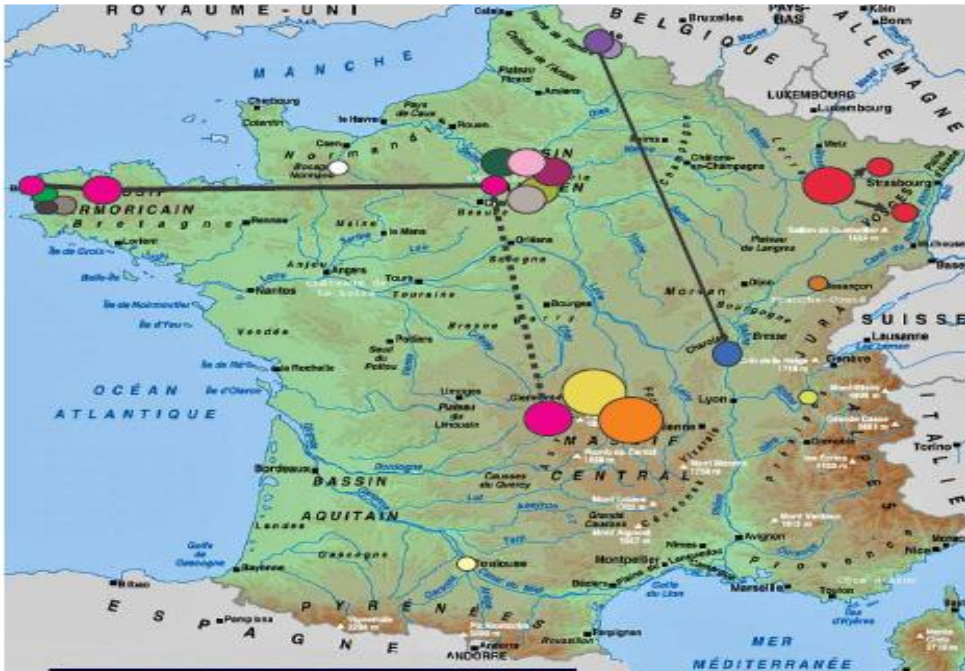
Entre 2001 et 2006, 111 signalements ont été effectués par 63 établissements différents, regroupant 763 cas au total (24 cas d'infections groupés) : 20% d'infections et 80% de colonisations (Figure 14).

Trois centres hospitaliers ont fait l'objet d'épidémies d'ampleur inhabituelle (Nancy, Clermont Ferrand et divers hôpitaux de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, APHP). Parmi ces signalements, 80% étaient des *E. faecium*, 15% des *E. faecalis*, et 5% des *Enterococcus* spp.



**Figure 14:** Nombre de signalements d'isolement des entérocoques résistants aux glycopeptides en France, entre 2001 et 2006 (données de l'Institut de veille sanitaire au 11/01/2007).

Parmi les souches isolées en milieu hospitalier, 17 clones différents ont pu être identifiés, avec généralement un clone prédominant par établissement de soins, ou par région (Figure 15).



**Figure 15:** Répartition des différents clones d'entérocoques résistants aux glycopeptides, en France, 2005-2006.

De façon surprenante la majorité des ERG sont des *E. faecium*. Les données du SENTRY Program en 2003, ont montré que parmi les souches résistantes aux glycopeptides, 91% étaient des *E. faecium*, et 7.8% des *E. faecalis* [189]. Aux Etats Unis, il a été montré que la résistance à la vancomycine et à la teicoplanine est plus fréquente chez les souches d'*E. faecium* que chez les souches d'*E. faecalis* isolées de bactériémies nosocomiales entre 1995 et 1997. La prévalence des *E. faecium* résistants à la vancomycine a augmenté de 26.2% en 1995 à 39.2% en 1996, pour atteindre 48.8% en 1997. Pour *E. faecalis*, cette prévalence est restée minime, avec des valeurs respectivement de 1.9%, 1.3% et 1.4% pour les mêmes années [190]. Aucune explication n'a été trouvée à ce jour pouvant expliquer la prévalence plus importante des gènes de résistance chez *E. faecium*.

## V.5 Mécanismes de la résistance chez les entérocoques

### V.5.1 Gènes van chez les entérocoques

Les glycopeptides n'interagissent pas avec les enzymes de la biosynthèse de la paroi mais forment des complexes avec les précurseurs du peptidoglycane et empêchent leur incorporation dans la paroi. L'activité des glycopeptides n'est donc pas déterminée par leur affinité pour des enzymes cibles mais par la spécificité de substrat des enzymes qui détermine

la structure des précurseurs du peptidoglycane. La résistance aux glycopeptides est due à la présence d'opérons ou de clusters de gènes qui codent pour :

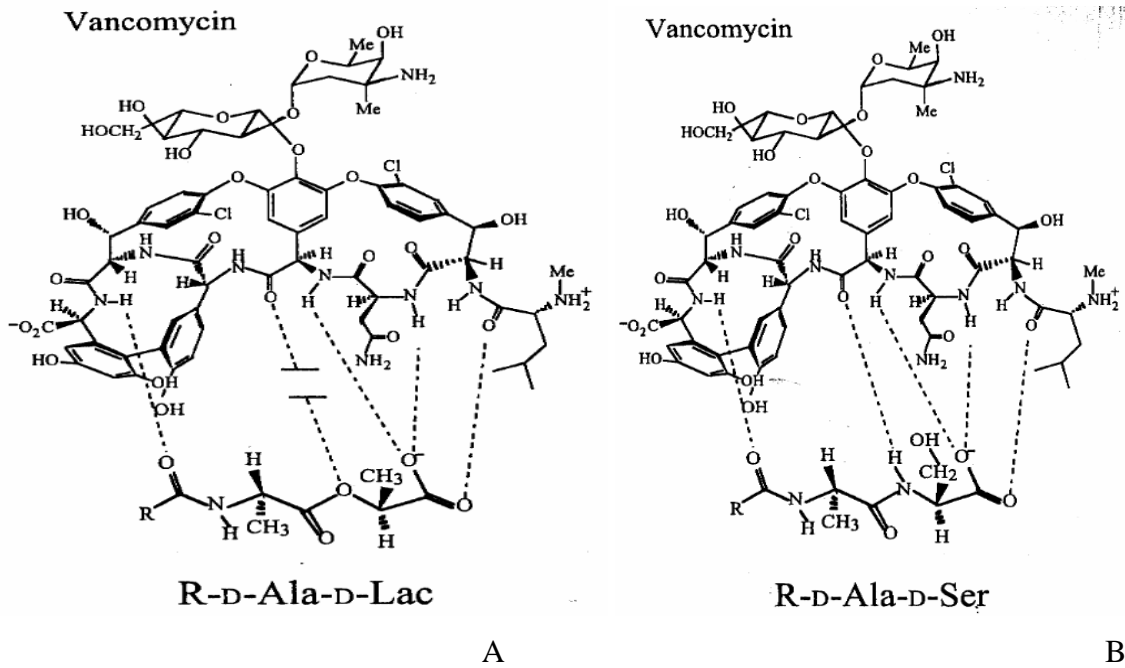
- (i) la synthèse de précurseurs de faible affinité dans lesquels le DAla terminal est remplacé par un DLac ou une DSer ;
- (ii) l'élimination des précurseurs de haute affinité normalement synthétisés par la bactérie [191].

- **Support génétique de la résistance**

Cette résistance aux glycopeptides existe de façon naturelle chez certaines espèces d'entérocoques. Ainsi, la résistance naturelle de type VanC est présente chez les espèces *E. gallinarum* [192], *E. casseliflavus* et *E. flavescens* [193], qui sont naturellement résistantes à des faibles concentrations de vancomycine, mais sont sensibles à la teicoplanine. Trois gènes sont requis pour l'expression de la résistance VanC :

- une **racémase VanT** : possède des activités sérine et alanine racémase, et son domaine transmembranaire est responsable de la capture de LSer dans le milieu extérieur.
- une **ligase VanC** : catalyse la formation du dipeptide DAla-DSer qui remplace le DAla DAla dans les précurseurs du peptidoglycane.
- une protéine **VanXYC**, qui possède à la fois les activités **D,D-dipeptidase** et **D,D-carboxypeptidase**. Elle est responsable de l'hydrolyse des résidus DAla terminaux. Cependant, cette enzyme est incapable d'agir au niveau des précurseurs pentapeptidiques ; sa séquence est plus proche de VanY que de VanX.

La substitution du DAla terminal par une DSer n'altère pas les liaisons hydrogène mais le remplacement du groupement méthyl par un hydroxyméthyl résulte en un encombrement stérique important, qui entraîne une affinité réduite pour la vancomycine (Figure 16A) [191]. Trois clusters de gènes *vanC* ont été décrits : *vanC1* chez *E. gallinarum*, *vanC2* chez *E. casseliflavus* et *vanC3* chez *E. flavescens*. Les gènes *vanC2* et *vanC3* présentent 97 à 100% d'identité, il est donc très difficile de distinguer les deux espèces porteuses de ces gènes.



**Figure 16:** Interaction entre la vancomycine et les précurseurs du peptidoglycane chez les bactéries sensibles aux glycopeptides.

- (A) DAla-DLac du peptidoglycane (substitution d'un groupement NH par un oxygène, prévenant la formation de la liaison hydrogène centrale).
- (B) (B) DAla-DSer (substitution du groupement CH<sub>3</sub> par CH<sub>2</sub>OH, induisant un encombrement stérique) [170].

La structure des opérons responsables de la résistance acquise est très semblable à celle de l'opéron *vanC*. La résistance acquise de type VanA a été la première décrite et elle est médiée par le **transposon Tn1546** [194]. Elle est caractérisée par une résistance à haut niveau à la vancomycine et à la teicoplanine. L'opéron *vanA* code pour :

- **I. des enzymes permettant la synthèse de précurseurs de faible affinité :**

1. une **deshydrogénase VanH** : réduit le pyruvate en D-Lac (Figure 17).
2. une **ligase VanA** : catalyse la formation d'une liaison ester entre DAla et DLac (Figure 17).

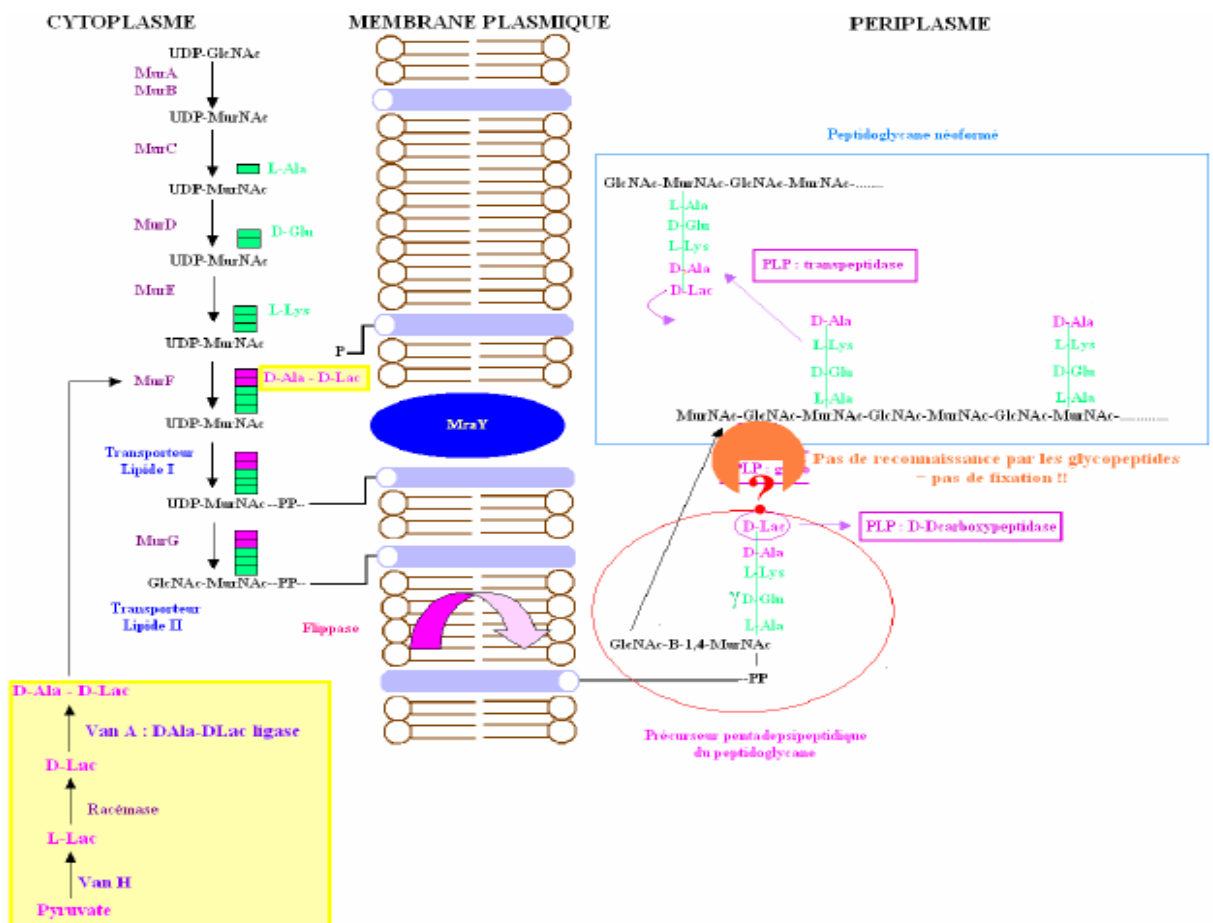
Le depsipeptide DAla-DLac remplace ainsi le dipeptide DAla-DAla dans la voie de synthèse du peptidoglycane. Cette substitution élimine une liaison hydrogène essentielle pour la fixation des glycopeptides et réduit considérablement leur affinité pour la cible (Figure 16B). Les PLP tolèrent la substitution de DAla en DLac. Cependant, les transpeptidases responsables de l'assemblage final du peptidoglycane semblent avoir une cinétique d'activité

différente sur les précurseurs DAla ou DLac, ce qui peut modifier la densité des ponts interpeptidiques [170]. Cela peut aussi avoir une autre incidence. Ainsi, des auteurs ont montré que l'induction de la résistance aux glycopeptides est associée à une augmentation de la sensibilité aux  $\beta$ -Lactamines chez certaines souches d'entérocoques [195].

- **II. une enzyme permettant l'élimination des précurseurs de haute affinité :**

**3. une dipeptidase VanX :** hydrolyse le dipeptide DAla-DAla synthétisé par la ligase Ddl de la bactérie (Figure 17). En effet, la coproduction de précurseurs se terminant par DAla-DAla ne permet pas l'expression de la résistance aux glycopeptides. Dans ces conditions, la liaison des glycopeptides aux précurseurs pentapeptidiques normaux séquestre les transporteurs lipidiques au niveau de la face externe de la membrane cytoplasmique, ce qui prévient la translocation d'autres précurseurs, y compris ceux se terminant par DAla-DLac [170].

L'interaction des glycopeptides avec leur cible DAla-DAla est ainsi prévenue par l'élimination des précurseurs pentapeptidiques terminés par DAla, à la fois par l'action de VanX et de VanY, une enzyme accessoire [191] (Figure 18).

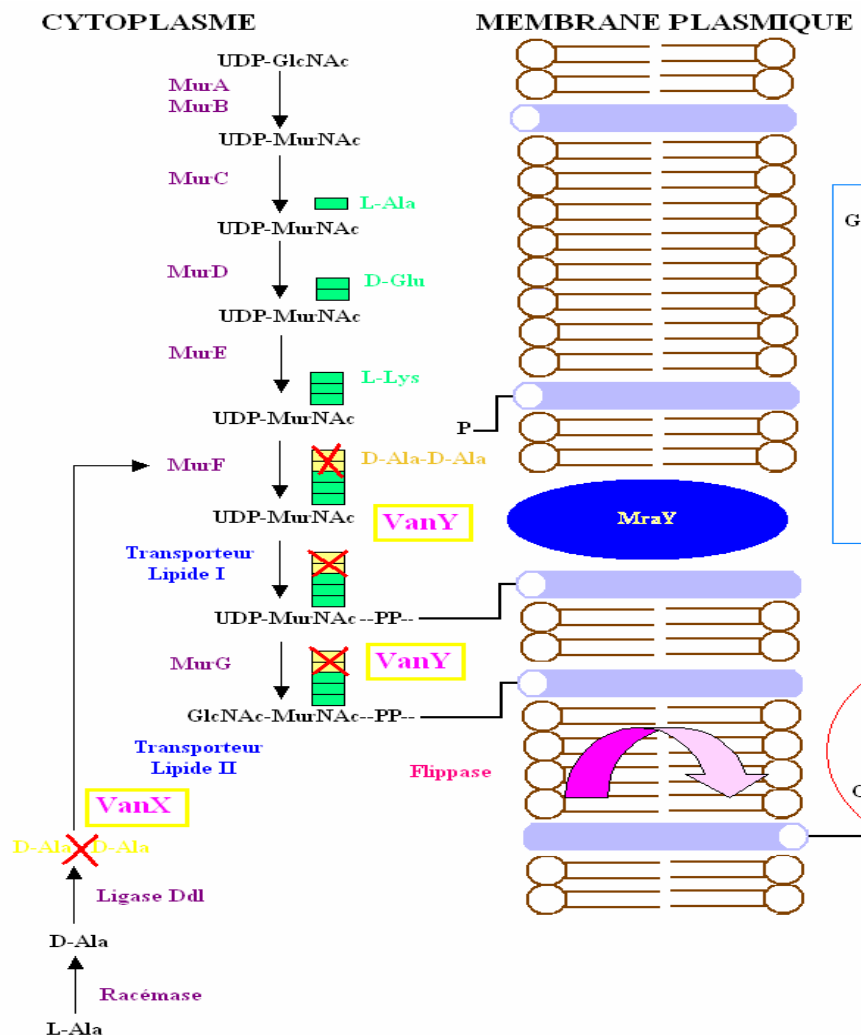


**Figure 17:** Représentation schématique de la synthèse des précurseurs pentapeptidiques chez une souche d'*Enterococcus faecium* vanA et les niveaux d'action de VanA et VanH.

- III. Ainsi que des enzymes accessoires, non essentielles à l'expression de la résistance, mais augmentant le niveau de résistance à la vancomycine et à la teicoplanine, respectivement :

- une D,D-carboxypeptidase **VanY** : enlève le DAla C terminal des précurseurs lorsque l'élimination du DAla-DAla par VanX est incomplète. Cette carboxypeptidase Zn<sup>2+</sup> dépendante est insensible à l'action des pénicillines.

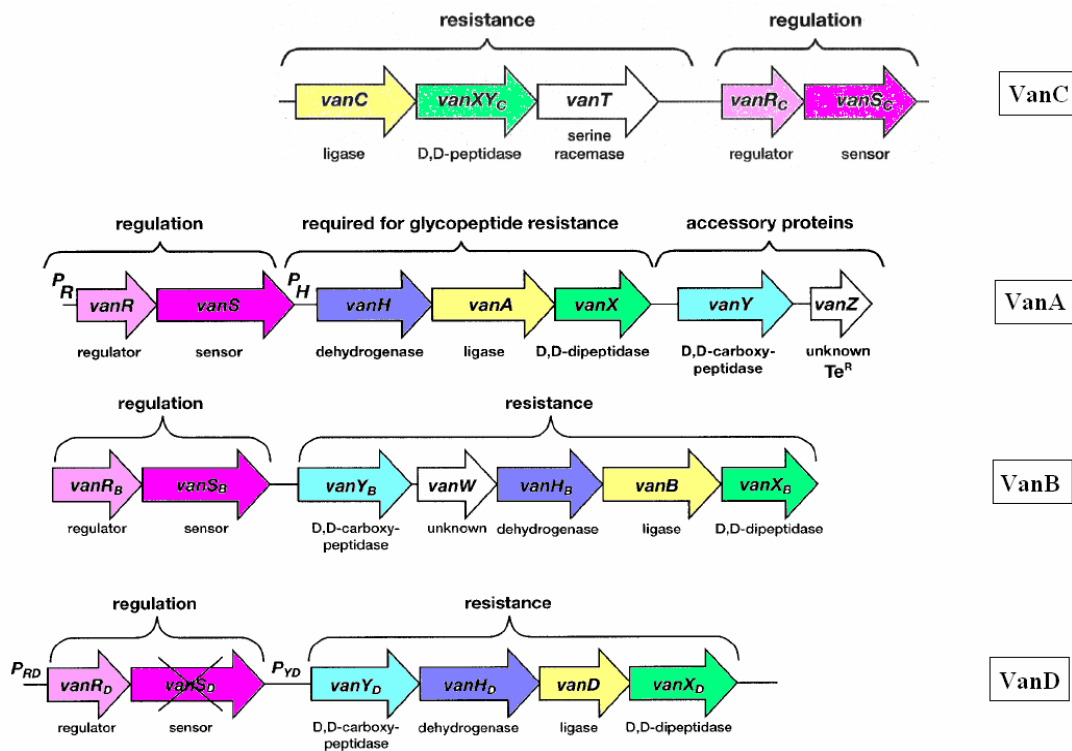
- **VanZ**, protéine de fonction inconnue, conférant par sa seule expression une résistance à la teicoplanine, par un mécanisme demeurant encore inconnu [196].



**Figure 18:** Représentation schématique de la synthèse des précurseurs pentapeptidiques normaux chez une souche d'*Enterococcus faecium vanA*. Niveaux d'action de VanX et VanY.

Une étude menée au Portugal a montré la diversité importante du transposon Tn1546, reflet d'une épidémiologie complexe, associant à la fois une dissémination clonale et la dissémination du plasmide porteur de ce transposon au sein de différentes souches. L'hétérogénéité apparente de ce transposon chez les entérocoques isolés chez l'Homme, chez l'animal et dans l'environnement est le reflet de nombreux échanges génétiques et de l'évolution parallèle d'éléments génétiques à haute capacité de dissémination [197].

La structure comparée des différents types d'îlots de résistance (*vanC*, *vanA*, *vanB*, *vanD*) est Présentée dans la figure 19.



**Figure 19:** Résistances de type VanC, VanA, VanB et VanD chez les entérocoques.

L'organisation des différents types d'opéron, les flèches indiquent les gènes et la direction de la transcription. PR : Promoteur des gènes de régulation ; PH : Promoteur des gènes de résistance [191].

La résistance acquise de type VanD est due à la production constitutive de précurseurs du peptidoglycane terminés par DALa-DLac. La ligase Ddl est inactive. Ainsi, les souches porteuses des gènes *vanD* ne pourraient se développer qu'en présence de vancomycine, la synthèse du peptidoglycane dépendant exclusivement de cette voie inductible. Ce n'est cependant pas le cas puisque le cluster *vanD* est exprimé de façon constitutive, par le jeu de mutations au niveau du sensor VanSD et du régulateur VanRD [191].

- **Régulation de la résistance aux glycopeptides**

L'expression de la résistance VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, et VanG est régulée par un système à deux composantes VanS/VanR, un système de transduction du signal. Pour les opérons *vanA*, *vanB*, *vanD* et *vanG*, les gènes codant ce double système sont situés en amont des gènes de résistance, alors que pour *vanC* et *vanE*, ils sont situés en aval [170]. Nous prendrons l'exemple de la résistance VanA pour expliquer le fonctionnement de ce système de régulation.

- Van A

La régulation est assurée par un système de régulation à deux composantes, **VanS/VanR**, qui module la transcription du cluster de gènes de résistance :

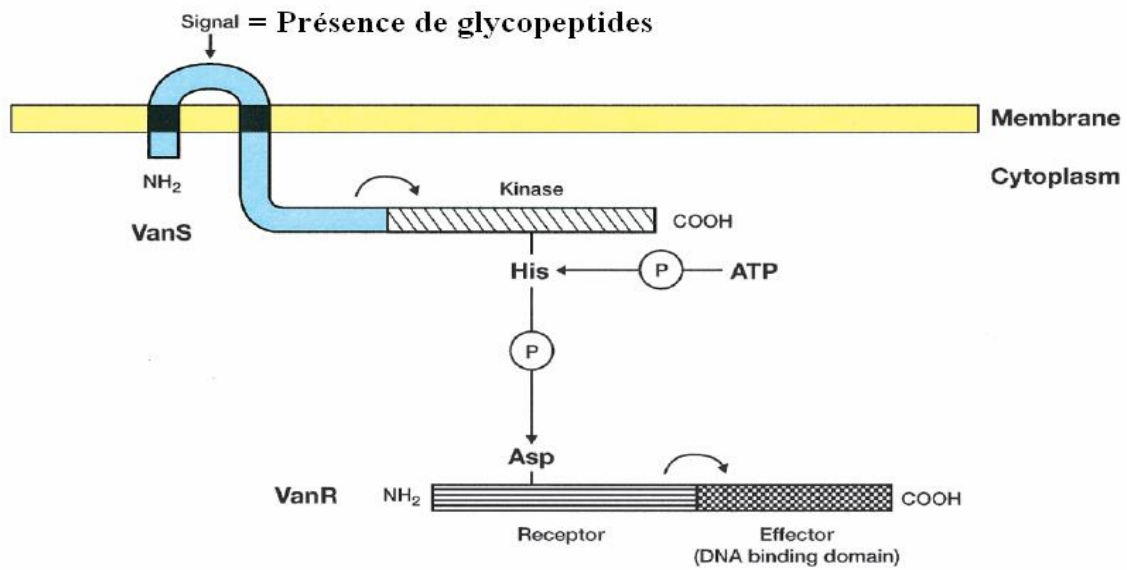
- **VanS** : histidine kinase de classe I qui possède des boîtes conservées H, N, G1, F, G2. VanS comprend : (i) un domaine N-terminal avec deux segments transmembranaires, récepteur pour les glycopeptides, et (ii) un domaine C-terminal cytoplasmique avec une activité kinase. Cette protéine transmembranaire possède différentes activités : auto-phosphorylation, phosphatase et phosphotransférase. **VanR** : activateur de la transcription, situé au niveau cytoplasmique.

Ce système fonctionne de la façon suivante (Figures 20 et 21) :

1 En présence de glycopeptides :

- le domaine cytoplasmique VanS catalyse une auto-phosphorylation ATP-dépendante, au niveau d'un résidu spécifique histidine.
- ce groupement phosphate est ensuite transféré au niveau d'un résidu aspartate de VanR.
- VanR ainsi activé par phosphorylation, active à son tour le promoteur PR. Cela entraîne la transcription des gènes de régulation puis l'activation du promoteur PH et la transcription des gènes de résistance.

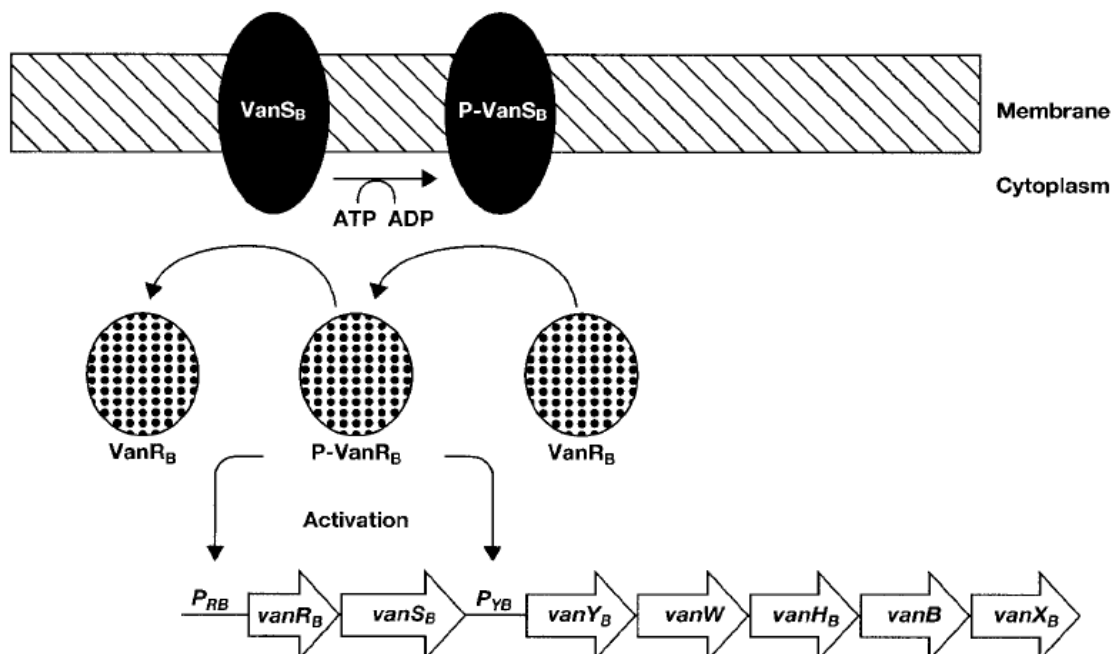
La vancomycine et la teicoplanine sont inducteurs de VanS.



### Transcription des gènes de régulation puis transcription des gènes de résistance

**Figure 20:** Système de régulation à deux composants VanR/S chez les entérocoques résistants aux glycopeptides [191].

Asp : aspartate ; His : histidine ; P :phosphate



**Figure 21:** Régulation positive et négative de la phosphorylation de l'activateur de transcription VanR, par le récepteur VanS chez les entérocoques résistants aux glycopeptides [191].

Les flèches représentent l'opéron *vanB* et indiquent la direction de transcription. Les gènes de régulation et de résistance sont co-transcrits, respectivement après activation des promoteurs PRB et PYB. ADP : adénosine diphosphate.

## 2 En absence de glycopeptides :

C'est l'activité phosphatase de VanS qui est stimulée, entraînant une déphosphorylation de VanR, et ainsi une régulation négative des promoteurs PR/PH. VanS module ainsi le niveau de phosphorylation de VanR grâce à ses activités kinase/phosphatase, régulant la transcription du cluster de gènes de résistance.

### • VanB

L'organisation et les fonctions du cluster *vanB* sont similaires à celles de *vanA* mais différent dans sa régulation, puisque **seule la vancomycine est inductrice de ce cluster**. Des mutations ou des délétions au niveau de *vanSB* peuvent conduire à une résistance non plus inductible, mais constitutive [198].

#### • Origine des gènes de résistance

Le transposon Tn1546 portant l'opéron *vanA* est hautement conservé, quelle que soit la souche considérée, et son origine géographique. Cela suggère une origine commune et une diversification après transfert. Le % en GC est de 43% pour l'opéron *vanA*, et de 48% pour l'opéron *vanB*, ce qui est supérieur au % de GC retrouvé dans le génome d'*E. faecium* (39%) ou d'*E. faecalis* (38%). Il est donc évident que la résistance aux glycopeptides a une origine extra-chromosomique et que les clusters sont probablement composés de gènes issus de sources diverses [170]. Lorsque l'on analyse les ligases type DA<sub>1</sub>-DA<sub>2</sub> retrouvées chez des espèces naturellement résistantes aux glycopeptides telles que les *Lactobacillus* spp., on constate qu'elles sont assez éloignées de celles retrouvées chez les *Enterococcus* spp.

Une autre source possible est celle représentée par les espèces sécrétrices de glycopeptides chez lesquelles on a identifié des gènes homologues à *vanA*, *vanH* et *vanX* : *Amycolatopsis orientalis*, ou *Streptomyces toyocaensis* (chez laquelle on a aussi retrouvé des gènes *vanR/vanS* mais éloignés d'une vingtaine de kilobases des gènes de résistance). Cependant, le % en GC est d'environ 60%, ce qui est bien supérieur à ce qui est observé pour les séquences *vanA/H/X*. Cela conduirait à penser que l'acquisition des gènes de résistance par les entérocoques n'est pas un événement récent. Cependant, aucune espèce productrice de

glycopeptides ne synthétise des précurseurs DA<sub>la</sub>-D<sub>Ser</sub>, l'origine des opérons *vanC/E/G* serait donc autre que celle des opérons *vanA/B/D*.

Des phénotypes VanB ont été identifiés chez certaines souches de *Clostridium* spp. et des phénotypes VanD ou VanG-like chez d'autres bactéries anaérobies de la flore digestive (*Ruminococcus* spp.) [199]. Des phénotypes VanA ont été retrouvés chez des souches de *Paenibacillus* spp., isolées du sol [200]. Ces espèces joueraient-elles un rôle de réservoir de gènes de résistance ?

La question de l'origine des gènes de résistance reste entière...

- **Phénotypes de résistance**

Six types de résistance ont été individualisés sur des critères phénotypiques et génotypiques. Cinq résultent d'une résistance acquise (VanA, B, D, E, G) et un (VanC) est une propriété intrinsèque de certaines espèces telles que *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* et *E. flavescens*. La classification de la résistance aux glycopeptides est maintenant fondée sur la séquence primaire des gènes de structure des ligases plutôt que sur les niveaux de résistance aux glycopeptides, dans la mesure où les CMI de la vancomycine et de la teicoplanine des divers types se chevauchent.

Le tableau 3 regroupe les différents types de résistance aux glycopeptides, médiée par les gènes *van*, identifiés actuellement, avec leurs caractéristiques génétiques (transposon, localisation des gènes), leur type d'expression (inductible ou constitutif), les espèces chez lesquelles ces résistances sont rencontrées [170]. Alors que les 6 types de résistance décrits impliquent tous des enzymes aux fonctions similaires, ils peuvent être distingués par la localisation des gènes (chromosomique ou plasmidique), et par le mode de régulation de l'expression de ces gènes. L'impact sur la thérapeutique des divers types de résistance aux glycopeptides est double : diminution de l'activité bactéricide de ces antibiotiques et sélection de mutants plus résistants sous traitement.

- **Type VanA** : C'est le type de résistance aux glycopeptides le plus fréquent, et le seul à avoir été décrit chez *S. aureus*. La vancomycine et la teicoplanine sont inactives, et la synergie avec la gentamicine est abolie. L'opéron *vanA* est porté par un transposon, Tn1546, détecté au départ sur le plasmide pIP816 chez la souche *E. faecium* BM4147, proche des transposons de la famille Tn3 [194].

- 
- **Type VanB** : cette résistance entraîne une diminution de l'activité de la vancomycine ainsi qu'une perte de la synergie avec la gentamicine et la streptomycine. La teicoplanine seule, conserve son activité, mais, en monothérapie, sélectionne des mutants plus résistants aux deux glycopeptides. L'organisation et les fonctions de l'opéron *vanB* sont similaires à celles de l'opéron *vanA*, mais diffère au niveau de la régulation, puisque seule la vancomycine est inductrice.
  - **Type VanC** : les entérocoques appartenant aux espèces *E. gallinarum* (*vanC1*), *E. casseliflavus* (*vanC2*) et *E. flavescens* (*vanC3*) expriment une résistance intrinsèque à la vancomycine, constitutive ou inductible, tout en conservant une sensibilité à la teicoplanine. L'opéron *vanC* est chromosomique, non transférable. Cette résistance n'a de conséquence sur l'activité des glycopeptides que lorsqu'ils sont utilisés à doses sub-optimales.
  - **Type VanD** : l'organisation de l'opéron *vanD*, localisé exclusivement au niveau chromosomique chez les souches actuellement décrites, est similaire à celle des opérons *vanA* et *vanB*. Cette résistance constitutive n'est pas transférable par conjugaison à d'autres entérocoques [201]. Cette résistance supprime l'activité de la vancomycine et de la teicoplanine *in vivo* alors que la bactérie apparaît sensible *in vitro*, et les deux antibiotiques sélectionnent des mutants hautement résistants aux glycopeptides. Cela peut s'expliquer par une activité D,D-dipeptidase négligeable. Ainsi, l'enzyme VanXD est présente mais la bactérie est incapable d'éliminer efficacement les précurseurs DAla-DAla du peptidoglycane, entraînant un phénotype apparemment sensible aux glycopeptides [201]. Cependant, chez de nombreuses souches porteuses de l'opéron *vanD*, la voie normale de synthèse des pentapeptides ne fonctionne pas, cela à cause d'une Ddl ligase rendue inactive par différentes mutations du gène chromosomique *ddl*. En conséquence, les bactéries ne peuvent croître qu'en présence de vancomycine, et l'activité de VanXD n'est pas indispensable. Une autre particularité du phénotype VanD est la D,D-carboxypeptidase VanYD qui appartient à la famille des PLP à site catalytique sérine, sensibles aux benzylpénicillines. C'est en cela qu'elle se distingue de VanY ou de VanYB, qui sont des carboxypeptidases Zn<sup>2+</sup> dépendantes, insensibles à l'action des pénicillines [170]. Les souches *vanD*<sup>+</sup> sont donc un formidable exemple d'association de gènes intrinsèques et acquis afin d'obtenir un haut niveau de résistance aux antibiotiques.

- **Type VanE** : le phénotype VanE correspond à une résistance à bas niveau à la vancomycine, et une sensibilité à la teicoplanine, due à une synthèse inductible de précurseurs du peptidoglycane terminé par DAla-DSer. L'organisation de l'opéron *vanE* est très proche de celle de l'opéron *vanC* : on retrouve les gènes codant une ligase VanE, une dipeptidase/carboxypeptidase VanXYE et une racémase VanTE. [202].
- **Type VanG** : la résistance de type VanG présente le même phénotype que VanE, et des souches *vanG* ont déjà été décrites responsables d'infections nosocomiales [203].

- **Cas particulier de la dépendance à la vancomycine**

Un phénomène intrigant, ayant une certaine importance clinique, s'est développé chez certaines souches VanA ou VanB, il s'agit de la dépendance à la vancomycine. Ces isolats ne sont pas simplement résistants aux glycopeptides, mais la présence de ces antibiotiques est nécessaire à leur croissance. Ils ont été isolés *in vitro*, sur des modèles animaux, mais aussi chez des patients traités par la vancomycine au long cours. La présence de vancomycine induit la synthèse de précurseurs pentadepsipeptidiques DAla-DLac, ce qui permet de pallier l'absence de précurseurs DAla-DAla liée à un déficit fonctionnel de la ligase Ddl. Ces souches nécessitant des conditions particulières de développement, elles sont probablement sous-estimées, car elles ne sont pas détectées par les techniques de routine de laboratoire. Une réversion de la dépendance à la vancomycine a déjà été observée, liée à des mutations ponctuelles au niveau du sensor VanS ou au niveau du gène codant la ligase Ddl [191].

**Tableau 3:** Caractéristiques des résistances aux glycopeptides chez les entérocoques [191].

Résistance	Acquise					Intrinsèque	
	Haut	Variable	Modéré	Bas		Bas	
Type	VanA	VanB	VanD	VanG	VanE	Van C1	Van C2/C3
Transfert par Conjugaison	+	+	-	+	-	-	-
Transposon	Tn1546	Tn1548 Tn1549 Tn5382					
Localisation des gènes de résistance	Plasmide	Plasmide	Chromosome	Chromosome	Chromosome	Chromosome	Chromosome
Expression	Inductible	Inductible	Constitutive	Inductible	Inductible Constitutive	Constitutive Inductible	Constitutive Inductible
CMI (mg/L) Vancomycine	64-1000	4-1000	64-128	16	8-32	2-32	2-32
CMI (mg/L) Teicoplanine	16-512	0,5-1	4-64	0,5	0,5	0,5-1	0,5-1
Espèces bactériennes	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. avium</i> <i>E. durans</i> <i>E. mundii</i> <i>E. raffinosus</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i> <i>E. flavescens</i>
Précurseurs terminés par	DAla - DLac					DAla - DSer	

### V.5.2 Gènes *van* chez les staphylocoques : l'inquiétude

Les gènes *van* ont aussi été retrouvés chez des souches de *S. aureus* de haut niveau de résistance aux glycopeptides, appelées **VRSA** (Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*) [204]. Sept cas de VRSA ont été rapportés uniquement aux Etats-Unis. Il est important de noter qu'aucun lien épidémiologique n'a pu être trouvé entre ces patients, et que chaque cas est considéré comme un développement *de novo* d'une résistance. Ces souches ont généralement été isolées dans des cas de co-colonisation avec des ERG (*E. faecalis vanA*). L'étude menée par Furano *et al.* dans les USI aux Etats Unis entre le 1<sup>er</sup> janvier 2002 et le 31 décembre 2003, sur 2440 patients, a montré une prévalence de 2.7% de co-colonisation par des SARM et des ERG. Les facteurs de risque étaient l'âge, le sexe masculin, une hospitalisation antérieure en USI, et un traitement antibiotique durant l'année précédente. Parmi les patients co-colonisés, 21% avaient reçu un traitement par vancomycine, 26% par pipéracilline et 17% par fluoroquinolones. Cette co-colonisation ne semble pas liée à une augmentation de la morbi-mortalité (différence non significative par comparaison aux patients non colonisés) [205]. Une étude plus récente de Warren *et al.*, dans les USI d'un grand centre hospitalier, a montré une prévalence de 9.5% de co-colonisation ou co-infection par des SARM et des ERG [206]. Cette prévalence semble moins importante dans les petits hôpitaux ruraux : 0.29% des patients SARM+ ont été retrouvés co-colonisés ou co-infectés par un ERG, contre 3.8% de co-colonisation SARM chez les patients porteurs d'ERG [207].

### Transmission des gènes *van* aux staphylocoques

La souche VRSA isolée dans le Michigan portait les mêmes séquences *vanA* qu'une souche d'*E. faecalis* isolée chez ce même patient. Alors que la souche VRSA isolée en Pennsylvanie avait une séquence différente, avec une CMI plus basse à la vancomycine (question était posée d'une éventuelle instabilité du plasmide) [208]. Ainsi, Flannagan *et al.* ont montré, en 2003, qu'une souche d'*E. faecalis* résistante à la vancomycine, co-isolée avec une souche de VRSA porteuse des gènes *vanA*, contenait deux plasmides, dont l'un, pAM830, est un plasmide conjugatif, proche de la famille *Inc18*, contenant les gènes de résistance à la vancomycine (*Tn1546*) et à l'érythromycine. La souche de VRSA portait le même plasmide, pAM829 (codant la résistance à oxacilline, gentamicine, kanamycine, érythromycine, rifampicine), que d'autres souches de SARM isolées chez ce patient, mais contenant en plus les gènes *vanA*. Aucune homologie n'a été retrouvée entre les plasmides des souches ERG et VRSA, laissant ouverte la question sur l'origine du transfert du déterminant *vanA* au SARM [209].

Une pression de sélection par la vancomycine ne semble pas nécessaire au transfert de la résistance ; ainsi, certains patients porteurs de VRSA n'ont pas reçu de traitement par glycopeptides dans les 5 années précédant l'isolement de la souche [210].

### **Antagonisme de l'expression des gènes *mecA* et *vanA*.**

Severin et *al.* se sont aussi penchés sur la nature de ces souches multirésistantes, en étudiant une souche clinique de VRSA, HIP11714, porteuse des gènes *mecA* et *vanA*, isolée chez un patient dialysé (Détroit, Michigan) au niveau d'une plaie de pied diabétique et d'un cathéter, co-colonisé par une souche d'*E. faecalis* résistant à la vancomycine [211]. Une étude de la composition du peptidoglycane a montré l'apparition de 20 nouveaux mucopeptides, avec comme principales modifications, le remplacement total des pentapeptides par des tétrapeptides, et un déficit ou absence de branchements pentaglycine, uniquement en présence de vancomycine dans le milieu de culture. De façon surprenante, ils ont montré un effet antagoniste des deux mécanismes de résistance : en présence de vancomycine et d'une faible dose d'oxacilline dans le milieu, la CMI était restaurée à 12 mg/L pour la vancomycine contre 512 mg/L, et inversement. Cela trouve une explication très simple. En présence d'une faible dose d'oxacilline, seule la PLP2A, PLP de faible affinité, reste active, et elle est incapable d'utiliser les précurseurs pentadepsipeptidiques issus de l'expression des gènes *van*. Ce phénomène a déjà été décrit chez les entérocoques avec la PLP5. Le phénomène inverse est explicable de la même façon : en présence d'une faible dose de vancomycine, il y a production de pentadepsipeptides, substrats inadéquates pour la PLP2A exprimée en présence d'oxacilline [211].

Ce possible transfert de gènes *van* des entérocoques aux staphylocoques crée une réelle inquiétude : le transfert pourrait être plus facile entre une souche de VRSA et d'autres souches de SARM, les staphylocoques sont bien plus fréquemment isolés en clinique et responsables d'infections graves...

Cela risque d'entraîner l'émergence et la dissémination de souches résistantes à quasiment tous les antibiotiques, aussi bien en milieu hospitalier que dans la communauté.

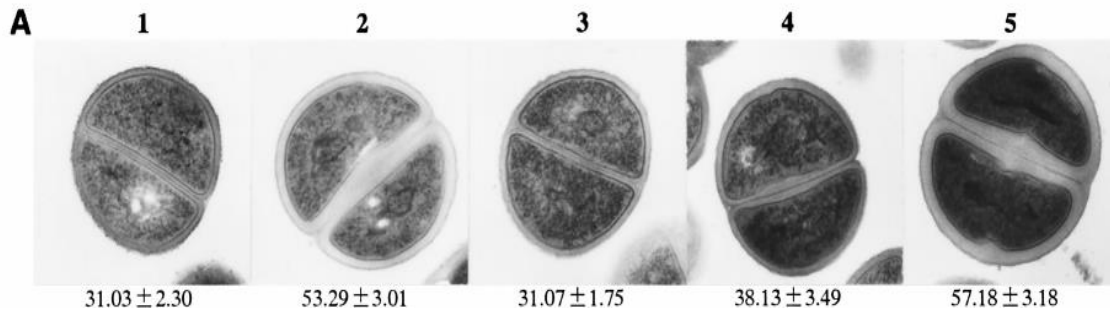
## V.6 Autres mécanismes de résistance aux glycopeptides

Des études, menées lors du développement de la vancomycine en 1956, avaient montré que la sélection *in vitro* de mutants de staphylocoques résistants à cet antibiotique était difficile. En 1987, la première souche « *S. haemolyticus* » intermédiaire à la vancomycine et résistante à la teicoplanine a été rapportée de (CMI 8 mg/L), ainsi que la première souche clinique de *S. aureus* intermédiaire à la teicoplanine. Ces observations sont restées négligées jusqu'au milieu des années 90 où des souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides, ont été isolées dans de nombreux pays, mais qui demeuraient cependant rares [212].

**VISA** (Vancomycin Intermediate *S. aureus*) a été le premier terme utilisé car les souches, ainsi nommées du fait de la résistance intermédiaire à la vancomycine, avaient été isolées dans des pays où seule la vancomycine est utilisée (Japon, Etats Unis). Le terme de **GISA** (Glycopeptide Intermediate *S. aureus*) a été ensuite introduit pour tenir compte de la résistance croisée avec la teicoplanine. On parle aussi d'hétéro-VISA, la définition de ces souches ne reposant pas sur une catégorisation clinique. En effet, ce terme a été introduit par Hiramatsu et al. pour définir les souches de *S. aureus* sensibles à la vancomycine (CMI 2-4 mg/L), initialement isolées au Japon, mais présentant des sous populations intermédiaires à la vancomycine (CMI 6-8 mg/L) [213]. La définition des hétéro-VISA manque de précision et souffre de l'absence de technique de référence, leur signification clinique restant encore discutée.

- **Mécanisme de la résistance**

Les souches de phénotype VISA/GISA apparaissent être des mutants qui accumulent plusieurs facteurs impliqués dans la résistance aux glycopeptides. Aucun gène de type *van* n'a jamais été identifié chez ce type de souche. Depuis la découverte de la souche Mu50 (VISA), de nombreuses équipes se sont penchées sur le mécanisme de résistance aux glycopeptides de cet isolat, en particulier l'équipe de Cui et al. Ils ont étudié la souche Mu50, et son précurseur présumé, la souche Mu3, afin d'identifier les diverses modifications de la paroi. Ils ont observé une augmentation de l'incorporation de GlcNAc dans la paroi Mu50, une augmentation du pool cytoplasmique de précurseurs monomériques de la muréine (UDP-N-acétylmuramyl-pentapeptide), et une augmentation de l'autolyse avec augmentation du renouvellement du peptidoglycane (augmentation du relargage de GlcNAc, augmentation de l'activité des PLP2 et PLP2'). Par comparaison avec la souche Mu3, Mu50 possède une paroi 2 fois plus épaisse et un taux beaucoup plus important de mucopeptides non aminés [214].



**Figure 22:** Images obtenues par microscopie électronique de la souche Mu50 montrant la variation de l'épaisseur de la paroi en fonction de la composition du milieu [215].

Cette équipe a ainsi montré :

(i) **que la résistance à la vancomycine dépend de la composition du milieu** : plus le milieu est riche en acides aminés et en glucose, plus la résistance est importante. La paroi est d'autant plus épaisse que le milieu est riche en glucose et en L-glutamine (Figure 22).

(ii) **une accélération de la synthèse du peptidoglycane**, avec l'augmentation de la consommation de GlcNAc (incorporation sous forme UDP-GlcNAc), et l'augmentation de l'activité de l'enzyme GlmS (voie d'Embden Meyerhof, elle convertit Fru-6-P en Glc-6-P). Ceci s'accompagne d'une augmentation de la proportion en muropeptides nonaminés par la consommation de la glutamine par GlmS [215].

(iii) un rôle très important de **l'augmentation de l'épaisseur** de la paroi dans la résistance à la vancomycine. Les glycopeptides sont capturés au niveau des couches périphériques de la paroi et ne peuvent atteindre leur cible. Plus la paroi est épaisse, plus la consommation de glycopeptides est importante [215].

La paroi d'une souche de *S. aureus*, sensible aux glycopeptides, est normalement constituée d'une vingtaine de couches de peptidoglycane. La souche Mu50 en possède 30 à 40 ; seules les 10 premières semblent impliquées dans le piégeage de la vancomycine (expliquant une consommation pas plus importante que chez les autres souches). La souche Mu3 se situe entre une bactérie sensible à la vancomycine et Mu50.

(iv) la résistance à la vancomycine est proportionnelle à la quantité de muropeptides non aminés, présentant une affinité supérieure aux autres résidus. Les molécules de vancomycine sont piégées par diminution du nombre de liaisons intermoléculaires. Cela n'est cependant pas suffisant pour expliquer la résistance, elle nécessite aussi une augmentation de l'épaisseur de la paroi [215].

Ces changements morphologiques de la paroi seraient dus à une accumulation de mutations, altérant l'expression de divers gènes : PLP2, PLPD, sigB, ddh... Différents groupes de gènes responsables d'une régulation positive ou négative, ont aussi été rapportés associés à la résistance à la vancomycine, sans qu'aucune mutation particulière n'ait été retrouvée chez toutes les souches VISA.

Les souches de VISA représentent donc une nouvelle stratégie de résistance, très différente des mécanismes de résistance déjà décrits. On parle de « clogging/trapping effect » ou piégeage des glycopeptides, associé à une augmentation de l'épaisseur de la paroi. Cela crée un retard suffisant de la saturation de la membrane cytoplasmique par les glycopeptide, permettant à la bactérie de se multiplier et de se diviser avec une disparition de l'effet bactéricide des glycopeptides [214].

## **V.7 Gestion des épidémies à ERG**

### **V.7.1 Origine des souches d'ERG et des épidémies**

Les profils épidémiologiques sont variables selon les pays. En Europe, l'origine de la résistance serait liée à un usage extensif de l'avoparcine, alors qu'aux Etats Unis l'utilisation abusive de vancomycine, C<sub>3</sub>G, fluoroquinolones ou antibiotiques anti-anaérobies serait incriminée dans la sélection d'entérocoques naturellement résistants, favorisant la colonisation du tube digestif par ces souches.

#### **- Réservoir n°1 : les patients colonisés ou infectés**

La plupart des épidémies sont dues à la dissémination d'un seul et unique clone. Le premier réservoir est représenté par les patients colonisés et infectés, la dissémination se réalisant par transmission interpatient (chambres à plusieurs lits) ou manuportée par le personnel soignant. Une étude prospective longitudinale chez des patients ventilés en USI a ainsi rapporté une transmission croisée dans 85% des cas, chez des patients initialement non porteurs [216]. La prévalence de colonisation intestinale par des ERG varient selon les études : 2% aux Pays-Bas [217], 3,5% en Belgique [218] et jusqu'à 30,5% en Grèce (mais ils tiennent compte des *E. gallinarum* et *E. casseliflavus*, naturellement résistants aux glycopeptides) [219], études menées essentiellement dans des services de réanimation ou de chirurgie.

Le principal problème posé est la durée pendant laquelle les patients restent colonisés. Une étude de Green et al. a montré que plus de 60% des transplantés hépatiques porteurs d'ERG le restent pendant plus de 12 semaines [220]. Dans l'étude de Livornese et al., la majorité des patients sont restés porteurs pendant plus de 3 mois [221].

Dans la majorité des cas, une association temporelle et spatiale peut être notée entre les patients porteurs. Le contact de patients à risque avec les mains de personnel soignant contaminées a été montré comme un élément déterminant de la dissémination des ERG. Ainsi, certains auteurs ont montré une prévalence de manuportage chez le personnel soignant de 0 à 41%, variable selon les hôpitaux et les services [222], [223].

### **- Réservoir n°2 : l'environnement hospitalier**

Des réservoirs potentiels ont aussi été identifiés dans l'environnement hospitalier, sur les surfaces ou même l'équipement médical [224, 225]. Les entérocoques sont des bactéries particulièrement résistantes aux agents désinfectants, à la température et autres conditions difficiles. Et des techniques inappropriées de désinfection et de nettoyage des chambres, ainsi qu'une mauvaise compliance à l'hygiène des mains sont généralement les premières causes de dissémination des ERG en milieu hospitalier. Une étude a montré qu'une contamination environnementale antérieure de la chambre est hautement prédictif d'une acquisition d'ERG, soulignant l'intérêt d'une décontamination efficace suite à l'hébergement de patients porteurs [226]. Des audits de surveillance menés dans certains hôpitaux où sévissaient des épidémies ont documenté une contamination par des ERG au niveau de : gants, blouses, portes, salle de bain, tables, téléphone, lits, glucomètres, moniteurs d'ECG, thermomètres, tensiomètre [227, 228]... D'autres études ont montré une compliance relativement médiocre aux méthodes d'hygiène des mains (port de gants, utilisation de solutions hydro-alcooliques). Ainsi, Pittet et al. ont indiqué que seulement 48% du personnel soignant avaient des pratiques appropriées [229].

### **- Réservoir n°3 : les élevages d'animaux**

Cependant, des réservoirs extra-hospitaliers ont aussi été identifiés par l'intermédiaire de patients colonisés n'ayant jamais été hospitalisés [230]. La recherche de la source de colonisation a montré un contact avec des animaux porteurs dans des élevages fermiers. Une étude de l'agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) en 1999, réalisée sur des échantillons de selles de poulets français, retrouvait 5,4% d'ERG [231]. Cette étude a été répétée annuellement et la proportion de souches résistantes observée est stable, voire en légère diminution. La responsabilité en incombe à l'usage abusif de l'avoparcine comme additif alimentaire, en particulier dans les élevages de volailles, en Europe, jusqu'en 1997, date de son interdiction [232]. Des souches d'*E. faecium* présentant une sensibilité diminuée à l'avoparcine ont été isolées, et une résistance à la vancomycine a pu être mise en évidence

[233]. Une étude réalisée chez des chevaux et des porcs a montré que 7 à 16% des souches étaient porteuses des gènes *vanA*, avec de petites différences au niveau du profil de résistance aux antibiotiques, avec une grande homologie entre les plasmides retrouvés chez les souches animales et humaines [234]. Plus récemment, une étude menée chez des volailles saines, en Hongrie a révélé une diminution de l'isolement de souches d'entérocoques porteuses de gènes *van* en 2003-2004. Ainsi, 8.6% des souches étaient porteuses des gènes *vanA* en 2001 (*E. mundtii*, *E. durans*, *E. faecium*), contre 23% en 2002 (*E. durans*, *E. faecium*). Aucune souche d'ERG n'a été isolée en 2003-2004 [235]. Les données annuelles recueillies ont établi une corrélation entre l'isolement d'ERG et l'utilisation d'avoparcine dans les élevages. Cette étude souligne que la réduction de l'usage des antibiotiques dans les élevages peut permettre de réduire le taux d'ERG, voire même de faire disparaître ces souches 5 ans après l'interdiction de l'usage de l'avoparcine [235].

L'hypothèse d'un possible passage à l'homme via la chaîne alimentaire a été émise : soit par colonisation directe du tractus intestinal de l'hôte, soit par transfert des gènes de résistance aux bactéries de la flore commensale. Cela a conduit, en janvier 2006, à l'interdiction de l'usage de tout antibiotique en alimentation animale ou comme facteur de croissance dans les élevages [234].

Ainsi, l'épidémiologie des ERG, en Europe, semble différente de celle des Etats Unis avec des épidémies hospitalières qui restent localisées et rares, et l'existence d'un portage fécal sain communautaire, d'ERG probablement transmis par la chaîne alimentaire. Cela est confirmé par le fait qu'aux Etats Unis, aucun isolat d'ERG n'a pu être isolé de volontaires communautaires ou de patients admis pour la 1<sup>ère</sup> fois en hospitalisation [236]. L'émergence des ERG serait plutôt liée à un usage excessif de la vancomycine en USI. Ces différences d'origine sont renforcées par le fait qu'une très grande divergence existe dans les profils PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) retrouvés en Europe et aux Etats Unis [237].

Cependant, une étude récente, menée sur les eaux usées récupérées à la sortie d'une industrie agroalimentaire au Texas, a montré l'existence de souches d'ERG, multi-résistantes aux antibiotiques (ciprofloxacine, érythromycine, lincomycine, kanamycine, gentamicine, streptomycine). Certaines souches étaient résistantes ou intermédiaires au linézolide ou à la quinupristine-dalfopriline [238]. Une étude iranienne va dans le même sens, et montre l'existence d'un lien épidémiologique entre des souches d'ERG isolées d'eaux usées et des isolats cliniques humains [239]. Ces études laissent ouverte la question sur les réservoirs d'ERG, mais aussi et surtout sur l'intérêt éventuel des ERG comme nouveau marqueur de contamination fécale, et de respect des procédures élémentaires d'hygiène.

### V.7.2 Facteurs de risque d'acquisition d'ERG

Les facteurs de risque de colonisation ou d'infection à ERG ont été largement analysés [240] et incluent :

- une hospitalisation > 15 j, et des hospitalisations multiples,
- l'administration prolongée d'antibiotiques (vancomycine, céphalosporines, imipénème, anti-anaérobies) [241-243],
- l'âge avancé [244],
- une maladie sévère sous-jacente,
- une insuffisance rénale (créatininémie et urémie élevées),
- une dénutrition (albuminémie très diminuée),
- des interventions instrumentales invasives (cathéter central, sonde urinaire) [244].

La transmission est largement facilitée par la diarrhée, l'incontinence fécale et les suppurations. Beaucoup de ces facteurs de risque sont communs à d'autres BMR telles que les SARM, les Entérobactéries productrices de BLSE ( $\beta$ -Lactamase à Spectre Étendu), ou *Clostridium difficile*.

Pour les ERG, la pression de sélection résultant de la prescription de nombreuses et diverses antibiothérapies, en particulier chez le neutropénique, semble jouer un rôle primordial. Différents antibiotiques peuvent être responsables de la sélection des ERG, en particulier les C<sub>3</sub>G et les antibiotiques anti-anaérobies tels que les 5-nitro-imidazolés [245]. Les patients d'onco-hématologie [246] constituent donc une population particulièrement sensible aux infections à ERG, ainsi que les transplantés (ou tout autre intervention chirurgicale majeure, en particulier au niveau du thorax et de l'abdomen), les patients dialysés chroniques [247], et les patients hospitalisés en réanimation [248]. En effet, la plupart des thérapeutiques utilisées conduisent à une situation d'immunodépression associée à des lésions muqueuses (mucite, délabrement de la muqueuse intestinale). De plus, l'utilisation d'antibiotiques à large spectre, C<sub>3</sub>G ou fluoroquinolones, inefficaces sur les entérocoques, et associée fréquemment à la vancomycine, entraînent une importante pression de sélection.

### V.7.3 Effets délétères pour les patients

Les infections ou les colonisations à ERG conduisent à un nombre important d'effets délétères pour les patients hospitalisés porteurs. Les infections urinaires et les infections du site opératoire, après exérèse des tumeurs, sont les plus fréquemment rencontrées [153]. Des études ont démontré que les ERG peuvent entraîner des infections graves, et la mortalité

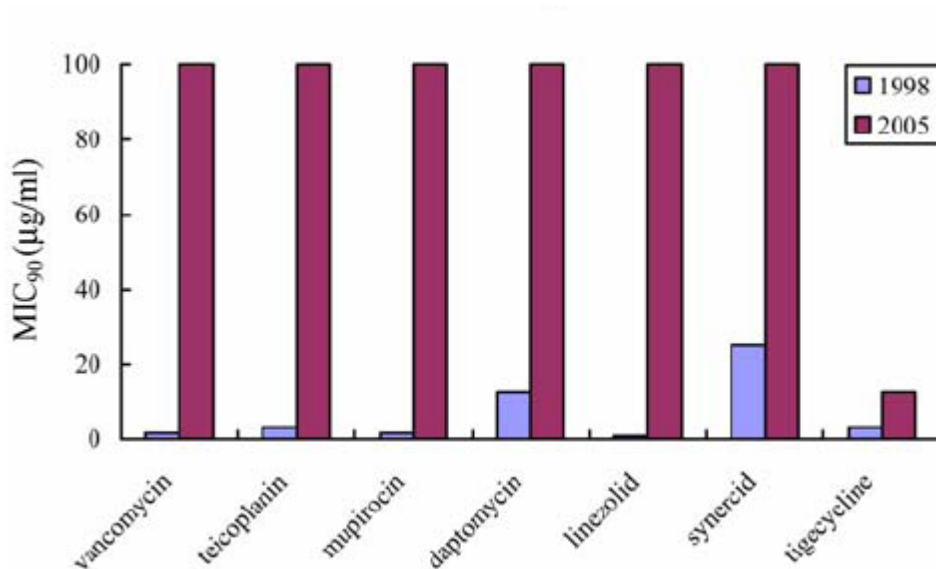
attribuable aux bactériémies à ERG est très importante. L'incidence et la gravité des bactériémies à ERG chez les patients d'onco-hématologie ou neutropéniques varient selon la pathologie sous-jacente et les séries publiées, avec des taux de mortalité atteignant 30 à 60% [249-251]. Dans une enquête rétrospective, réalisée sur 217 adultes recevant une greffe de moelle osseuse allogénique, Zirakzadeh et *al.*, ont montré une multiplication par 2 de la mortalité chez les patients colonisés par un ERG avant transplantation. Cette augmentation était corrélée à au moins un épisode de bactériémie à ERG [252]. Une autre étude a montré que parmi 768 patients colonisés par un ERG, 4% avaient développé une bactériémie avec la même souche, et que les facteurs de risque de survenue d'une bactériémie sont : une hospitalisation prolongée, une infection d'un autre site (en dehors de la colonisation) et l'administration de vancomycine [253]. Les facteurs de risque de mortalité répertoriés étaient l'immunodépression et la survenue d'une bactériémie à ERG [253]. Cependant, l'existence de nombreuses co-morbidités, chez des patients fragiles, ne permet pas de conclure à la réelle causalité ERG/ mortalité, mais semble plutôt être l'accumulation de différents facteurs.

Par ailleurs, la mise en place de mesures de prévention et de contrôle des épidémies à ERG peut aboutir à une réduction de la qualité des soins et de vie des patients : les procédures d'isolement limitent les échanges sociaux, augmentent la durée d'hospitalisation. Le statut « patient ERG+ » rend l'intégration des patients plus difficile, en particulier en service de réadaptation ou de long séjour [254]. Au sein même des secteurs de cohorting, il est parfois difficile de faire intervenir des spécialistes (radiologues, cardiologues, néphrologues), et la réalisation d'exams simples (radiographie, scanner, soins dentaires) devient un combat de chaque jour pour leur obtention. Cela peut aboutir à une lassitude du personnel soignant dédié à ces secteurs, et par la même à une diminution de la qualité des soins. De plus, les problèmes liés au traitement et à l'isolement des patients colonisés et infectés entraîne une majoration des coûts d'hospitalisation, une réorganisation des services, ou même d'un établissement de soins, et la mise en place d'équipes dédiées.

## **V.8 Traitement des infections à ERG**

Les options thérapeutiques des infections à ERG sont limitées puisque ces pathogènes sont fréquemment résistants à la plupart des antibiotiques actuellement disponibles. De nouvelles molécules antibactériennes ont vu le jour : quinupristine-dalfopristine, linézolide et daptomycine. Cependant, pour chacun de ces antibiotiques récemment introduits, des souches résistantes ont déjà été décrites [255-257]... A noter aussi pour la quinupristine-dalfopristine, une résistance naturelle chez *E. faecalis* (efflux) et l'existence de réservoirs communautaires

aux Etats Unis et en Europe, probablement du fait de l'usage excessif d'un analogue, la virginiamycine, comme facteur de croissance dans les élevages (à mettre en parallèle avec l'abus d'usage de l'avoparcine, à l'origine de la dissémination des ERG en Europe) [233]. La tigécycline, molécule la plus récente, reste peut être une bonne alternative. Une étude très intéressante a été réalisée en Corée où ces nouvelles molécules ne sont que très peu voire non encore utilisées actuellement, les ERG (*E. faecium vanA*) n'ont donc pas encore été soumis à une pression de sélection [258]. Les auteurs ont montré la sensibilité des isolats de 1998 à l'ensemble des molécules testées, alors que la plupart des isolats de 2005 sont résistants (Figure 23). Alors que ces nouveaux agents sont encore peu utilisés, des résistances sont déjà apparues ; ces thérapeutiques ne semblent donc pas très prometteuses en tant qu'alternatives à long terme.



**Figure 23:** Valeurs de CMI<sub>90</sub> obtenues pour les différents antibiotiques testés, pour les isolats cliniques d'*E. faecium vanA* isolés en Corée du sud en 1998 et 2005 [259].

Plusieurs alternatives ont été proposées pour le traitement des endocardites dues à des souches *E. faecalis* ou *E. faecium* de phénotype VanA. Les triples associations  $\beta$ -lactamines-gentamicine-vancomycine, ampicilline-ciprofloxacine-vancomycine, ou encore amoxicilline-cotrimoxazole-pristinamycine ont été évaluées *in vitro*, mais les données sur leur efficacité clinique reste encore insuffisantes. Les souches de phénotype VanB ou VanC restent accessibles à la teicoplanine à forte posologie.

**Au CHU de Nancy, la Commission Spécialisée des Anti-Infectieux, a établi les recommandations suivantes en novembre 2007 :**

- la mise en place d'une politique raisonnée de l'usage des glycopeptides et des C<sub>3</sub>G dans tous les établissements concernés par l'épidémie ;
- ne pas traiter les colonisations sans infection par antibiotiques ;
- proposer comme traitement de première intention des rares bactériémies ou infections urinaires symptomatiques à ERG, le linézolide, sous réserve d'un contrôle hématologique bihebdomadaire et d'une durée de prescription ne dépassant pas 3 semaines ;
- chez tout patient antérieurement connu comme colonisé, de bien peser toute indication d'antibiothérapie devant une fièvre, et de ne traiter par antibiotique que les infections bactériennes présumées ou documentées ;
- chez tout patient antérieurement connu comme colonisé, justifiant une antibiothérapie, défavoriser l'utilisation des aminopénicillines (amoxicilline ± acide clavulanique), des pénicillines (pipéracilline ± tazobactam), des carboxypénicillines (ticarcilline ± acide clavulanique), et de limiter chez ces patients, l'usage des glycopeptides, C<sub>3</sub>G, imidazolés, fluoroquinolones et imipénème.
- chez tout patient antérieurement connu comme colonisé, de contrôler la présence ou non du portage d'ERG au décours de l'antibiothérapie. Si ce patient avait préalablement eu 3 prélèvements négatifs à un mois d'intervalle, le maintien de la négativité à l'issue de l'antibiothérapie serait un élément fort pour le considérer comme probablement « totalement décolonisé ».

**VI. Rocommandations pour gérer une épidémie aux ERG**

Durant la dernière décennie, différentes approches de prévention et de contrôle de la dissémination des ERG ont été développées et intégrées dans des recommandations. Ces dernières se sont fondées sur l'origine des ERG, sur le mécanisme de transmission au sein des établissements de soins, et sur les facteurs de risque d'acquisition de ces pathogènes. La gestion d'une épidémie à ERG, ou de toute épidémie, passe d'abord par la création d'une équipe pluridisciplinaire, coordonnée, capable de fédérer les personnels impliqués et de maintenir mobilisation et cohésion.

Les mesures préventives afin d'éviter la sélection et la dissémination des ERG comprennent [225, 237, 260, 261] :

- le lavage des mains (encore insuffisamment respecté par le personnel soignant), avec l'usage des solutions hydro-alcooliques, correctement employées ;
- l'isolement des patients porteurs (création d'unités de cohorting) ;
- le renforcement des précautions contact (gants, surblouses, matériel dédié) ;
- un dépistage rapide et efficace des patients porteurs, avec utilisation de méthodes adéquates, sensibles, spécifiques, rapides et simples ;
- un système d'alerte rapide par le laboratoire de bactériologie;
- un nettoyage efficace de l'environnement hospitalier [262];
- l'utilisation d'un pictogramme « ERG » pour le fléchage des patients (avec tout ce que cela peut impliquer comme perte de chances pour le patient, comme explicité ci-dessus) ;
- une information et une éducation du personnel soignant (de l'ensemble de la chaîne de soins : de l'ambulancier au personnel hospitalier, en passant par le médecin traitant), des patients, des familles ;
- un usage raisonné des antibiotiques, en particulier des glycopeptides et des C<sub>3</sub>G. En effet, l'administration de vancomycine ou d'autres antibiotiques tels que les C<sub>3</sub>G, la clindamycine, le métronidazole, peut augmenter le taux de colonisation intestinale et cutanée, et majorer ainsi la transmission de patient à patient ;

En résumé, les glycopeptides sont des « anciennes » molécules, longtemps restées dans les tiroirs du fait de leur néphrotoxicité et ototoxicité importantes. Elles ont été redécouvertes lors de l'émergence et de la dissémination des SARM, et ont rendu d'immenses services, en particulier dans les infections sévères à BMR. Elles sont depuis quelques années de nouveau pointées du doigt du fait de l'apparition d'une résistance à la vancomycine et/ou à la teicoplanine, cette résistance étant apparue relativement tardivement après leur commercialisation. Les mécanismes de résistance chez les entérocoques sont très étudiés : les opérons *van* sont maintenant parfaitement élucidés, 6 phénotypes sont identifiés et la recherche se poursuit. Les facteurs de risque d'acquisition de ces nouveaux pathogènes ont été très étudiés, et la survenue d'épidémies dans divers pays et divers types de services (USI, dialyse, onco-hématologie...) a permis de montrer que ces nouveaux pathogènes, essentiellement nosocomiaux, s'attaquent aux patients fragiles, immunodéprimés, fréquemment hospitalisés et ayant subi plusieurs cures d'antibiotiques. Reste la problématique

du traitement des infections à ERG, et le risque d'impasse thérapeutique. Les entérocoques se caractérisent en effet par une remarquable adaptabilité, et des résistances ont déjà été signalées à l'encontre des thérapeutiques les plus récentes.

---

## **2ème partie : MATERIEL ET METHODES**

### **1. Echantillonnage**

La totalité des souches d'entérocoques, qui a fait l'objet de notre travail, a été isolée entre Janvier et Juin 2014. Une fiche de renseignement standardisée a été remplie et signée par les personnes qui ont accepté de contribuer à cette étude (annexe 1). Elle portait sur : l'âge du volontaire, le sexe, la zone de résidence, l'hospitalisation et la prise d'antibiotique. Ce document avait pour but de savoir, pour chaque patient, s'il s'agissait d'une colonisation par une souche communautaire ou nosocomiale et pour déterminer la population à risque d'héberger un ERV. L'approbation éthique de l'étude a été obtenue en 2014 auprès du Comité d'Ethique de l'Institut Pasteur du Maroc (Casablanca, Maroc).

113 échantillons de selles ont été prélevés auprès des volontaires en bonne santé vivant à Casablanca. Ces derniers n'ont pas d'antécédents médicaux et n'ont pas été hospitalisés durant les 12 derniers mois qui précède l'étude. Le prélèvement de selles est effectué par le patient dans un pot stérile à coprologie. Ce flacon est hermétiquement fermé. Chaque prélèvement est accompagné d'une référence personnelle et d'une fiche renfermant les renseignements déjà cités. Une fois récupéré, une noisette de chaque prélèvement reçu est directement mise en culture dans un tube contenant le bouillon d'enrichissement BHI (Brain Heart Infusion) (Annexe 2). Ensuite les tubes préparés sont vortexés et incubés à 37°C pendant 24h, puis conservés à -20°C.

### **2. Identification bactérienne**

#### **2.1 Caractères morphologiques**

L'identification des souches a été faite sur la base d'une étude préliminaire basée sur des caractères morphologiques et biochimiques des bactéries.

La recherche des entérocoques a été effectuée par l'ensemencement des cultures enrichies dans un milieu sélectif Bile Esculine Azide (BEA) en procédant par stries serrées. Les boîtes ensemencées sont mises à l'étuve à 37°C pendant 24h. Le BEA permet l'isolement sélectif des *Enterococcus* et *Streptococcus* du groupe D : l'azoture de sodium inhibe la croissance des bactéries Gram négatif et de tous les streptocoques sauf ceux du groupe D, et la bile de bœuf inhibe la croissance des bactéries Gram positif. La culture positive se manifeste par la présence de petites colonies, avec un aspect lisse, légèrement convexe et entourées d'un halo noir. Les entérocoques hydrolysent l'esculine en glucose et esculetine. Ce dernier composé

forme un complexe noir en présence des ions ferriques apportés par le citrate de fer contenu dans le milieu.

La coloration de Gram permet de mettre en évidence les caractères morphologiques des bactéries. Elle différencie ainsi les bactéries Gram positif (colorées en violet) des bactéries Gram négatif (colorées en rose) (Annexe 3). Cette technique a été réalisée pour chaque souche présentant l'aspect caractéristique des entérocoques, pour confirmer la présence de cocci de couleur violette (gram +), de forme ovulaire, groupés en diplocoques ou en courte chaînette.

## 2.2 Recherche de catalase

Ce test est important pour la première orientation dans l'identification d'une souche pure d'entérocoques / streptocoques du groupe D. La catalase est une enzyme qui permet la transformation de l'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) en eau ( $H_2O$ ) et dioxygène ( $O_2$ ).

Une petite quantité de culture bactérienne jeune (18-24 heures), prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur à partir de la gélose M-H (entérocoques), placée sur une lame, puis quelques gouttes du peroxyde d'hydrogène y sont ajoutées. Si la catalase est positive, on observe immédiatement l'apparition de bulles dues au dégagement gazeux de dioxygène. L'absence d'une effervescence signe que la catalase est négative comme dans le cas des entérocoques.

## 2.3 Tests confirmatifs

Afin de distinguer entre les entérocoques et les streptocoques, un test de croissance sur un bouillon hypersalé (6.5% NaCl) et un test de résistance à la chaleur ont été établis.

- **Résistance à 60°C** : les entérocoques sont des bactéries caractérisées par leur capacité à supporter l'action de la température (60°C pendant 30 minutes). Et pour cela on repique des colonies homogènes dans des tubes à hémolyse contenant 5mL d'eau distillée. Ces tubes sont ensuite placés dans le bain marie à 60°C durant 30 minutes. Après le chauffage, les suspensions préparées sontensemencées sur milieu BEA à l'aide d'une anse stérile. L'incubation est faite à 37°C pendant 24 h.

Toute pousse confirme l'appartenance de la bactérie au genre *Enterococcus* et l'élimination de son appartenance à d'autres genres bactériens (*Streptococcus D...*).

• **Résistance dans un milieu hypersalé** : les colonies d'entérocoques sont repiquées dans un bouillon BHI hypersalé (6.5% NaCl). Les tubes repiqués sont ensuite incubés à 37°C pendant 24 heures. La présence d'un trouble est synonyme du développement des entérocoques dans les tubes. Ce milieu sert essentiellement à la confirmation de la présence des entérocoques ainsi que leurs différenciations des streptocoques du groupe D. En effet, les entérocoques sont connus par leur capacité à tolérer et à se développer dans un milieu hypersalé contenant jusqu'à 6.5% de NaCl.

## 2.4 Identification biochimique

En plus des caractères morphologiques, l'identification a aussi été effectuée sur la base de quelques caractères biochimiques. Toutes bactéries cocci Gram positif, catalase négative, esculinase positive, et résistantes à l'hyper salinité et à l'action de la chaleur sont identifiées par la méthode Api 20 STREP.

• **Principe** : La galerie Api 20 STREP comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentations de sucre. Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension bactérienne dense qui réhydrate les substrats. Les réactions produites se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH) qui réhydrate les sucres. La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification qui se traduit par un virage spontané de l'indicateur coloré. La lecture est faite à l'aide du tableau de lecture de la galerie api 20 STREP et l'identification par le catalogue analytique.

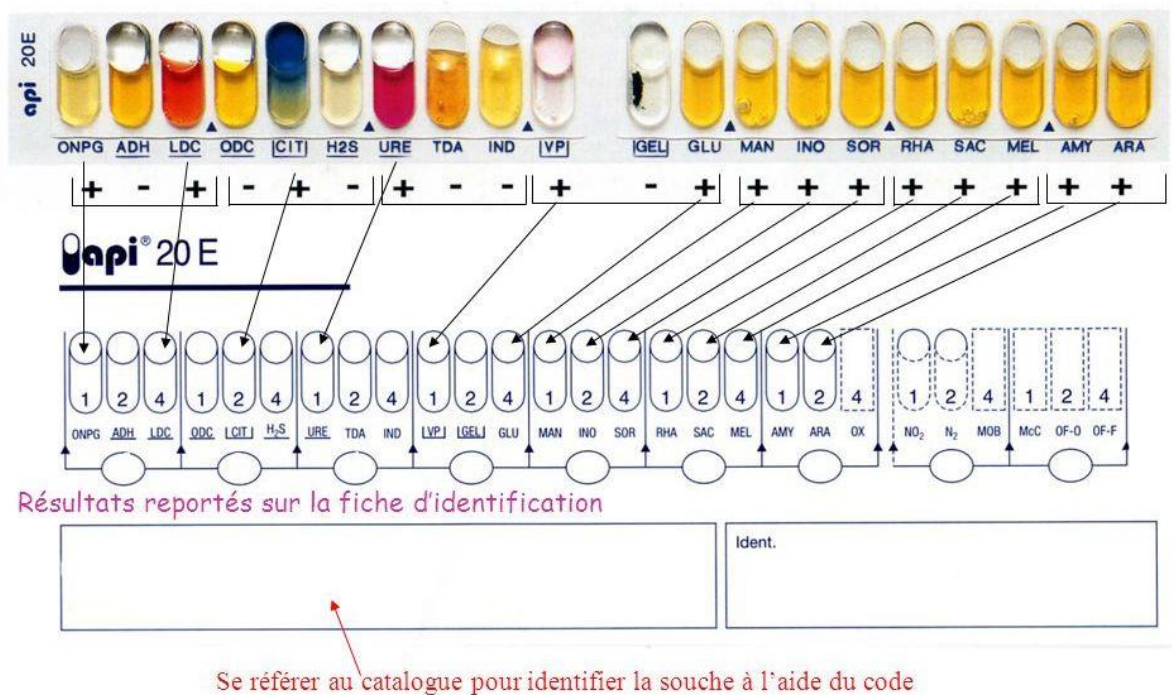
• **Préparation de l'inoculum** : Une suspension de la souche à étudier est réalisée. Elle doit avoir une densité de 4 McFarland.

• **Inoculation de la galerie** : Les cupules sont remplies de suspension en évitant les bulles d'air. Les tests soulignés (ADH à GLYG) sont remplis avec de l'huile de paraffine. Ensuite les boîtes sont fermées puis incubées à 37°C à l'étuve pendant 24 heures en présence d'humidité créé par la répartition de 5ml d'eau distillée ou déminéralisée.

• **Lecture de la galerie** : Après 24 heures d'incubation les boîtes sont retirées de l'étuve et les réactifs de révélation sont ajoutés (tableau 4) :

- Sur VP, une goutte de VP1 et une goutte de VP2 sont ajoutées.
- Sur HIP, 2 gouttes de NIN sont ajoutées.
- De PYRA à LAP, une goutte de Zym A et une goutte de Zym B.

La lecture est faite 10 minutes après l'ajout des réactifs. L'identification de l'espèce est obtenue à l'aide d'un catalogue (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) (Annexe 4). Les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres qui constituent le code d'identification (figure 24).



**Figure 24:** Lecture des résultats de l'identification biochimique des entérocoques par la galerie Api 20 E.

### 3. Antibiogramme

La connaissance du spectre d'activité des antibiotiques (et donc de la résistance naturelle des bactéries) devrait permettre d'instaurer un traitement. Dans la réalité, La situation est beaucoup plus complexe car les bactéries peuvent acquérir des résistances aux antibiotiques par modification de leur capital génétique (mutation, acquisition de plasmides, acquisition de transposons). Cette résistance acquise préexiste à la prise des antibiotiques mais l'utilisation intense de ces molécules conduit à une sélection de beaucoup de souches résistantes. Ainsi, dans de nombreux cas, la seule identification de l'espèce bactérienne ne permet plus de prédire l'efficacité d'une antibiothérapie.

La résistance aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion de disque (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), en milieu gélosé M-H (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) selon les recommandations décrites par l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (L'EUCAST, 2014) (<http://www.eucast.org/>). Huit antibiotiques connus pour être actifs sur les entérocoques ont été utilisés : Vancomycine (VAN, 30 µg), Teicoplanine (TEC, 30 µg), Lincomycine (L, 15 µg), Kanamycine (KAN, 1mg), Gentamicine (GEN, 500 µg), Tétracycline (TE, 30 µg), Erythromycine (E, 15 µg) et Rifampicine (RA, 30 µg).

### **3.1 Modalités de réalisation de l'antibiogramme**

A partir des cultures de 18-24h sur milieu gélosé non sélectif, nous avons réalisé une suspension bactérienne en dissociant quelques colonies identiques et bien séparées dans 3 ml d'eau physiologique stérile. L'ajustement de la densité à 0.5 Mc Farland (concentration de  $10^8$  bactéries par ml) est réalisé à l'aide d'un densitomètre. A partir de cette suspension, on ensemence les boîtes de gélose Muller Hinton à l'aide d'un écouvillon stérile en réalisant quatre couches de stries sèches en retournant la boîte 45° pour chaque couche. Le choix des disques d'antibiotiques à tester dépend de l'espèce bactérienne, la fréquence des mécanismes de résistances, des habitudes de prescription, du spectre d'action de l'antibiotique et de l'origine du prélèvement.

A l'aide d'une pince stérile, on dépose les disques d'antibiotiques à la surface de la gélose sans glissement en appuyant légèrement et on incube les boîtes à 37°C pendant 18 à 24h. Afin d'éviter le chevauchement des zones d'inhibitions nous avons respecté une distance de 15 mm entre le bord de la boîte et les disques périphériques puis une distance de 30 mm entre deux disques.

### **3.2 Lecture de l'antibiogramme**

Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibitions dépendent uniquement de la sensibilité du germe. On a mesuré à l'aide d'une règle les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques. L'interprétation en sensible (S) intermédiaire (I) ou résistant (R) est effectuée selon les critères définis par La CA-SFM (tableau 4).

- Les souches sensibles à la vancomycine : sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement avec la posologie recommandée, et dont le diamètre est supérieur à 17mm.
- Les souches résistantes à la vancomycine : sont celles pour lesquelles il existe un échec thérapeutique en cas de traitement à la vancomycine, et dont le diamètre est inférieur à 17mm. Dans ce cas il faut chercher le gène *van*, responsable de la résistance des entérocoques à cet antibiotique.
- Les souches intermédiaires : le succès thérapeutique pour ces souches est imprévisible, et les résultats obtenus in vitro ne sont pas prédictifs d'un traitement réussi.

**Tableau 4:** Charges des disques et les diamètres critiques des 8 antibiotiques testés.

Antibiotique	Abréviation	Charge de disque	Famille	Diamètre critique (mm)	
				S $\geq$	R<
Vancomycine	VAN	30 $\mu$ g	Glycopeptide	17	17
Teicoplanine	TEC	30 $\mu$ g	Glycopeptide	17	17
Lincomycine	L	15 $\mu$ g	Lincosamide	21	17
Kanamycine	KAN	1000 $\mu$ g	Aminoside	14	10
Tétracycline	TE	30 $\mu$ g	Tétracycline	19	17
Erythromycine	E	15 $\mu$ g	Macrolide	22	17
Rifampicine	RA	30 $\mu$ g	Ryfamycine	19	14
Gentamicine	GEN	500 $\mu$ g	aminoglycosides	17	17

#### 4. Caractérisation moléculaire des gènes de résistance à la vancomycine et des gènes spécifiques d'entérocoques

La recherche de la résistance à la vancomycine a été effectuée par la méthode de diffusion du disque de la vancomycine. Un diamètre d'inhibition autour de ce disque de moins de 17 mm témoignait de la suspicion de la présence d'un EVR. Cette diminution de la zone de sensibilité a été confirmée par la détermination de la CMI de la vancomycine par les bandelettes E-test (AB Biodisk, solna, Suède) sur des géloses de M-H, selon les recommandations du fournisseur. La mise en évidence du gène responsable de cette résistance (*van*) a été réalisée par une PCR.

#### **4.1 Méthodes d'étude de la sensibilité à la vancomycine par E-test**

##### **a) Définition de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

Elle se définit comme la plus petite concentration d'antibiotique ou de produit qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18-24h de culture à 35-37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique de l'antibiotique. Plus la CMI d'un antibiotique est faible, plus son effet antimicrobien est prononcé.

Différentes techniques pour déterminer la CMI sont possibles : en milieu gélosé (par E-test ou par dilution sur gélose) ou en milieu liquide avec différentes concentrations de substances.

##### **b) Principe de la méthode E-test**

L'E-test est basé sur la combinaison des techniques de dilution et de diffusion. Cette technique permet de quantifier directement la susceptibilité antibactérienne en termes de valeurs distinctes de CMI qui sont déterminées à partir d'antibiotiques avec des gradients prédéfinis et continus de concentration. Ces valeurs peuvent être plus précises que les valeurs des CMI conventionnelles obtenues avec deux séries discontinues de dilutions.

L'E-test diffère de la méthode conventionnelle des disques par l'utilisation de gradients de concentrations d'antibiotiques prétestés.

L'E-test se compose d'une bande de plastique inerte non poreuse de 5 mm de large et de 50 mm de long. Sur une face des bandelettes est marquée l'échelle de lecture des CMI en µg/ml, en plus deux lettres codées donnent le nom de l'antibiotique. Un gradient exponentiel préconçu d'antibiotiques secs et stables est immobilisé sur l'autre face de la bande de la concentration maximale à la concentration minimale.

Le gradient couvre des concentrations continues allant de 0.016 à 256 µg/ml ou de 0.002 à 32 µg/ml selon les antibiotiques.

Lorsqu'une bande d'E-test est appliquée sur une gélose en plaque et incubée, il y a libération immédiate de l'antibiotique à la surface de contact avec la gélose.

Après l'incubation, lorsque la croissance bactérienne est devenue visible, une ellipse symétrique d'inhibition centrée le long du porteur apparaît. La zone tranchante entrecoupant la bande donne la valeur de CMI en µg/ml.

##### **c) Inoculation et lecture**

- A partir de cultures viables et fraîche de 18-24h, nous avons préparé une suspension dense avec l'eau distillée, dont la turbidité est de 0.5 McFarland ( $1.10^8$  UFC/ml).
- Ensuite nous avons plongé un écouvillon stérile dans le tube contenant l'inoculum.

- Nous avons bien essoré l'écouvillon sur les bords du tube et nous avons écouvillonné entièrement la surface de la gélose M-H dans les trois directions puis nous avons remis les boîtes à sécher à 36°C avant l'application des bandes E-test.
- Il faut s'assurer que la surface de la gélose est bien sèche a fin de déposer la bande fermement sur la gélose. Une fois la bande déposée, elle ne doit plus être déplacée pour éviter de gêner la diffusion immédiate de l'antibiotique. Les boîtes sont ensuite incubées à  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 18 à 24 heures.
- les boîtes ne sont lues qu'après la période d'incubation et à condition d'avoir une ellipse d'inhibition clairement visible. La CMI est lue au point d'intersection de l'ellipse et de l'échelle. La lecture doit se faire au niveau de la terminaison en pointe où il y a une inhibition complète de toute croissance y compris les voiles et les colonies isolées.

## **4.2 Modalités de réalisation de la PCR**

### **a) Extraction d'ADN bactérien**

L'extraction de l'ADN est faite par le Mini Kit (The Pure Link Genomic DNA Kits) (Invitrogen, Carlsbad, CA) selon les recommandations du fabricant. Cette extraction permet une purification rapide et efficace de l'ADN génomique (le kit est conçu pour isoler efficacement l'ADN génomique des bactéries). Après avoir préparé les lysats, l'ADN est purifié en utilisant une centrifugation à base de colonne permettant une séparation à haut débit de l'ADN. Ce dernier serait prêt pour la réalisation de la PCR (Annexe 5).

La quantité, ainsi que la qualité de l'ADN extrait peuvent être déterminées par électrophorèse d'un aliquot d'ADN extrait sur un gel d'agarose à 0.8% pendant 20 min à 100V et coloration en bromure d'éthidium (BET) (Merck, Darmstadt, Germany). Le BET est un agent intercalant fluorescent par illumination en lumière ultraviolette (UV, 260-360). La quantité de l'ADN est déduite à partir du profil obtenu. Une bande de haut poids moléculaire indique que l'ADN est non dégradé. Par contre une trainée est indicatrice de l'état dégradé de l'ADN extrait.

L'ADN n'est visible à l'œil nu. Pour cela, on mélange la solution d'ADN avec du tampon de charge (Annexe 2) contenant :

- Du glycérol qui permet d'augmenter la densité de la solution d'ADN à déposer dans le gel afin de pouvoir l'entraîner vers le fond du puits. Cela évite à l'échantillon de remonter à la surface du tampon et donc de contaminer les autres puits.
- Deux marqueurs de mobilité (bleu de bromophénol et xylène-cyanol) permettant de visualiser la migration.

L'ADN récolté a été quantifié par spectrophotométrie. La concentration de l'échantillon d'ADN est déterminée en mesurant la valeur d'absorption à 260 nm. Sachant qu'une unité de densité optique (DO) est équivalente à 50 µg/ml d'ADN double brin, la concentration d'ADN se calcule selon la formule suivante :

$$[\text{ADN}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = (\text{Absorbance } 260\text{nm}) \times 50 \mu\text{g}/\text{ml} \times \text{Facteur de dilution} / 1000$$

Pour évaluer la pureté de l'ADN extrait, le rapport R (=Absorbance 260nm/ Absorbance 280nm) est calculé. Ce rapport permet d'évaluer le degré de purification des protéines résiduelles qui absorbent à 280 nm. Un ADN double brin pur donne une valeur R variant entre 1.8 et 2.50.

Les ADN identifiés purs sont conservés à +4 °C jusqu'à l'obtention des résultats de la PCR. Ils sont ensuite rangés dans des boîtes de conservation à -20 °C.

#### **b) Détection de la présence des gènes de résistance à la vancomycine et des gènes spécifiques des espèces d'entérocoques :**

Toutes les souches d'entérocoques ayant été isolées ont fait l'objet d'une étude moléculaire. Une PCR Multiplex a été réalisée pour détecter la présence des gènes les plus courants *vanA*, *vanB* et *vanC* codant pour la résistance aux glycopeptides chez les entérocoques et les gènes *ddl* codant pour D-alanine:D-alanine ligases, spécifiques des espèces d'entérocoques à savoir *ddl E. faecalis* (spécifique à *E. faecalis*) et *ddl E. faecium* (spécifique à *E. faecium*).

L'identification des gènes amplifiés est alors réalisée selon la taille des fragments amplifiés, après migration électrophorétique en gel d'agarose. Les autres gènes de résistance aux glycopeptides décrits (*vanD*, *vanG*, *vanE*...) n'ont pas été recherchés.

#### **c) Principe de la PCR Multiplex**

La PCR est une puissante technique analytique et préparatoire qui est largement utilisée. Alors que la PCR standard utilise généralement une paire d'amorces pour amplifier une séquence spécifique, la PCR multiplex utilise des paires multiples d'amorces pour amplifier simultanément un grand nombre de séquences. On économise ainsi le temps et les réactifs. Cette réaction enzymatique de polymérisation a lieu lorsqu'on met en présence les substrats et les catalyseurs, dans des proportions bien définies.

La réaction se déroule en trois étapes :

**La dénaturation** : étape au cours de laquelle les brins d'ADN sont dénaturés, par chauffage à 94°C généralement pendant environ 1 minute. Cette étape est parfois prolongée de quelques minutes, notamment pour permettre l'activation de polymérases protégées par des anticorps ou des agents chimiques.

**L'hybridation** : étape au cours de laquelle les deux amorces se collent aux brins simples d'ADN. La température à laquelle se déroule cette étape est un paramètre critique : elle dépend de la taille et de la composition des amorces et doit être optimisée pour tout couple d'amorces afin d'avoir une efficacité et une spécificité maximales (plus la température est élevée, plus les amorces se lieront spécifiquement au brin d'ADN cible jusqu'à une température limite où elles ne s'hybrideront plus).

**L'élongation** : étape au cours de laquelle l'ADN polymérase synthétise le brin d'ADN complémentaire à partir de l'amorce. Elle ajoute les nucléotides complémentaires au brin d'ADN à partir de l'extrémité 3' de l'amorce. La température à laquelle se fait cette étape est en général proche de 70-72°C. La durée est proportionnelle à la taille du fragment à amplifier et dépend de la polymérase utilisée.

La PCR consiste à répéter plusieurs fois ces trois étapes au cours de chaque cycle thermique, en vue d'avoir une grande quantité du fragment d'ADN cible dans le milieu réactionnel.

Tout au long de notre travail, les amplifications ont été réalisées grâce à un thermocycleur GenAmp™ 9700 (Applied Biosystems).

#### **d) Interprétation des résultats et contrôle de qualité**

Pour chaque réaction de PCR, le témoin négatif (tube sans ADN) ne doit montrer aucune amplification.

Le(s) témoin(s) positif(s) et le témoin de migration doivent chacun présenter une ou des bandes de taille correspondant au(x) fragment(s) amplifié(s) du ou des gènes recherchés.

Les souches dont les amplifiats ont présenté une bande de taille identique à celle du témoin ont été considérées positives pour le gène recherché. Les souches qui ont présenté une absence d'amplification d'un fragment de taille différente à celle du témoin ont été généralement considérées négatives pour le gène recherché.

### e) Mélange réactionnel de la PCR multiplex

Le mélange réactionnel est réalisé dans un volume total de 100 µL contenant le tampon de la Taq PCR 1x concentré ; 1.25 mM de MgCl<sub>2</sub> ; 125 µM de deoxyribonucléoside triphosphate (dNTP) ; 0.4 µM de chaque amorce ; 2U de la Taq polymérase (Invitrogen, Carlsbad, Californie, États-Unis) et 5 µL de l'ADN bactérien (Tableau 5).

**Tableau 5:** Mélange réactionnel de la PCR multiplex pour chercher les gènes *vanA*, *vanB*, *vanC*, *ddl E. faecalis* et *ddl E. faecium*.

Réactifs	Concentration pour un seul échantillon	Volume en µL pour un seul échantillon
Tampon 10 x	1x	10
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1.25 mM	2.5
Amorces (20 mM) (*10)	0.4 µM	2(*10)
dNTP (5 mM)	125 µM	2.5
Taq polymérase (5U/ µL)	2 U	0.4
Eau de biologie moléculaire		59.6
ADN		5

Les souches de contrôles sont fournies par l'institut Pasteur de France. L'ADN des souches de contrôle, inclus comme témoin positif, a été préparé en faisant une extraction par le Mini Kit (The Pure Link Genomic DNA Kits). Les souches de contrôle ainsi que les amorces utilisées sont indiquées respectivement dans les tableaux 6 et 7. Pour le témoin négatif l'ADN est remplacé par l'eau bidistillée stérile.

**Tableau 6:** Souches contrôles utilisées pour détecter la présence des gènes *vanA*, *vanB*, *vanC*, *ddl E. faecalis* et *ddl E. faecium*.

Espèce d'entérocoque	Code	souches de référence	Gènes
<i>E. faecium</i>	BM4107	UAA 530	<i>ddlE. faecium</i>
<i>E. faecalis</i>	JH2-2	UAA 174	<i>ddlE. faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	BM4147	UAA 4147	<i>ddlE. faecium</i> ; <i>vanA</i>
<i>E. faecalis</i>	V583	UAA 432	<i>ddl E. faecalis</i> ; <i>vanB (van B1)</i>
<i>E. faecalis</i>	BM4316		<i>ddl E. faecalis</i> ; <i>vanA</i>
<i>E. gallinarum</i>	BM4174	UAA 604	<i>vanC (van C1)</i>

**Tableau 7:** Couples d'amorces utilisées pour l'amplification simultanée des gènes *vanA*, *vanB*, *vanC*, *ddl E. faecalis* et *ddl E. faecium*.

Gène	Primer	Séquence du primer (5' 3')	Taille du gène (bp)
<i>vanA</i>	EA1	GGG AAA ACG ACA ATT GC	732
	EA2	GTA CAA TGC GGC CGT TA	
<i>vanB</i>	EB3	ACG GAA TGG GAA GCC GA	647
	EB4	TGC ACC CGA TTT CGT TC	
<i>vanC1/vanC2</i>	EC5	ATG GAT TGG TA(C/T)T(G/T)G TAT	815/827
	EC8	TAG CGG GAG TG(A/C) C(C/T)(A/C) GTA A	
<i>ddl E. faecalis</i>	DD13	CAC CTG AAG AAA CAG GC	475
	DD32	ATG GCT ACT TCA ATT TCA CG	
<i>ddl E. faecium</i>	FAC1	GAG TAA ATC ACT GAA CGA	1092
	FAC2	CGC TGA TGG TAT CGA TTC AT	

Les amplifications des gènes recherchés sont réalisées selon le programme mentionné dans le tableau 8.

**Tableau 8:** programme d'amplification des gènes *vanA*, *vanB*, *vanC*, *ddl E. faecalis* et *ddl E. faecium*.

Nombre de cycle	Température (°C)	Durée (min)
1	94	3
30	94	1
	54	1
	72	1
1	72	7

## f) Electrophorèse des produits de la réaction PCR

Les produits de la réaction PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (FMC Bioproducts, Rockland, ME). L'électrophorèse est effectuée dans du TBE à 90 mA pendant 45 min. Une fois l'électrophorèse est terminée, les profils obtenus sont visualisés sous lumière Ultra-violette. Une photo du gel est prise avec un appareil photo numérique Olympus (Olympus, Munich, Allemagne).

## 5. Amplification et séquençage du gène de l'ARNr 16S

### 5.1 Amplification du gène de l'ARNr 16 S

#### a) Mélange réactionnel de la PCR

La PCR séquençage de l'ARNr 16S est intéressante pour l'identification précise des souches d'entérocoques, pour lesquelles les galeries d'identification sont peu fiables ou ne donnent pas de résultats satisfaisants.

Les gènes d'ARNr 16S ont été amplifiés à partir de l'ADN extrait à partir des échantillons en utilisant une amorce sens spécifique du domaine *Bacteria* Bact 008F et 46F spécifique aux *Planctomycetes* et une amorce anti sens universelle Univ 1390R (tableau 10). L'ADN polymérase utilisée est la TaKaRa Ex Taq (Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, France). La composition du mélange réactionnel est résumée dans le tableau 9. La T4 gène 32 protein (biolabs, Ipswich, MA, États-Unis) est ajouté dans le mélange réactionnel pour réduire l'effet inhibiteur des acides humiques sur la réaction d'amplification.

**Tableau 9:** Mélange réactionnel de la PCR séquençage du gène de l'ARNr 16S.

Mélange réactionnel	Volume pour une amplification (µl)
Eau de biologie moléculaire	37,375
Tampon PCR ×10	5
dNTP (2,5 mM chacun)	4
Amorce F (25µM)	1
Amorce R (25µM)	1
TaKaRa Ex Taq 5U/µL	0,25
T4 GEN 32 Protéine 10 µg/ µL	0,375
ADN	1
Volume final	50

Le programme suivant a été utilisé pour l'amplification par PCR : après une dénaturation pendant 5 min à 94°C, 25 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1 min, hybridation des amorces à 59°C pendant 1 min puis élongation à 72°C pendant 1 min 30 sont réalisés, suivis par une extension finale de l'ADN à 72°C, pendant 15 minutes.

**Tableau 10:** Conditions de la PCR et séquençage du gène de l'ARNr 16S et les amorces utilisés.

Banque	Amorces Forward	Amorces Reverse	Température d'hybridation	Nombre de cycles
Bactérie	008F= AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1390R= GACGGGCGGTGTGTACAA	59 °C	25
Planctomycétales	46F= GGATTAGGCATGCAAGTC	1390R= GACGGGCGGTGTGTACAA	59 °C	30

### b) Electrophorèse sur gel d'agarose

La qualité de l'ADN amplifié est visualisée aux U.V après migration sur un gel d'agarose à 1% dans du tampon TBE 0,5x. Dans chaque puits, 2 µL de produit PCR avec 5 µl de tampon de charge sont déposés et 5 µL de l'eau. Les produits PCR sont ensuite purifiés avec un kit commercial (QIAquick PCR Purification Kit Protocol, Qiagen). Après purification, la quantification sur gel est ensuite réalisée dans le but de déterminer la concentration du produit PCR purifié, par rapport au marqueur moléculaire 1Kb.

## 5.2 Séquençage du gène de l'ARNr 16S

### a) Principe du séquençage

La détermination de la séquence nucléotidique repose sur la séparation électrophorétique de fragments simples brin dérivés d'une même molécule d'ADN. Ces fragments sont marqués par des radio-isotopes ou, maintenant plus fréquemment, des fluorochromes pour permettre leur détection. Quatre réactions sont effectuée en parallèle pour obtenir des molécules identiques à leur extrémité 5' mais de longueurs variables, leurs extrémité 3' étant chacune des quatre réactions fixée par la nature de chacune des quatre bases constitutives de l'ADN [263-265]. Ces réactions sont de nature chimique ou enzymatique.

Dans le premier cas [263], des réactions partielles spécifiques de chacune des quatre bases aboutissent à l'hydrolyse du fragment.

Dans le second cas, (méthode de Sanger) [264], l'élongation d'une amorce est terminée de façon ménagée par l'incorporation aléatoire d'un analogue de nucléotide nommé didésoxyribonucléotide Triphosphate (ddNTP). Le principe de la technique de Sanger est basée sur l'utilisation de ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP et ddGTP) qui, incorporés dans une chaîne d'ADN en cours de répllication, provoquent un arrêt de l'élongation de cette chaîne car ils sont dépourvus du radical hydroxyle sur le carbone 3' sur le squelette osidique (3' H au lieu de 3' OH).

Le séquençage automatique utilise une variante de la technique de Sanger en utilisant le marquage des nucléotides à l'aide de fluorochromes.

Dans une réaction appelée « cycle sequencing » le fragment d'ADN à séquencer est obtenu par PCR puis mis en présence d'un milieu réactionnel contenant :

- L'amorce (oligonucléotide) à partir de laquelle la synthèse du néobrin sera réalisée par une ADN polymérase
- Les 4 déoxynucléotides (dA, dT, dC, dG)
- Les 4 didéoxynucléotides (ddA, ddT, ddC, ddG) marqués chacun par un fluorochrome distinct
- Une ADN polymérase (en général la Taq polymérase = une séquinase)
- Le tampon Big Dye

Comme dans une réaction de PCR, ce mélange est soumis à une succession de cycles et chaque cycle de séquençage est composé de trois étapes (dénaturation, hybridation de l'amorce et élongation).

Le principe ressemble à une amplification avec une seule amorce, l'amplification est donc linéaire. L'étape de dénaturation à 96°C sépare les 2 brins d'ADN qu'on voudrait séquencer. Pendant l'étape de l'hybridation, l'amorce se lie à sa région complémentaire sur l'ADN simple brin et servira comme point de départ pour la synthèse du brin complémentaire par l'ADN polymérase (une séquinase). L'ensemble est soumis à une succession de cycles de polymérisation au cours desquels l'ADN polymérase peut, au niveau de chaque nucléotide de l'ADN matrice, incorporer un déoxynucléotide ou un didéoxynucléotide. Dans le cas où elle incorpore un déoxynucléotide, la synthèse peut continuer, dans le cas contraire elle s'arrête. Ce choix étant aléatoire, chaque base de l'ADN matrice aura statistiquement vu un certain nombre de fois l'incorporation d'un didéoxynucléotide, si bien que le milieu réactionnel

contient l'ensemble des molécules néosynthétisées possibles. Lors de la prochaine étape de dénaturation, les brins d'ADN néosynthétisés sont séparés de la molécule d'ADN matrice et un nouveau cycle de synthèse peut commencer. Il résulte une solution qui contient des fragments d'une longueur variable, marqués par un colorant fluorescent. Ces molécules sont ensuite dénaturées puis migrées dans un gel d'électrophorèse (polymère) afin d'être séparées selon leurs taille. On peut ainsi reconstituer la séquence en analysant la nature du fluorochrome terminant chacun de ces fragments néosynthétisés, du plus petit (premier nucléotide de la matrice) au plus grand (dernier nucléotide de la matrice). Cette analyse est réalisée à l'aide d'un séquenceur automatique : cet appareil pourvu d'une source laser ou infra-rouge qui excite les fluorochromes portés par les ddNTP après que les fragments aient migré sur le gel. Cette excitation provoque une émission de lumière à une longueur d'onde dépendant de la nature du fluorochrome. Les signaux lumineux émis enregistrés sont ensuite traités avec des logiciels spéciaux pour les traduire en séquences nucléotidique.

#### **b) Protocole de Séquençage du gène de l'ARNr 16S**

Les échantillons amplifiés par PCR, ont été purifiés à l'aide de Shrimp phosphatase alcaline (SPA) et l'exonucléase I pour éliminer les amorces et les nucléotides libres (annexes 6). La réaction du séquençage est réalisée à l'aide des amorces sens ou antisens utilisés pour la PCR en utilisant la technique de terminaison des chaînes à l'aide des ddNTP fluorescents [264], et le big dye « ABI Prism™ Big Dye Terminator cycle sequencing » (Applied Biosystems, Foster City, CA). Après réaction de séquence, les produits sont précipités par l'éthanol et l'EDTA. Les produits précipités sont mis en suspension dans du formamide, puis déposés pour migration sur le séquenceur automatique 3130x1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Les séquences sont ensuite analysées par le logiciel Phrap qui permet de lire les séquences et leur assigner une note de qualité ensuite Phrap qui assemble et aligne les séquences et enfin le logiciel Consed qui permet l'édition et la visualisation des séquences sous forme de succession de bases ou de chromatogrammes.

## **6. Etude de la virulence des entérocoques**

### **6.1 Formation de biofilm**

Une colonie de chaque souche étudiée (n=100) est incubée dans des tubes contenant 1mL de BHI pendant 18h à 37°C sous agitation. Pendant ce temps, on prépare 11 microplaques qui auront chacune un temps d'incubation (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 et 24 heures) une fois inoculées par les souches bactériennes. Dans chaque puits de la microplaque on distribue

160µL de milieu de culture BHI stérile et 20µL de la suspension bactérienne préalablement préparée. Les microplaques sont recouvertes par du parafilm puis incubées pendant 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 et 24 heures à 37°C sans agitation.

Après incubation, les bactéries non adhérentes sont éliminées par des lavages successifs à l'eau. Les plaques sont ensuite séchées 20 min à l'air libre. Les bactéries adhérentes sont révélées par l'addition de 200µL du cristal violet (0.1%). Après 15 min de coloration, le lavage est réalisé deux fois avec de l'eau. La formation de biofilm est caractérisée par l'apparition d'un anneau violet au milieu des puits. L'anneau des bactéries adhérentes est alors solubilisé par ajout de 200 µL par puits d'une solution d'éthanol à 95% ou 200µL d'éthanol-acétone (80:20). Le temps de contact est de 15 min.

Enfin la mesure de la densité optique (550 nm) aux intervalles de temps séparés (2, 4, 6, 8, 16, 18, 20 et 24 heures) nous permet de suivre la cinétique de formation de biofilm. Nous avons utilisé la classification décrite par Mathur et al en 2006 [266].

## 6.2 Recherche des gènes de virulence

Le mélange réactionnel (50 µL) nécessaire pour réaliser cette PCR est composé du tampon Taq 1x ; 2.5 µM de MgCl<sub>2</sub> ; 0.2 µM de deoxyribonucléoside triphosphate (dNTP), 0.4 µM de chaque amorce, 2U de la Taq polymérase (Invitrogen) et 5µL d'ADN bactérien (tableau 11).

**Tableau 11:** mélange réactionnel pour la détection des gènes de virulence *asa1*, *gelE*, *cylA*, *hyl* et *esp* par PCR.

Réactifs	Concentration pour un seul échantillon	Volume en µL pour un seul échantillon
Tampon 10x	1x	5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2.5 µM	2.5
Amorces (20 mM) (*10)	0.4 µM	0.4 (*10)
dNTP (5 mM)	0.2 µM	2
Taq polymérase (5U/ µL)	2 U	0.4
Eau de la biologie moléculaire		31.1
ADN		5

Deux souches de références : *E. faecalis* MMH594 (positive pour *asa1*, *gelE*, *cylA*, et *esp*) et *E. faecium* C68 (positive pour *hyl* et *esp*) ont été utilisées comme des témoins positifs.

Les amorces utilisées dans cette PCR sont détaillées dans le tableau 12.

**Tableau 12:** amorces utilisées pour la détection de quelques gènes de virulences par PCR.

Facteur de virulence	Gène	Nom de l'amorce	Amorces (5' 3')	Taille du gène (pb)
Hémolysine ou cytolysine	<i>Cyl A</i>	CYT I	ACTCGGGGATTGATAGGC	688
		CYT IIb	GCTGCTAAAGCTGCGCTT	
Aggrégation substance	<i>asa1</i>	ASA 11	GCACGCTATTACGAACTATGA	375
		ASA 12	TAAGAAAGAACATCACCACGA	
Glatinase	<i>gel E</i>	GEL 11	TATGACAATGCTTTTTGGGAT	213
		GEL 12	AGATGCACCCGAAATAATATA	
Enterococcal surface protein	<i>esp</i>	ESP 14F	AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG	510
		ESP 12R	AATTGATTCTTTAGCATCTGG	
Hyaluronidase	<i>hyl</i>	HYL n1	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG	276
		HYL n2	GACTGACGTCCAAGTTTCAA	

Les microtubes sont ensuite placés dans un thermocycleur (GeneAmp® PCR system 9700).

Les amplifications sont réalisées selon le programme mentionné dans le tableau 13.

Les produits de la réaction PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Dans du TBE (Merck, Darmstadt, Germany) à 90 mA pendant 1h30 min suivant le programme d'amplification mentionné dans le tableau 13. Dans chaque puits, 10 µL de produit PCR avec 2 µL de tampon de charge sont déposés. Une fois l'électrophorèse terminée, les profils obtenus sont visualisés sous lumière Ultra-violette. La taille des bandes a été estimée en comparant à des marqueurs de taille.

**Tableau 13:** Programme de la réaction PCR utilisé pour la recherche des facteurs de virulences *asa1*, *gelE*, *cylA*, *hyl* et *esp*.

Nombre de cycle	Température (°C)	Durée (min)
1	95	15
	94	1
30	56	1
	72	1
1	72	10

## 7. Champ pulse (PFGE)

Généralement, l'agent étiologique responsable d'une épidémie dérive d'une cellule unique, toutes les cellules issues de cette cellule seront génétiquement identiques ou très proches. Les organismes impliqués dans une épidémie ont donc une relation de clonalité. Ils appartiennent à la même espèce et présentent des caractéristiques communes comme par exemple des facteurs de virulence, des propriétés biochimiques et des caractéristiques génomiques. Un grand nombre de techniques de typage ont été développées, et certaines permettent même l'étude du polymorphisme au niveau de l'ADN. Mais, elles présentent des degrés de différences entre elles. Ainsi, parmi les critères à prendre en considération pour le choix d'une technique de typage de souches, il faut que cette technique ait une forte « typabilité », un pouvoir discriminant élevé et être reproductible. Le délai d'obtention des résultats et le coût sont généralement des critères à considérer pour évaluer le développement possible de la technique dans des laboratoires d'analyses médicales et pas uniquement dans un contexte de laboratoires de recherche.

### 7.1 Principe du PFGE

Le principe de base du champ pulsé est la digestion de l'ADN chromosomique par des enzymes de restrictions et la séparation des fragments générés par une électrophorèse. Une enzyme de restriction est un outil biologique qui coupe, de manière reproductible, la molécule d'ADN dans des sites correspondant à un motif de 4, 5 ou 6 bases spécifiques à l'enzyme. On dit aussi que l'enzyme digère une séquence. Les tailles des fragments qui résultent de ces coupures sont ensuite mesurées. La cartographie de restriction a pour objectif de reconstituer la séquence d'ADN en réordonnant les fragments issus des digestions.

L'électrophorèse en champ pulsé de l'ADN chromosomique bactérien digéré par des enzymes de restrictions est considérée comme la méthode de choix pour le typage moléculaire de nombreux pathogènes, dont les entérocoques.

Le champ pulsé permet de séparer des fragments d'ADN de très grande taille, de 10 à 800kb. Les bactéries sont enrobées dans l'agarose avant de subir une étape de lyse *in situ* afin de préserver l'intégrité physique de l'ADN. Celui-ci est ensuite digéré par une enzyme de restriction est considéré à sites rares. Le morceau d'agarose contenant l'ADN bactérien digéré est placé en haut d'un gel d'agarose et l'électrophorèse en champ pulsé est réalisée. La polarité du courant est modifiée à intervalles réguliers, ce qui permet de séparer des fragments de grande taille. Par conséquent, les fragments les plus petits vont migrer le plus rapidement.

Le gel est coloré au BET (Annexe 2) puis exposé sur une lampe UV pour visualiser les fragments d'ADN. Dans notre travail, l'analyse des isolats par électrophorèse en champ pulsé a été utilisée pour la caractérisation génétique des souches résistantes à la vancomycine les plus résistantes et virulentes.

L'électrophorèse a été réalisée avec un appareil Chef Drive DR III (Bio Rad laboratoires, Hercules, CA) dans un gel d'agarose 1% et du tampon TBE 0.5X. Le gel coloré par du BET est photographié sous lumière UV à l'aide d'une caméra Olympus digitale (Olympus, Münster, Germany).

## **7.2 Protocole du PFGE**

- Repiquer les souches sur le milieu MH et incuber à 37°C pendant 18h à 24h
- Mettre en suspension quelques colonies dans un ml de tampon TN
- Mesurer et régler la DO de chaque souche à 3 à 4 McF ou ( $A_{620}=5$ )
- Mélanger 200µl de la suspension bactérienne avec 200µl d'agarose low melting point
- Répartir le mixte rapidement dans les moules et laisser les blocs se solidifier dans une température égale à 4°C pendant 15min
- Mettre un bloc dans 2ml de la solution de lyse EC et incuber au bain marie à 37°C pendant 3h
- Transférer les blocs dans un nouveau tube et ajouter 2ml du tampon ESP et incuber à 56°C pendant 2h
- Laver 3 fois les blocs avec 5ml d'eau ultrapure préchauffée à 50°C et incuber au bain marie à 50°C pendant 15min sous agitation lente
- Transférer les blocs dans un nouveau tube contenant 5ml du tampon TE préchauffée à 50°C et incuber au bain marie à 50°C pendant 15 min. Répéter cette étape 4 fois.
- Couper avec la lame de bistouri 1/4 d'un bloc et le mettre dans 100 µl de tampon de SmaI (1×). Incuber pendant 15 min à 25°C dans le bain marie
- Remplacer la solution tampon par 120µl de tampon contenant 50U d'enzyme SmaI et incuber à 25°C au bain marie pendant 24h
- Mettre les blocs digérés dans 500µl de TBE (0.5×) pendant 10 min
- Préparer le gel d'agarose 1% (dissou dans le TBE 0.5×) pour la migration
- Insérer les blocs dans les puits de gel d'agarose avec le marqueur de poids moléculaire et les remplir avec l'agarose low melting point (2% dissoudans du TBE 0.5×)
- Placer le gel dans la cuve électrophorèse contenant 3l de TBE 0.5× et démarrer l'électrophorèse dans les conditions suivantes :

**Bloc 1**

- \*Initial switch time: 1s
- \*Final switch time: 30s
- \*Temps de migration: 17h
- \*Volts/cm: 6V/cm<sup>2</sup>
- \*Angle: 120°
- \*Température: 14°C

**Bloc 2**

- \*Initial switch time: 5s
- \*Final switch time: 9s
- \*Temps de migration: 6h
- \*Volts/cm: 6V/cm<sup>2</sup>
- \*Angle: 120°
- \*Température: 14°C

- Sortir le gel et le déposer dans le bac à coloration contenant 300ml d'eau stérile plus 5µg/ml de bromure d'éthidium. Laisser à l'abri de la lumière pendant 30 min
- Les photos des gels ont été prises sous UV par l'appareil Olympus digitale (Olympus, Münster, Germany).

**7.3 Comparaison des profils électrophorétiques et interprétation**

Les relations entre isolats reposent principalement sur la comparaison des profils obtenus. Cette comparaison utilise très fréquemment le coefficient de similitude de Dice qui analyse les profils deux à deux et qui correspond au rapport du nombre de fragments communs multiplié par deux sur le nombre total de fragments observés dans les deux profils. Donc le pourcentage de similitude entre deux profils électrophorétiques de deux souches peut être calculé par le coefficient de Dice, selon la formule :

$$SD = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Où (a) est le nombre de fragments communs aux deux souches, (b) et (c) le nombre de fragments différents pour chacune des souches. Dans cette formule, l'importance attribuée aux fragments différents dépend du nombre total de fragment obtenus par le marqueur étudié. Il est en général considéré qu'une différence d'une trois bandes dans des profils de macrorestriction de l'ADN correspond, au moins, à un événement génétique nécessaire

pour produire cette variation et qu'une différence de quatre à six bandes correspond à au moins deux événements génétique.

Après la comparaison deux à deux de tous les profils, une matrice des similitudes peut être alors obtenue permettant de construire une représentation graphique des distances entre les souches sous forme de dendrogramme.

Les dendrogrammes sont construits suivant la méthode Unweighted Pair Group Method using mathematical averages (UPGMA) utilisant une moyenne arithmétique (Biochemistry and Biotechnology Department, Rovira i Virgili University, Tarragona, Spain) (<http://genomes.urv.cat/UPGMA/index.php>). Les isolats qui ont une forte similarité (>80%) peuvent être considérés comme dérivant de la même souche mère.

## 3ème partie : Résultats

### I. Interprétation de l'échantillonnage

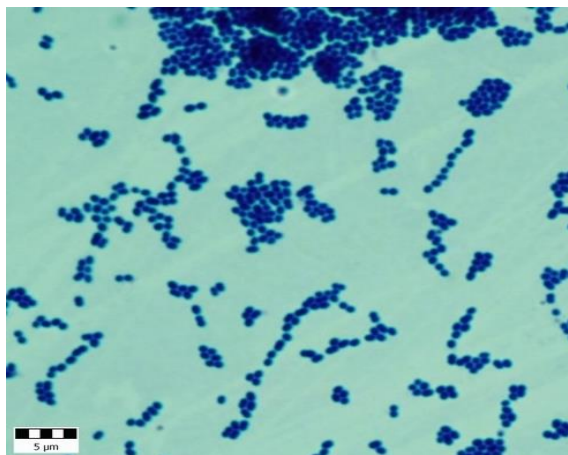
#### I.1- Fréquence des entérocoques isolés des selles humaines

La recherche des entérocoques dans les différents prélèvements a été effectuée par l'ensemencement des échantillons dans un milieu BEA. Parmi les 113 sujets qui ont fait l'objet de notre étude, 80 (70,8%) individus ont exprimés une culture positive (bactéries esculinase +) sur BEA et 33 (29,2%) personnes n'était pas colonisées par les entérocoques (Figure 25).



**Figure 25:** Aspect des colonies d'entérocoques sur milieu sélectif bile esculine azide.

L'aspect microscopique des bactéries après la coloration de Gram a révélé des formes cellulaires en cocci, disposées en paire (diplocoques) ou en courtes chainettes de couleur violette. Ce qui correspond à l'aspect des bactéries à Gram positif (Figure 26).

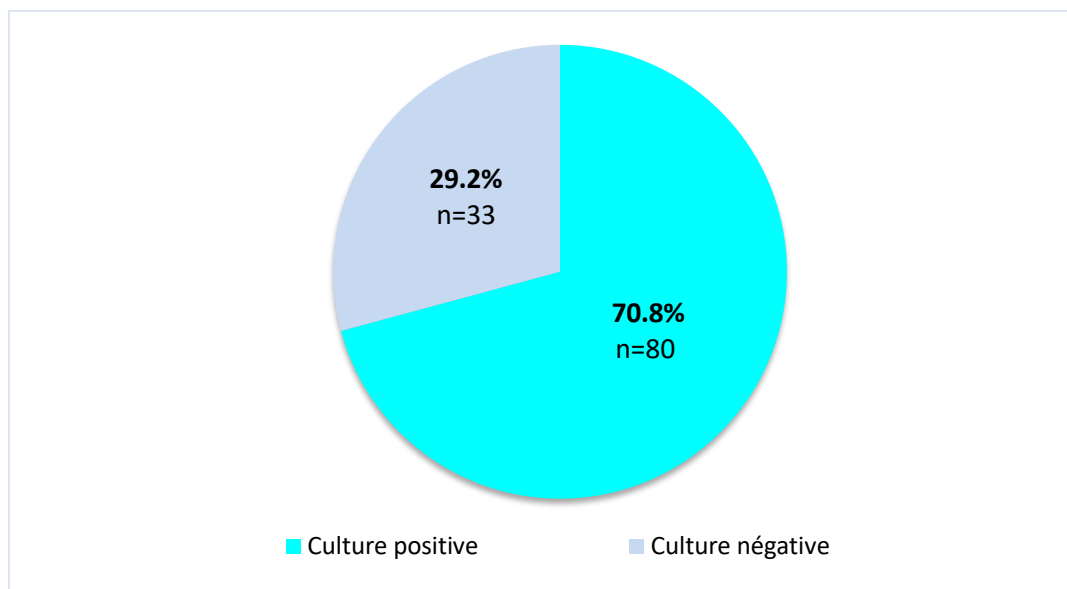


**Figure 26:** Vue microscopique d'entérocoques

Le résultat du test de catalase s'est révélé négatif pour toutes les souches (Pas des dégagements gazeux), ce qui laisse suggérer que ces bactéries sont soit des entérocoques soit des streptocoques.

Les entérocoques et les streptocoques partagent les mêmes critères macroscopiques et microscopiques. Afin de différencier entre ces deux genres, deux tests ont été réalisés, le test de la résistance à la chaleur et le test de la croissance sur le bouillon hypersalé. Dans notre étude, les résultats de ces deux tests montrent que toutes les souches résistent à un traitement thermique à 60°C pendant 30 minutes et croissent sur un milieu hypersalé (6,5% de NaCl). Ces résultats suggèrent que toutes les souches isolées appartiennent au genre *Enterococcus*.

Suite à cette caractérisation, nous avons déduit que sur 113 échantillons de selles collectés, un total de 100 souches d'entérocoques a été obtenu auprès de 80 sujets colonisés. Parmi eux 20 personnes sont colonisées par deux souches différentes d'entérocoques (Figure 27). Les colonies isolées ont été utilisées pour l'identification des espèces bactériennes.



**Figure 27:** Répartition des entérocoques dans l'ensemble des prélèvements des selles de la population étudiée.

L'étude bactérienne à été complétée par l'identification biochimique de différentes espèces d'entérocoques à l'aide de l'API - 20 STREP (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) (Figure 28).



**Figure 28:** Résultat de l'identification biochimique des entérocoques par la galerie API-20 Strep.

La caractérisation biochimique des différentes espèces d'entérocoques a permis d'identifier 45 souches d'*E. faecalis* (45%) et 55 souches d'*E. faecium* (55%) avec un bon niveau de qualité (moyenne =98,7%).

## 1.2 Répartition des prélèvements selon le sexe

Durant la période d'étude, 66 (58.40%) sujets de sexe féminin et 47 (41.60%) de sexe masculin ont fourni un échantillon de selle. L'étude statistique a souligné que le sexe de la population étudiée est un facteur significativement associés à la colonisation (tableau 14).

**Tableau 14:** Répartition des souches entérocoques de la population étudiée selon le sexe.

Sexe	Femme	Homme
<b>Colonisés (n=80)</b>	42 (52.5%)	38 (47.5%)
<b>Non colonisés (n=33)</b>	24 (72.72%)	9 (27.27%)
<b>Touts les sujets (n=113)</b>	66 (58.40%)	47 (41.60%)
<b>p-value</b>	NS	0.04

### I.3 Répartition des prélèvements selon l'âge

L'âge de la population d'étude vari entre 1 an et 82 ans (âge moyen : 33.8 ans, âge médiane : 33 ans). Nos résultats montrent que toutes les tranches d'âge sont colonisées. Cependant, nous constatons que la tranche d'âge allant de 13 à 65 ans est la plus touchée avec un taux élevé comparativement aux autres (Tableau 15).

**Tableau 15:** Répartition des souches entérocoques de la population étudiée selon l'âge.

Age	1-12 ans	13-65 ans	>65 ans
<b>Colonisés (n=80)</b>	19 (23,75%)	56 (70%)	5 (6,25%)
<b>Non colonisés (n=33)</b>	8 (24,24%)	22 (66,66%)	3 (9,09%)
<b>Touts les sujets (n=113)</b>	37 (32,74%)	78 (69,02%)	8 (7,08%)
<b>p-value</b>	NS	NS	NS

### I.4 Répartition des souches entérocoques selon le niveau socio-économique des zones résidentielles

L'analyse des données du niveau socio-économiquea révélé que 88,75% des sujets colonisés par les entérocoques habitent dans une zone résidentielle pauvre (tableau 16). Ce taux d'isolement des entérocoques dans ces zones est statistiquement significatif.

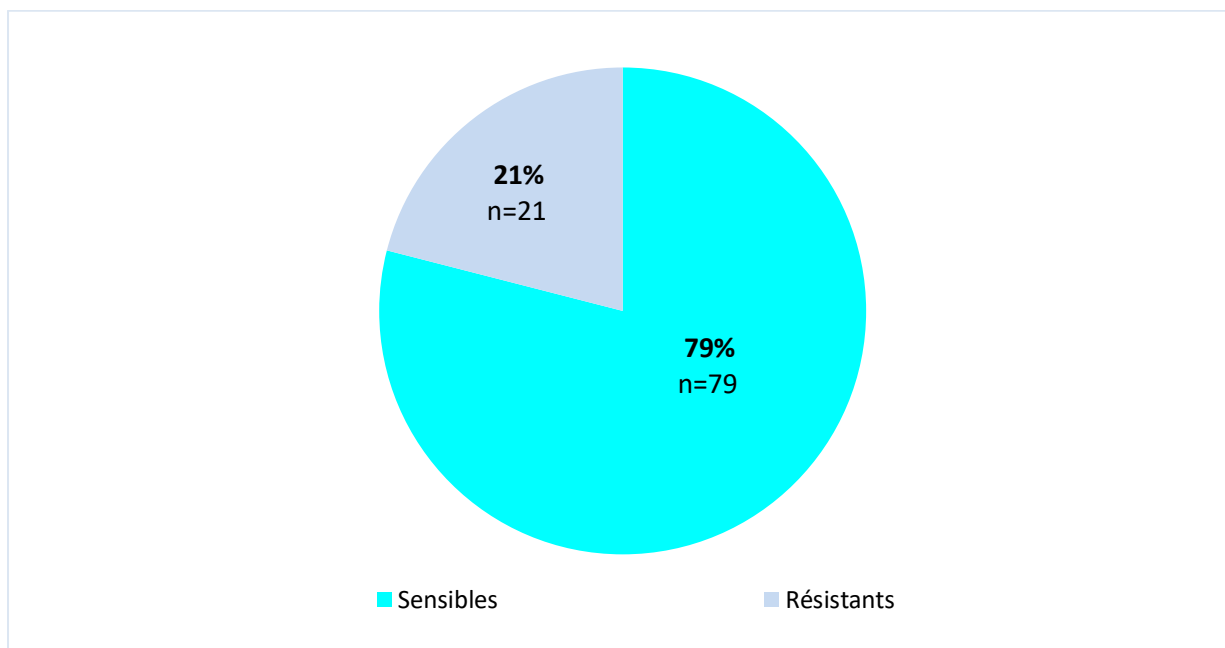
**Tableau 16:** Répartition des souches entérocoques selon le niveau socio-économique des zones résidentielles de la population étudiée.

Niveau socio-économique	Pauvre	Moyen	Riche
<b>Des zones résidentielles</b>			
<b>Colonisés (n=80)</b>	71(88,75 %)	3 (3,75%)	6 (7,5%)
<b>Non colonisés (n=33)</b>	18 (54,54%)	14 (42,42%)	1 (3,03%)
<b>Tous les sujets (n=113)</b>	93 (82.30%)	17 (15.04%)	7 (6.19%)
<b>p-value</b>	<0,0001	<0,0001	NS

## II. Etude phénotypique et génotypique des souches d'entérocoques

### II.1 Fréquence des entérocoques résistants à la vancomycine

La caractérisation phénotypique des 100 souches d'*Enterococcus* selon les résultats de l'antibiogramme a montré que 21 souches sont résistantes à la vancomycine, soit une prévalence de 21% (Figure 29).



**Figure 29:** Fréquence des *Enterococcus* résistants à la vancomycine isolés du portage intestinal dans la ville de Casablanca.

## II.2 Sensibilité des souches d'entérocoques aux antibiotiques

### II.2.1- Profil de résistance des souches d'entérocoques

La sensibilité des souches étudiées ont montré que 88% des isolats étaient résistants à plusieurs antibiotiques (MDR), dont 23% étaient résistants à trois antibiotiques, 37% à quatre antibiotiques, 17% à cinq antibiotiques, 7% à six antibiotiques et 4% à sept antibiotiques testés (tableau 7).

**Tableau 17:** Profils de résistance d'*E. faecium* et d'*E. faecalis* isolés à partir d'échantillons fécales humains en milieu communautaire à Casablanca, Maroc.

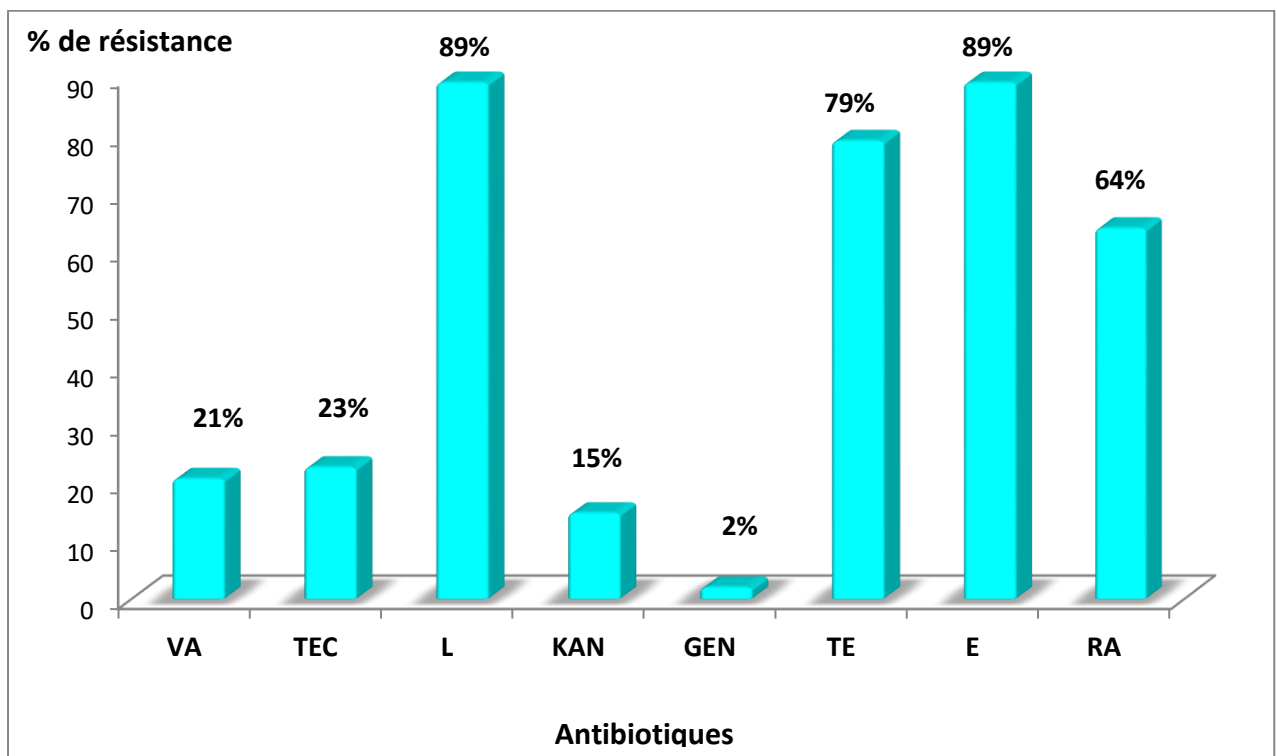
Nombre d'antibiotiques	Profil de résistance	Nombre d' <i>E. faecium</i> multirésistants	Nombre d' <i>E. faecalis</i> multirésistants	Nombre de MDR (%)
<b>R3</b>	L, TE, E	5	5	<b>23%</b>
	L, E, RA	5	1	
	TEC, L, TE	0	1	
	L, TE, RA	0	4	
	KAN, E, RA	1	0	
	TE, E, RA	1	0	
<b>R4</b>	VA, TEC, L, E	1	0	<b>37%</b>
	TE, L, TE, E	0	1	
	L, TE, E, RA	11	15	
	TEC, L, TE, E	2	0	
	VA, TEC, TE, E	1	1	
	L, KAN, TE, E	0	2	
	KAN, TE, E, RA	1	0	
	L, GEN, TE, E	1	0	
	L, KAN, E, RA	1	0	
<b>R5</b>	VA, TEC, L, E, RA	2	0	<b>17%</b>
	VA, TEC, L, TE, E	5	1	
	TEC, L, TE, E, RA	1	1	
	L, KAN, TE, E, RA	1	1	
	L, GEN, TE, E, RA	1	0	
	L, KAN, GEN, E, RA	1	0	
	L, KAN, TE, E, RA	3	0	
<b>R6</b>	VA, TEC, L, TE, E, RA	2	4	<b>7%</b>
	TEC, L, KAN, TE, E, RA	0	1	
<b>R7</b>	VA, TEC, L, KAN, TE, E, RA	0	2	<b>4%</b>
	VA, TEC, L, GEN, TE, E, RA	1	0	
	TEC, L, KAN, GEN, TE, E, RA	1	0	

**R3** résistance à trois antibiotiques, **R4** résistance à quatre antibiotiques, **R5** résistance à cinq antibiotiques, **R6** résistance à six antibiotiques, **R7** résistance à sept antibiotiques, **VA** vancomycine, **TEC** teicoplanine, **L** lincomycine, **KAN** kanamycine, **GEN** gentamicine, **TE** tétracycline, **E** érythromycine, **RA** rifampicine.

## II.2.2 Fréquence de la résistance

La prévalence de la résistance de l'ensemble des souches vis-à-vis des 8 antibiotiques testés est représentée dans la figure 30. Huit antibiotiques appartenant à différentes familles ont été utilisés pour tester la sensibilité des entérocoques. Parmi les souches analysées, aucune n'a été sensible à l'ensemble des antibiotiques testés.

Les souches bactériennes ont montré un haut niveau de résistance à la Lincomycine (L), l'Erythromycine (E), la Tétracycline (TE) et la Rifampicine (RA), avec un pourcentage de résistance de 89% (n=89), 89% (n=89), 79% (n=79), 64% (n=64) respectivement. De même, nous notons que 23 souches (23%) sont résistantes au Teicoplanine et 15 souches (15%) sont résistantes à la kanamycine (K). Deux souches seulement ont montré une résistance à la Gentamicine (GEN), soit une fréquence de 2%.



**Figure30:** Fréquence de résistance des souches d'entérocoques vis-à-vis des antibiotiques.

Les souches d'*E. faecium* ont présenté un taux élevé de la résistantes comparativement à *E. faecalis* pour tous les antibiotiques testés mis a part pour la tétracycline et la lincomycine (Figure 31).

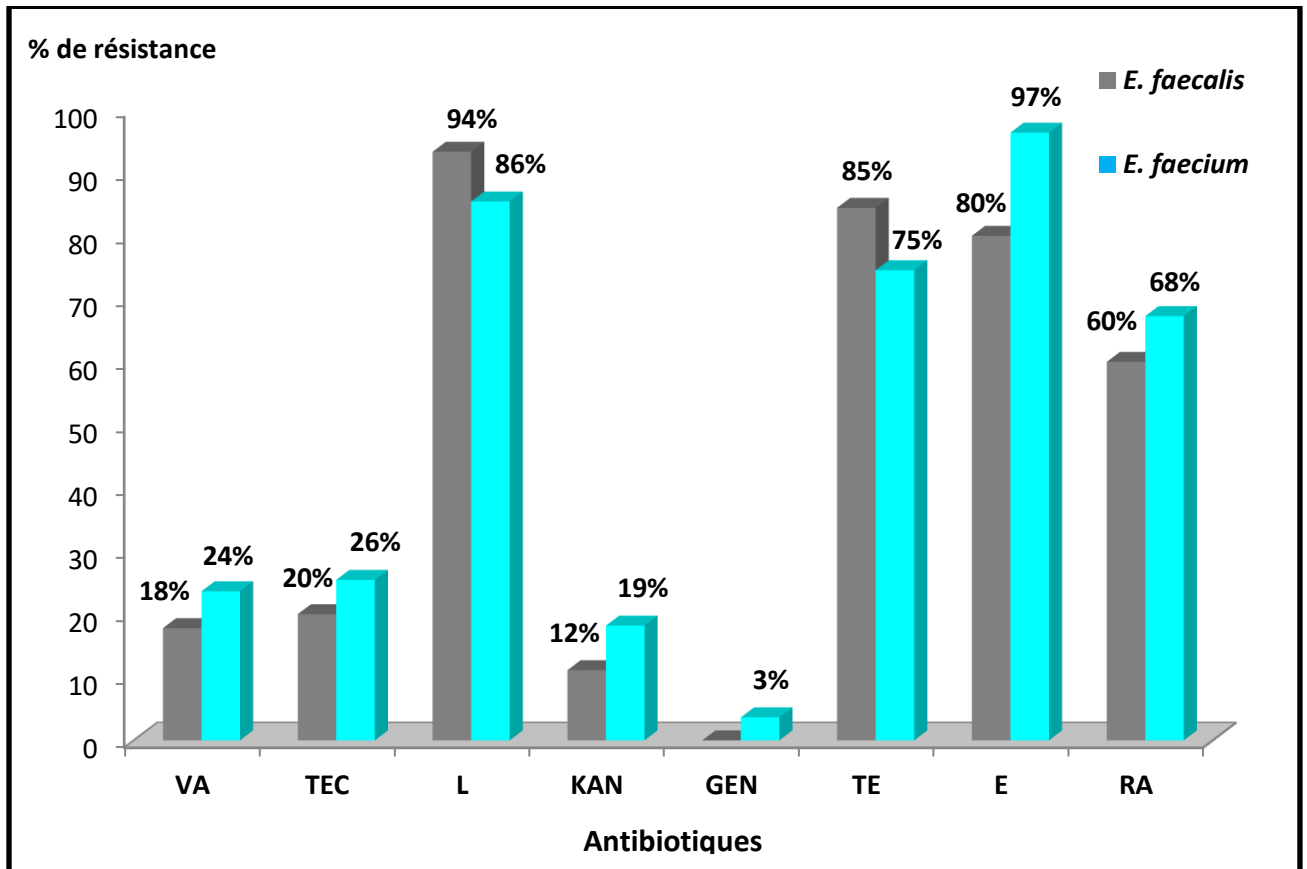


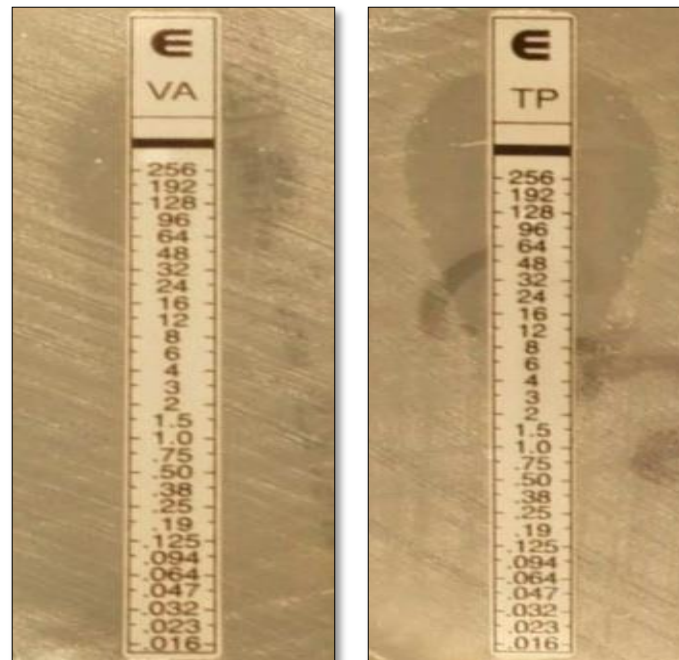
Figure 31: Profil de résistance des souches *E. faecalis* et *E. faecium* aux antibiotiques.

### II.2.3 Les concentrations minimales inhibitrices (CMI)

**Tableau 18:** CMI de la vancomycine et la téicoplanine chez les ERV.

<b>EVR</b>	<b>CMI de la VA (mg/l)</b>	<b>CMI de la TEC (mg/l)</b>	<b>Interprétation</b>
17 I	96	64	R
25 F	64	16	R
13 I	64	48	R
6 I	128	64	R
112 L2	64	16	R
24 I	96	96	R
14 I	64	16	R
50 Z	128	96	R
33 Z TE	64	48	R
50	96	64	R
50 L	96	64	R
44 Z TE	96	64	R
1 I	64	48	R
10 I	96	64	R
31 Z	96	48	R
71	128	192	R
3 I L	96	64	R
28 I	96	64	R
5 I	96	96	R
22 I	64	48	R
35	96	64	R

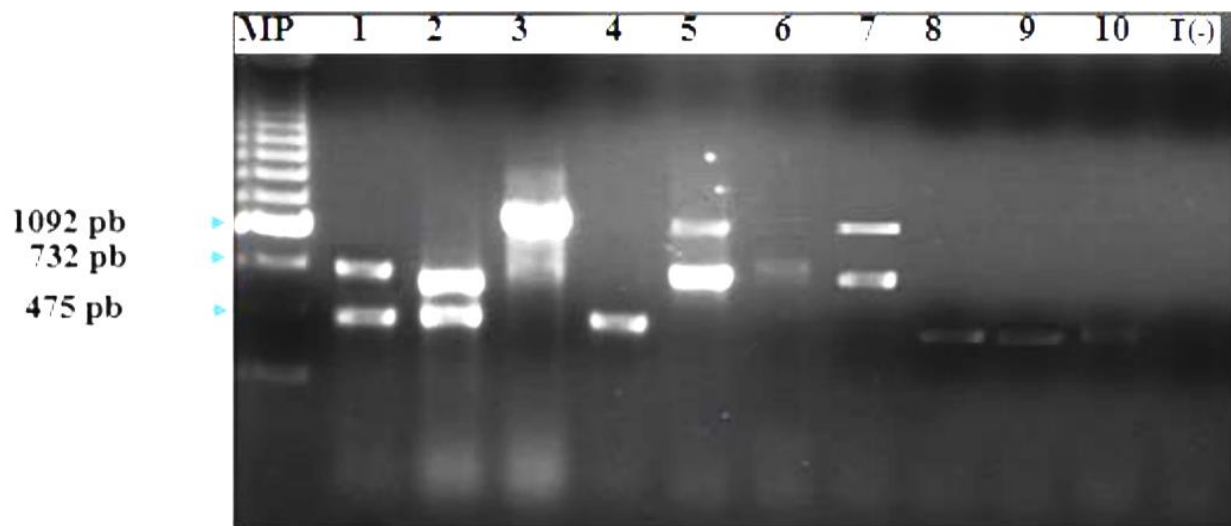
Les concentrations minimales inhibitrices de la vancomycine et de la téicoplanine des souches présentant un diamètre <17mm sont représentées dans le tableau 18. Les résultats des CMI sont toutes supérieur à 8 mg/l pour les deux antibiotiques testés ce qui confirme le caractère résistants aux glycopeptides de ces souches.



**Figure32:** E-test de la vancomycine et de la téicoplanine sur le milieu Mueller-Hinton.

### II.3 Analyse moléculaire des entérocoques résistants à la vancomycine

L'ADN de chaque souche étudiée a été analysé par PCR pour la mise en évidence des gènes de la résistance les plus retrouvés à savoir les gènes *vanA*, *vanB* et *vanC*, codant pour la résistance aux glycopeptides chez les entérocoques, et les gènes *ddl* gènes codant pour des D-alanine : D-alanine ligase, spécifiques des espèces d'entérocoques (Figure 33).



**Figure 33:** Détection par PCR des gènes de résistance *vanA*, *vanB*, *vanC* et des gènes spécifiques de l'espèce *ddl E.faecalis* et *ddl E.faecim*.

**MP :** marqueur de poids moléculaire (100 pb DNA ladder Invitrogen)

**ligne 1 :** Contrôle positif 1, *E. faecalis* BM4316 (*vanA*)

**ligne 2 :** Contrôle positif 2, UAA 432 *E. faecalis* V583 (*vanB*)

**ligne 3 :** Contrôle positif 3, UAA 530 *E. faecium* BM4107 (Sensible)

**ligne 4 :** Contrôle positif 4, UAA 174 *E. faecalis* JH2-2 (Sensible)

**ligne 5 :** Contrôle positif 5, UAA 210 *E. faecium* BM4147 (*vanA*)

**ligne 6 :** Contrôle positif 6, UAA 604 *E. gallinarum* BM4147 (*vanC*)

**ligne 7 :** 6I, *E. faecium* (*vanA*)

**ligne 8 :** 31Z, *E. faecalis*

**ligne 9 :** 34Z, *E. faecalis*

**ligne 10 :** 35Z, *E. faecalis*

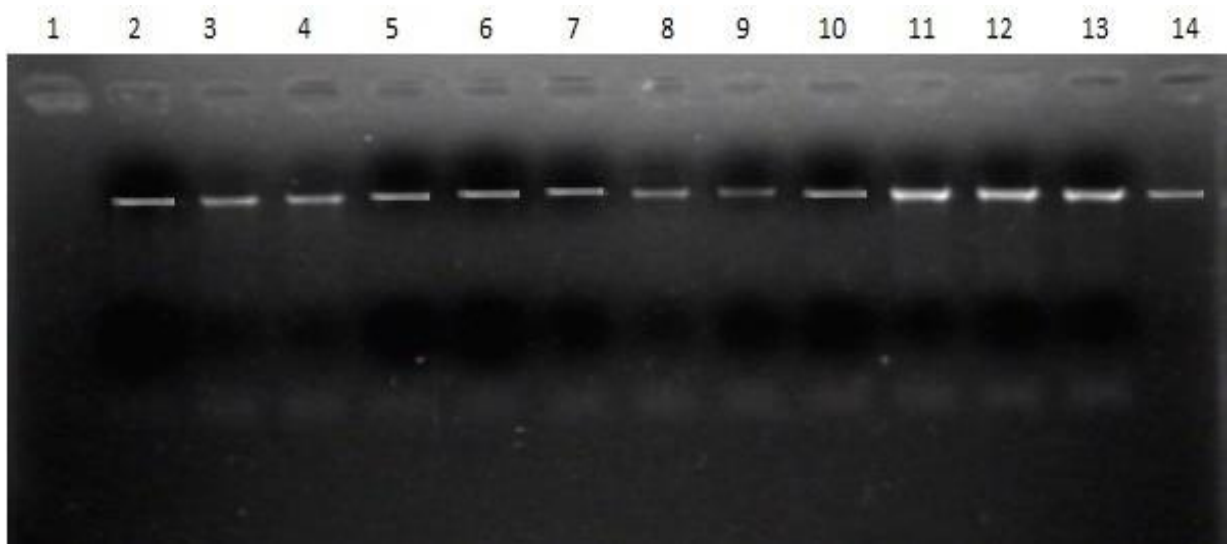
**T(-) :** Témoin négatif

Les résultats de l'étude moléculaire a confirmé ceux de l'identification biochimique des différentes espèces d'entérocoques par la détection du gène *ddl* *E. faecalis* chez les 45 souches identifiées *E. faecalis* et la présence du gène *ddl* *E. faecium* chez les 55 souches identifiées *E. faecium*.

Parmi les 100 isolats d'entérocoques, 21 (21%) étaient résistants à la vancomycine par possession du gène *vanA*, dont 13 étaient *E. faecium* (23,6% de tous les *E. faecium*) et 8 étaient *E. faecalis* (17,8% de *E. faecalis*). Dans l'ensemble, les VRE ont été isolées de 18.6% (21/113) des sujets de l'étude.

## II.4 Amplification et séquençage du gène de l'ARNr 16S des entérocoques

### II.4.1 Amplification du gène de l'ARNr 16S

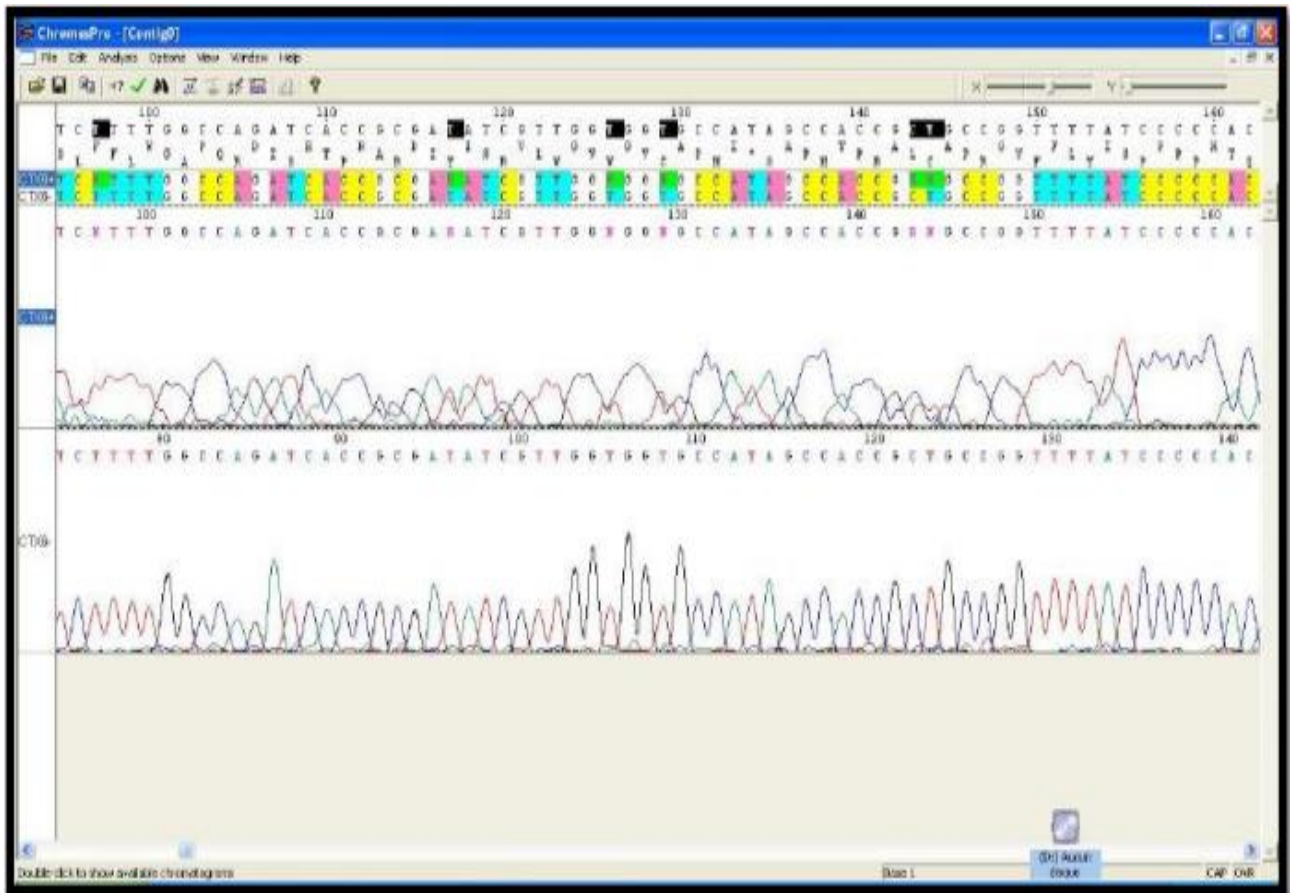


**Figure34:** Séparation par électrophorèse en gel d'agarose des produits de la PCR pour la recherche du gène de l'ARNr 16S.

**Ligne 1 :** Témoin négatif

**lignes 2 à 14 :** ADN des souches 1I, 2I, 5I, 7I, 14I, 17I, 20I, 22I, 30Z, 31Z, 32Z, 34Z et 35Z respectivement.

## II.4.2 Séquençage de l'ARNr 16S



**Figure 35:** Génotypage par séquençage d'une portion du gène de l'ARNr 16S de la souche 5I, en utilisant séparément les amorces sens 008F et anti-sens 1390R par le logiciel Chromas Pro.

## II.5 Arbre phylogénétique

### II.5.1 *E. faecium*

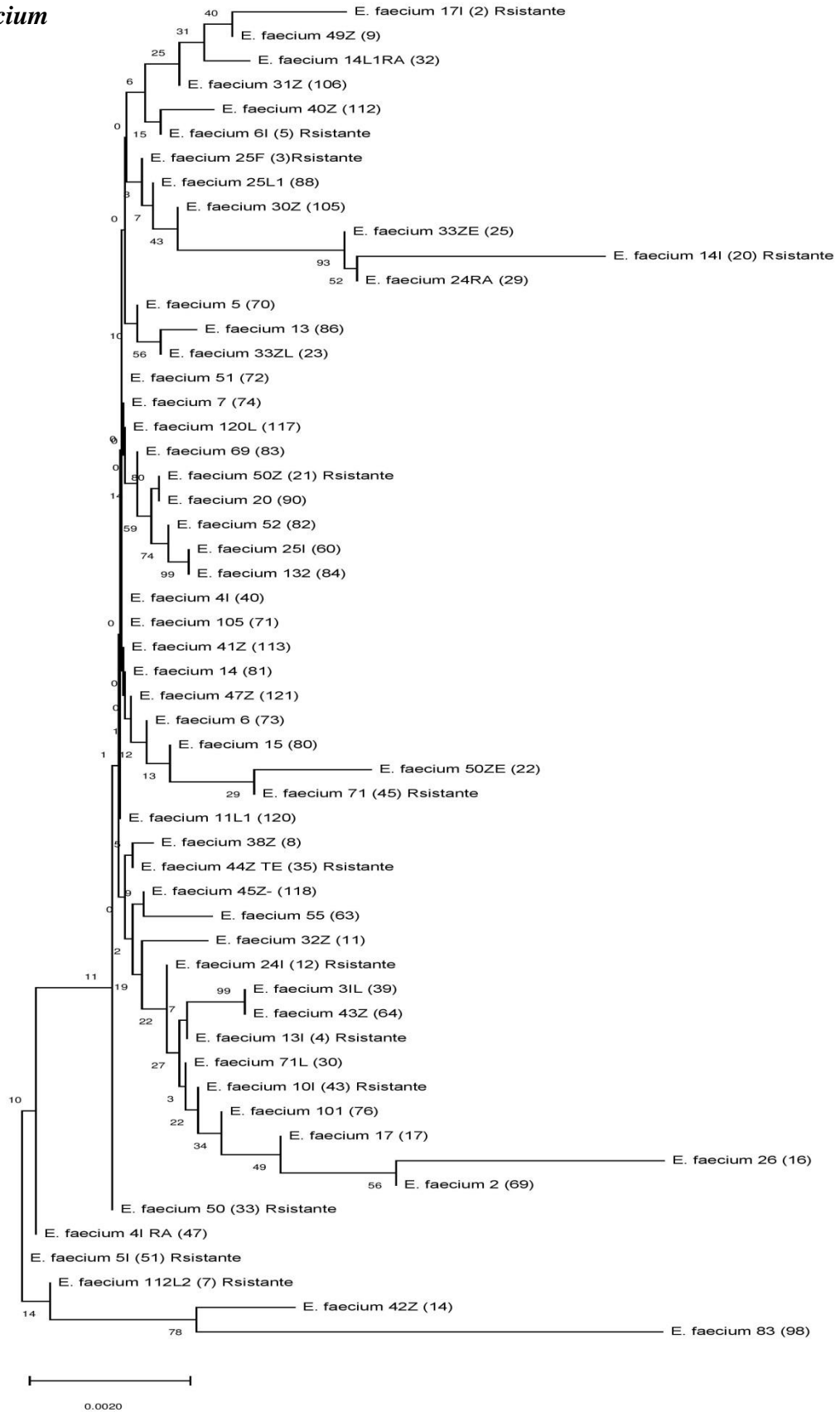


Figure 36: Arbre phylogénétique d'*E. faecium* reposant sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S.

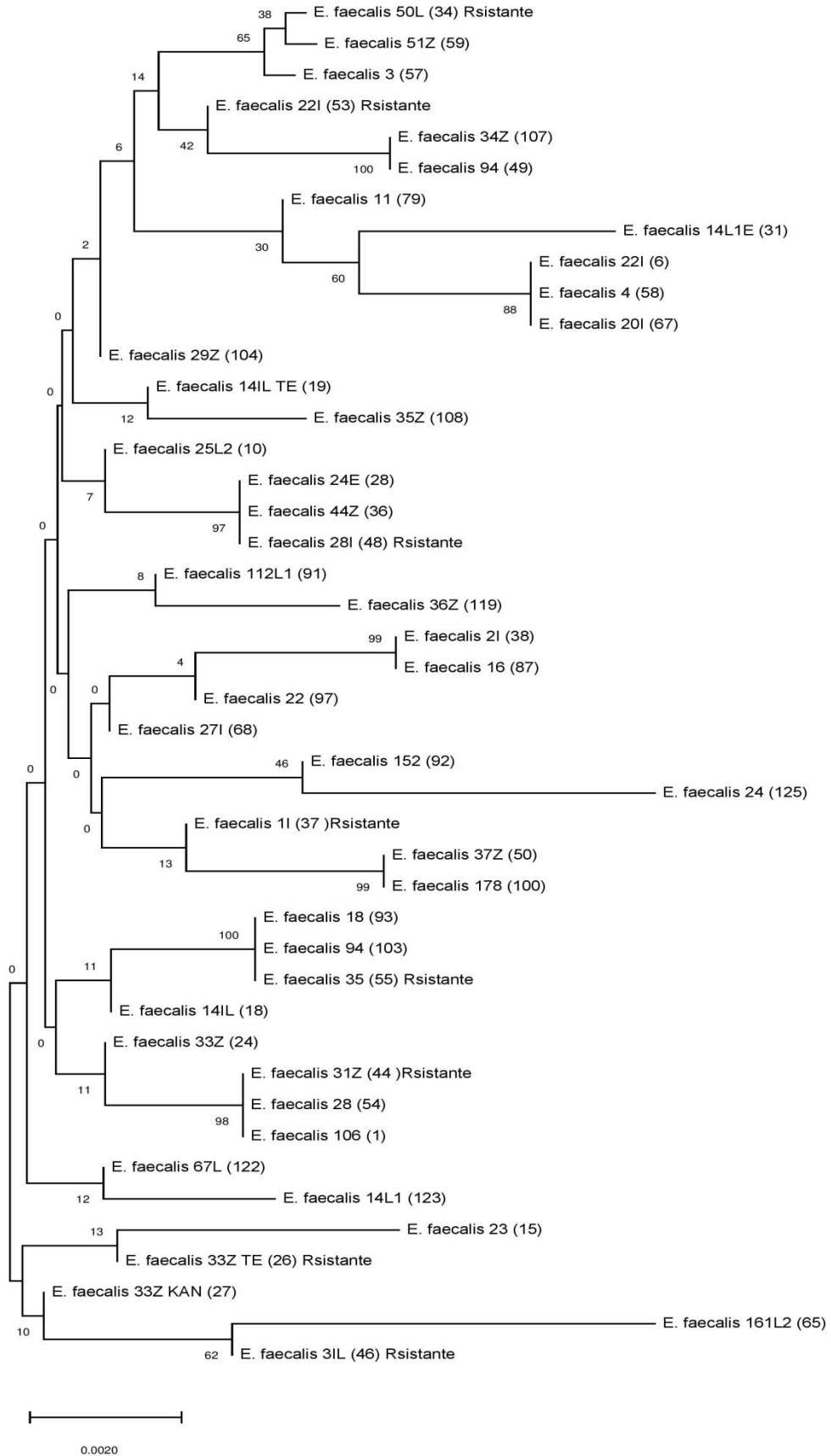
II.5.2 *E. faecalis*

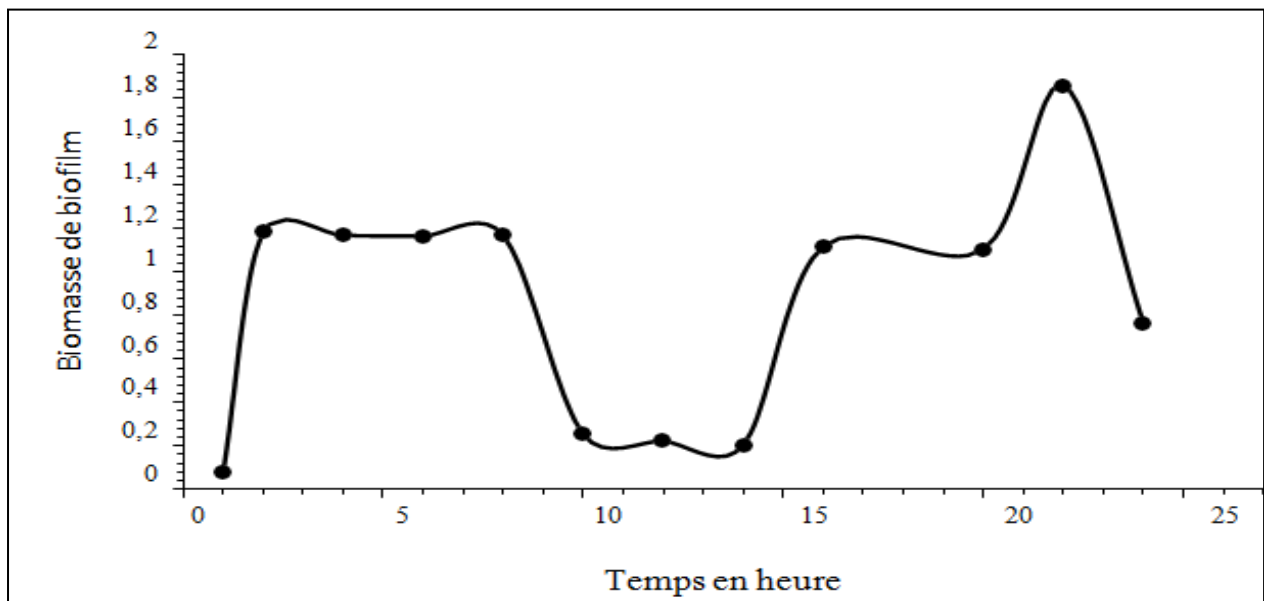
Figure 37: Arbre phylogénétique d'*E. faecalis* reposant sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S.

### III- Cinétique de formation du Biofilm et recherche des gènes de virulences

#### III.1 *E. faecium*

##### III.1.1 Cinétique de formation de biofilm

Nos résultats montrent que toutes les souches d'*E. faecium* ont pu adhérer à la surface de polystyrène et former un biofilm à partir de 2h mais à une densité variable avec un maximum de formation à 24h d'incubation (figure 38).

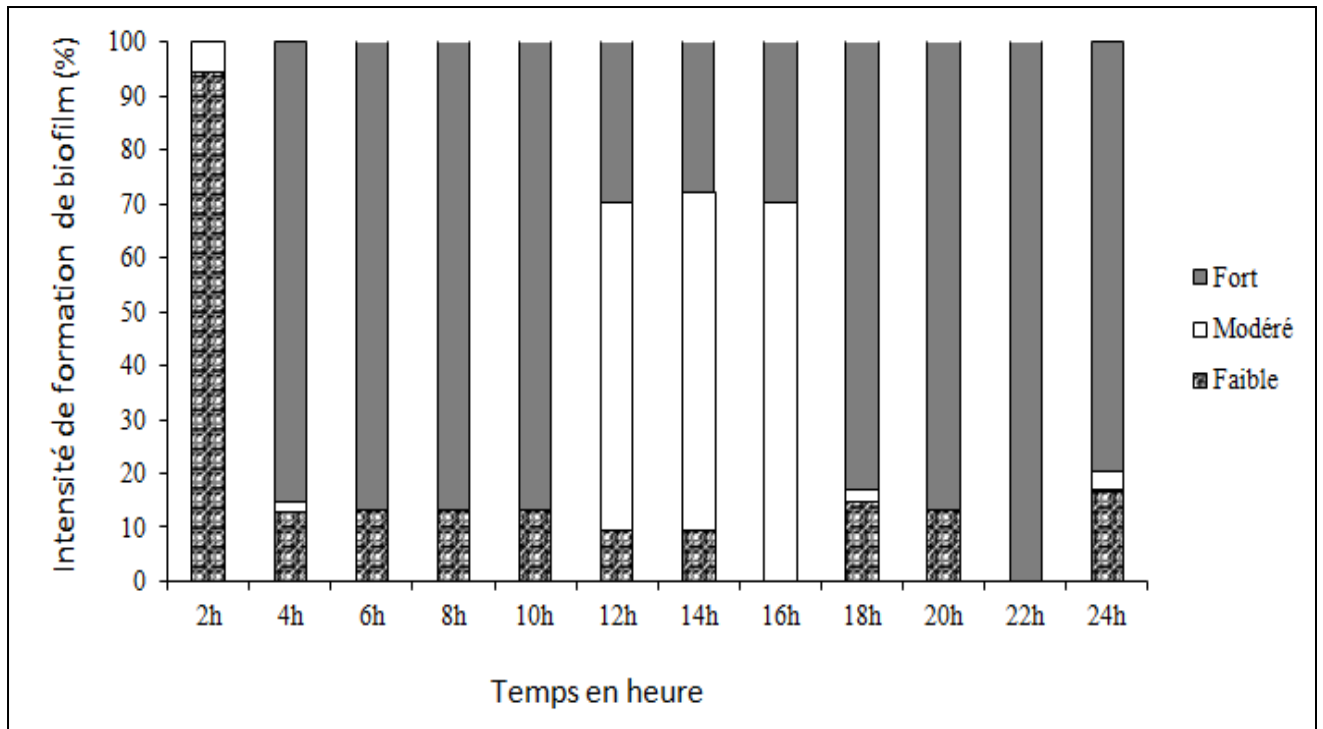


**Figure 38:** Cinétique de formation de biofilm chez *E. faecium* au cours de 24h.

##### III.1.2 Intensité de formation de biofilm

La majorité des souches ont formé un biofilm de faible intensité au cours des deux premières heures. Ensuite nous avons constaté que la biomasse de formation de biofilm s'est accentuée de 4h à 10h d'incubation, puis elle s'est modérée jusqu'à 16h. Les souches ont repris la capacité de la formation intense de biofilm de 18h à 24h.

On note également que toutes les souches ont formé un biofilm intense à 22h d'incubation (figure 39 et tableau 19).



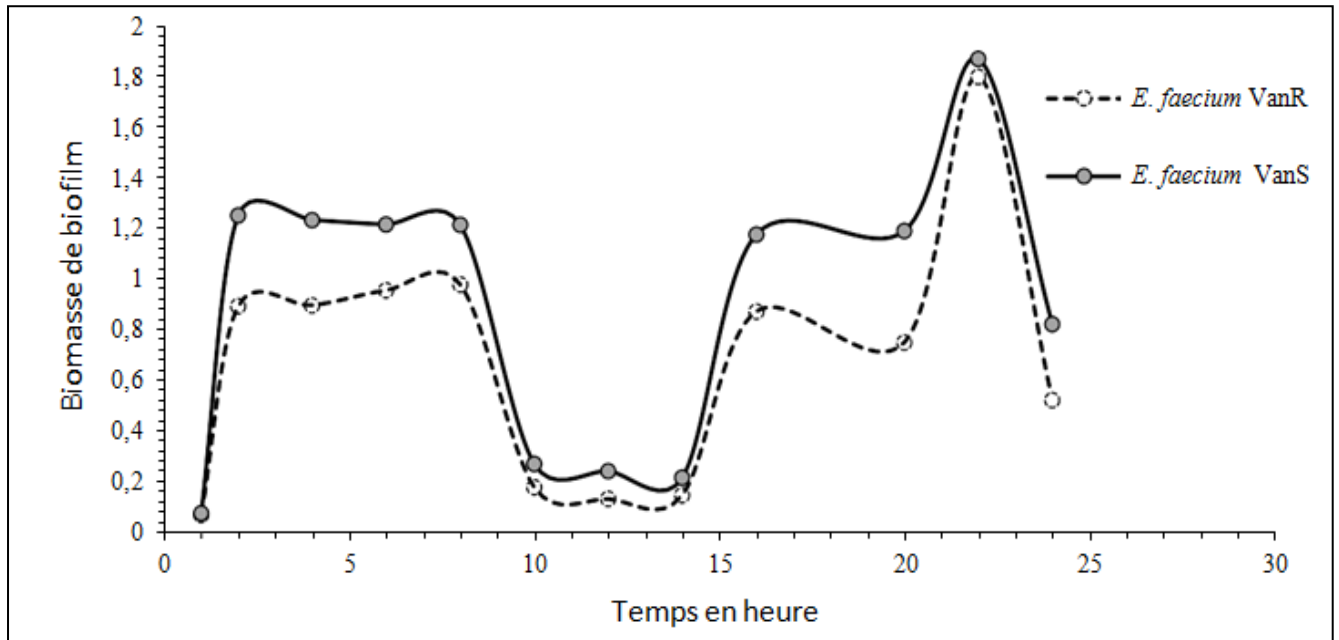
**Figure 39:** Intensité de formation de biofilm en fonction du temps chez *E. faecium*.

**Tableau 19:** Classification de l'intensité de formation de biofilm en fonction du temps d'incubation chez *E. faecium*.

Biofilm	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	18h	20h	22h	24h
<b>Faible</b>	94,44	12,96	12,96	12,96	12,96	9,26	9,26	0,00	14,81	12,96	0,00	16,67
<b>Modéré</b>	5,56	1,85	0,00	0,00	0,00	61,11	62,96	70,37	1,85	0,00	0,00	3,70
<b>Fort</b>	0,00	85,19	88,89	88,89	88,89	31,48	29,63	31,48	85,19	88,89	101,85	79,63

### III.1.3 Comparaison de la formation de biofilm chez les EVR et les EVS

On note que les souches d'*E. faecium* résistantes à la vancomycine ont une capacité supérieure à former le biofilm comparativement aux souches sensibles à la vancomycine durant toutes les heures d'incubations (figure 40).



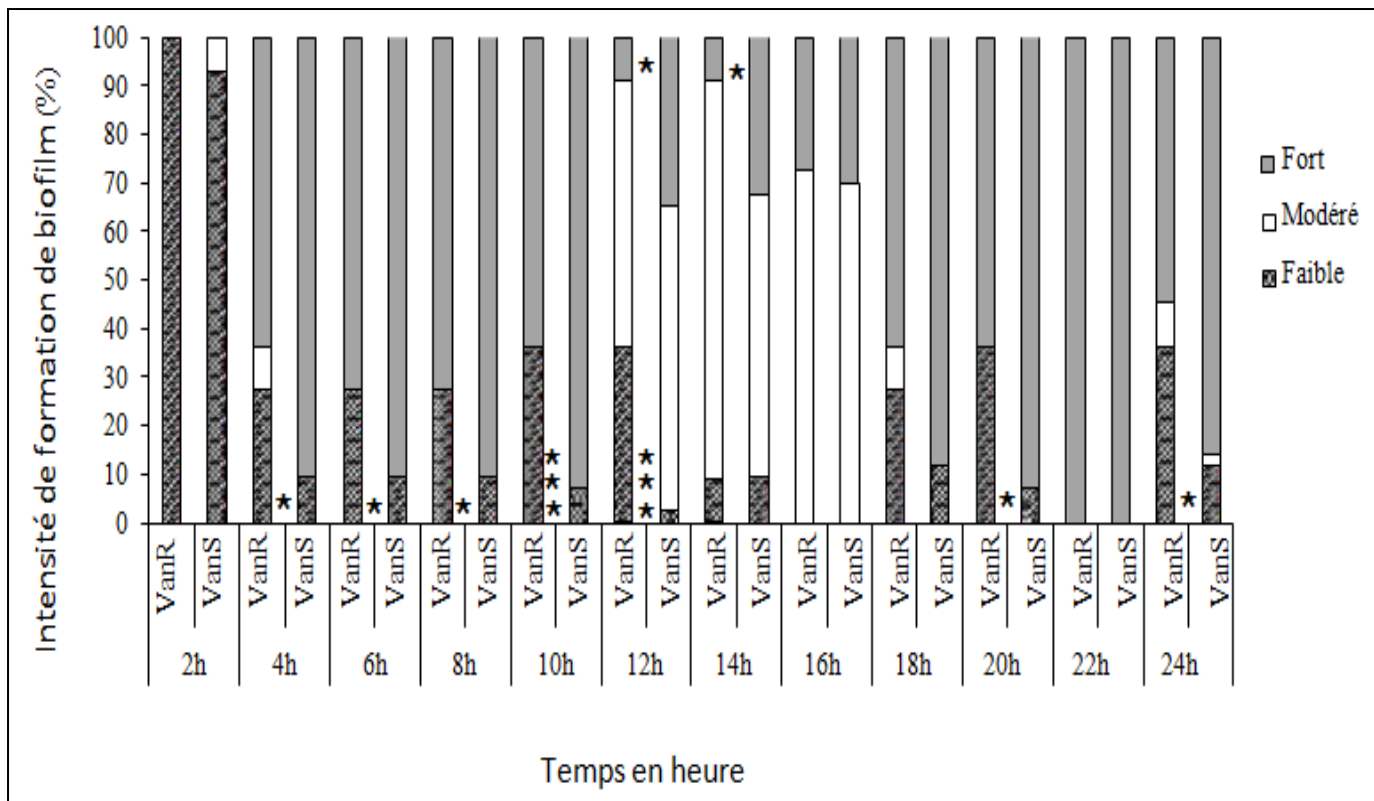
**Figure 40:** Différence de formation de biofilm chez *E. faecium* sensibles et résistants à la vancomycine

\* $p$ -value=0.04 (différence significative).

### III.1.4 Comparaison de l'intensité de biofilm chez les EVR et les EVS

Nos résultats montrent qu'à 22h, la totalité des isolats d'*E. faecium* sensibles et résistants à la vancomycine forment un biofilm intense.

On constate aussi que les souches d'*E. faecium* VanS forment plus de biofilm de forte intensité comparativement aux souches *E. faecium* VanR durant toutes les heures d'incubation appart à 16h où le pourcentage de souches formatrices de biofilm intense est presque semblable (figure 41).



**Figure 41:** Comparaison de l'intensité de formation de biofilm chez les souches d'*E. faecium* sensibles et résistantes à la vancomycine.

\* $p < 0.05$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

### III.1.5 Comparaison du niveau de la résistance chez les isolats d'*E. faecium* sensibles et résistants à la vancomycine

Le profil de résistance montre que 87.27% (n=48) des souches d'*E. faecium* sont multirésistantes. Nous avons trouvé que les souches qui forment un fort biofilm étaient plus résistantes à la ticoplanine, la kanamycine et la tétracycline (tableau 20).

**Tableau 20:** Etude de l'antibiorésistance chez les souches d'*E. faecium* sensibles et résistantes à la vancomycine.

	Faible % (n)			Modéré %(n)			Fort %(n)		
	VanR (4)	VanS (5)	<i>p</i>	VanR (1)	VanS (1)	<i>p</i>	VanR (8)	VanS (36)	<i>p</i>
<b>TEC</b>	50% (2)	0	NS	0	100% (1)	NS	37.5% (3)	22.22% (8)	NS
<b>L</b>	75% (3)	% (5)	NS	100% (1)	100% (1)	NS	75% (6)	83.33% (30)	NS
<b>KAN</b>	0	% (2)	NS	0	100% (1)	NS	12.5% (1)	11.11% (4)	NS
<b>GEN</b>	0	0	-	100% (1)	0	-	0	5.55% (2)	NS
<b>TET</b>	75% (3)	% (5)	NS	100% (1)	100% (1)	NS	75% (6)	66.66% (24)	NS
<b>ERY</b>	100% (4)	% (5)	NS	100% (1)	100% (1)	NS	75% (6)	88.88% (32)	NS
<b>RIF</b>	50% (2)	% (4)	NS	100% (1)	100% (1)	NS	25% (2)	63.88% (23)	NS

**n:** nombre, **TEC:** teicoplanine, **L:** lincomycine, **KAN:** kanamycine, **GEN:** gentamicine, **TET:** tétracycline, **ERY:** érythromycine, **RIF:** rifampicine, **NS:** non significatif, **S:** significatif.

$p < 0.05$  est statistiquement significatif.

### III.1.6 Prévalence des gènes de virulences

La présence des gènes codant pour les facteurs de virulence potentiels a été étudiée par PCR multiplex. La figure 40 montre une électrophorèse des gènes de virulences chez les souches d'*E. faecium*.



**Figure 42:** Gel de migration pour la recherche des gènes de virulences *hyl*, *asa1*, *gelE*, *cylA* et *esp* par PCR chez *E. faecium*.

Ligne 1 : Marqueur de poids moléculaire 100 pb

Ligne 2 : *E. faecalis* MMH594 (contrôle positive pour *asa1*, *gelE*, *cylA* et *esp*)

Ligne 3 : 24I, souche négative pour tous les gènes recherchés

Ligne 4 : *E. faecium* C68 (contrôle positive pour *hyl* et *esp*)

Ligne 5 : 42Z, souche *esp* positive

Ligne 6 : Témoin négatif

Parmi 55 isolats d'*E. faecium*, 25.45% étaient positifs pour le gène *esp*, 21.81% étaient positifs pour le gène *hyl*, et 3.63% possèdent les deux gènes (*esp* et *hyl*) à la fois. Les gènes *cylA*, *gelE* et *asaI* genes n'ont pas été détectés dans nos souches d'*E. faecium* (Table 21).

Nous ne soulignons que même les souches qui n'hébergent pas les gènes de virulences sont capables de produire le biofilm, ce qui nie la probable association entre la présence des gènes de virulence et la formation de biofilm.

**Tableau 21:** Fréquence des gènes de virulence chez *E. faecium*.

Gènes de virulence	Les isolats résistants à la vancomycine n=13	Les isolats sensibles à la vancomycine n=42	p-value	Tout les isolats n=55
<i>esp</i>	38.46% (5)	21.42% (9)	NS	25.45% (14)
<i>hyl</i>	15.38% (2)	23.80% (10)	NS	21.81 % (12)
<i>esp, hyl</i>	0	4.76% (2)	NS	3.63% (2)
Négatif	30.76% (4)	40.74% (17)	NS	38.18% (21)
Touts	100% (13)	100% (42)	-	100% (55)

### III.1.7 Etude de la virulence et la résistance aux antibiotiques des souches d'*E. faecium* résistantes à la vancomycine

Le profil de résistance montre que toutes les souches d'*E. faecium* VanR sont multirésistantes et sept de ces souches (53.84%) hébergent un facteur de virulence (tableau 22)

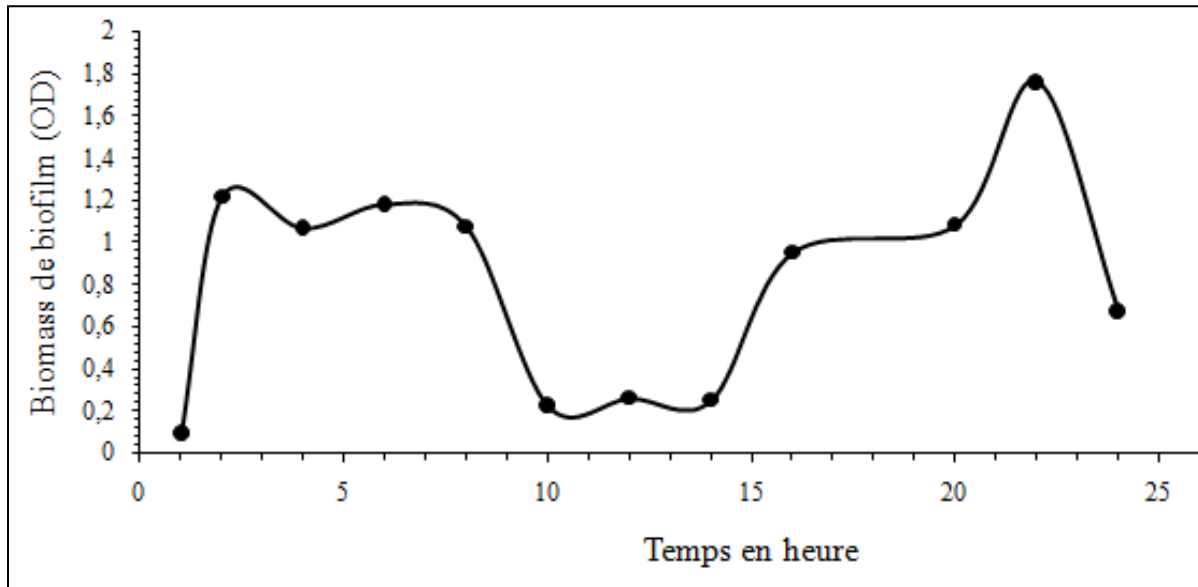
**Tableau 22:** profils de résistance et gènes de virulence d'*E. faecium* résistants à la vancomycine.

<b>EVR</b>	<b>Profil de résistance</b>	<b>Gènes de Virulence</b>
<b>17I</b>	VAN-TEC-L-ERY-RIF	-
<b>25F</b>	VAN-TEC-L-TET-ERY	<i>esp</i>
<b>13I</b>	VAN-TEC-L-TET-ERY-RIF	<i>esp</i>
<b>6I</b>	VAN-L-ERY	<i>hyl</i>
<b>112L2</b>	VAN-TEC-L-TET-ERY	<i>esp</i>
<b>24I</b>	VAN-TEC-L-TET-ERY	-
<b>14I</b>	VAN-TEC-L-TET-ERY	-
<b>50Z</b>	VAN-TEC-L-TET-ERY	-
<b>50</b>	VAN-TEC-L-ERY-RIF	-
<b>44 Z TE</b>	VAN-TEC-L-TET-ERY-RIF	-
<b>10I</b>	VAN-TEC-TET-ERY	<i>hyl</i>
<b>71</b>	VAN-TEC-L-GEN-TET-ERY-RIF	<i>esp</i>
<b>5I</b>	VAN-TEC-L-TET-ERY-RIF	<i>esp</i>

### III.2 *E. faecalis*

#### III.2.1 Cinétique de formation de biofilm

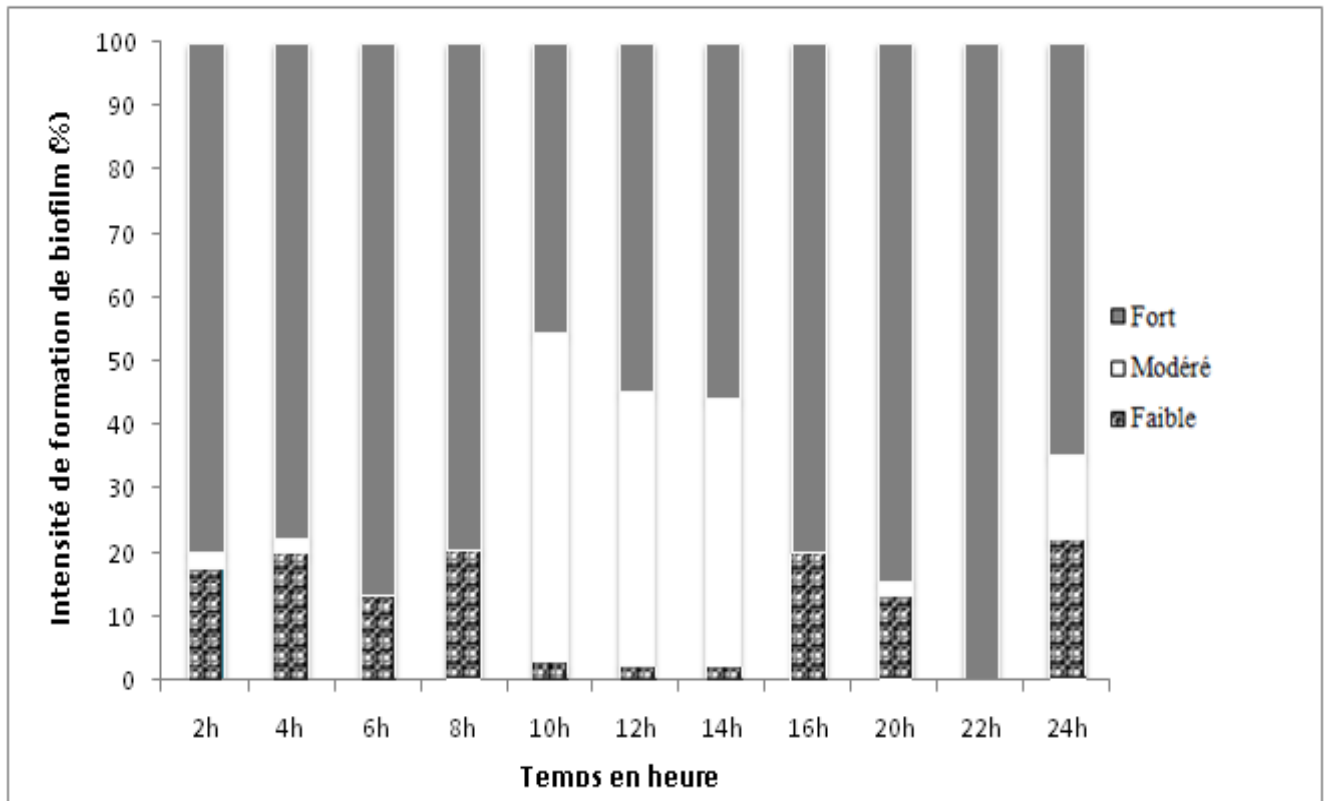
Tous les isolats d'*E. faecalis* ont une forte capacité de former un biofilm à partir de 2h avec une densité variable qui diminue de 12h à 14h et qui atteint le maximum à 24h d'incubation (figure 43).



**Figure 43:** Cinétique de formation de biofilm chez *E. faecalis* au cours de 24h.

#### III.2.2 Intensité de formation de biofilm

Au cours des huit premières heures d'incubation, la majorité des souches d'*E. faecalis* ont formé un biofilm de forte intensité (plus de 79,55%). Ce pourcentage a diminué durant les trois heures d'incubation qui suivent. Nous avons constaté que la biomasse de formation de biofilm s'est accentuée à 16h, avec un maximum (100%) de souches formatrice de biofilm intense à 22h d'incubation (figure 44 et tableau 23).



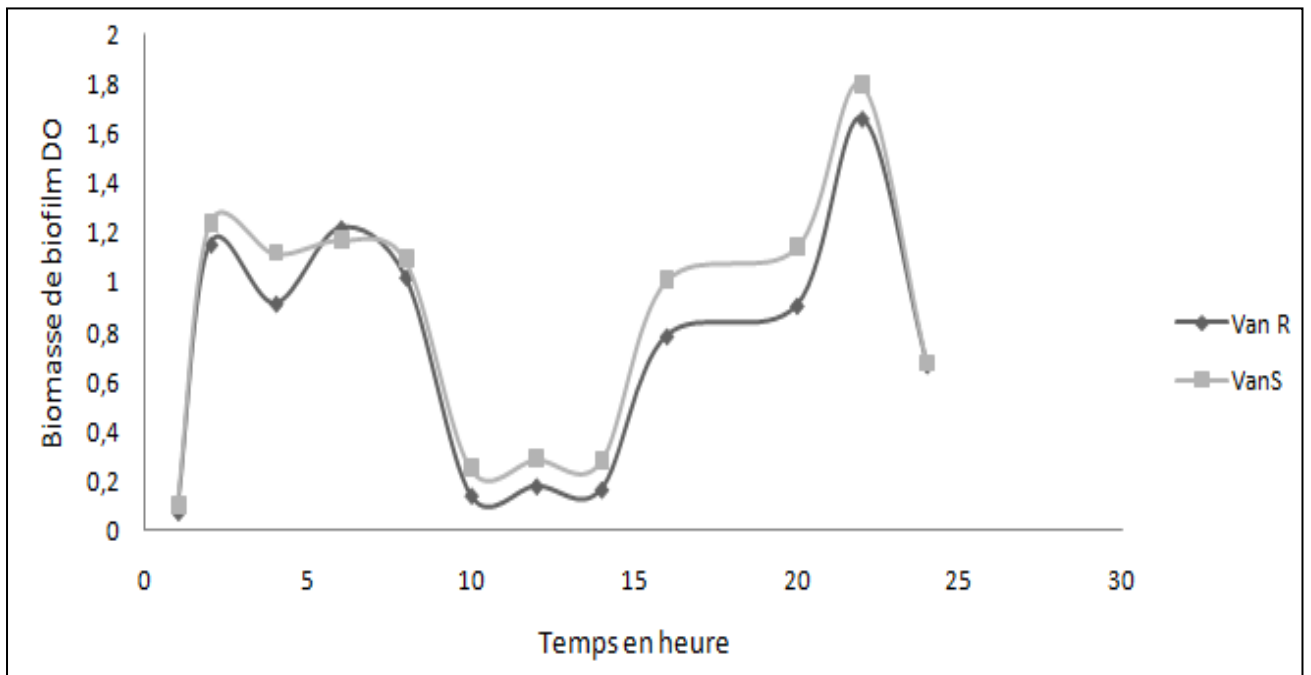
**Figure 44:** Intensité de formation de biofilm en fonction de temps chez *E. faecalis*.

**Tableau 23:** Classification de l'intensité de formation de biofilm en fonction du temps d'incubation chez *E. faecalis*.

Biofilm	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	20h	22h	24h
<b>Faible</b>	17,78	20,00	13,33	20,45	2,27	2,27	2,22	20,00	13,33	0,00	22,22
<b>Modéré</b>	2,22	2,22	0,00	0,00	52,27	43,18	42,22	0,00	2,22	0,00	13,33
<b>Fort</b>	80,00	77,78	86,67	79,55	45,45	54,55	55,56	80,00	84,44	100	64,44

### III.2.3 Comparaison de la formation de biofilm chez les EVR et les EVS

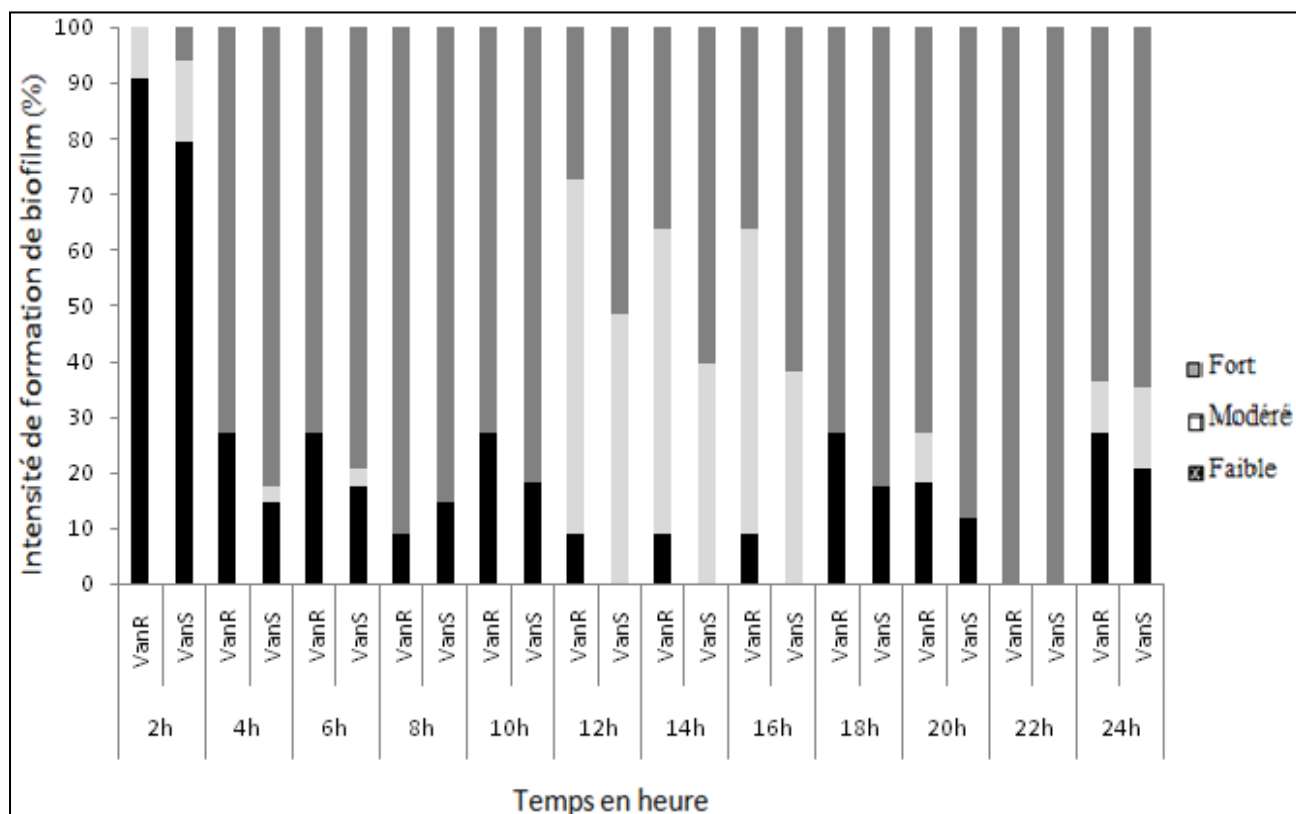
Les résultats de la comparaison de la formation de biofilm chez *E. faecalis* sont représentés dans la figure 45. On a trouvé que les souches d'*E. faecalis* sensibles à la vancomycine ont formé plus de biofilm comparativement aux souches résistantes à la vancomycine durant toutes les heures d'incubations appart à 6h et à 24h.



**Figure 45:** Différence de formation de biofilm chez *E. faecalis* sensibles et résistants à la vancomycine.

### III.2.4 Comparaison de l'intensité de biofilm chez les EVR et les EVS

Nous avons trouvé que les souches d'*E. faecalis* VanS forment plus de biofilm de forte intensité comparativement aux souches *E. faecalis* VanR durant toutes les heures d'incubation appart à 22h où la totalité des isolats d'*E. faecalis* sensibles et résistants à la vancomycine forment un biofilm intense (figure 46).



**Figure 46:** Comparaison de l'intensité de formation de biofilm chez les souches d'*E. faecalis* sensibles et résistantes à la vancomycine.

### III.2.5 Comparaison de la résistance aux antibiotiques chez les isolats d'*E. faecalis* sensibles et résistants à la vancomycine

Les souches d'*E. faecalis* VanS qui forment un fort biofilm étaient plus résistantes à la lincomycine, la kanamycine, la gentamicine, la tétracycline, l'érythromycine et la rifampicine. Cependant, les isolats d'*E. faecalis* VanR ont montré une résistance élevée à la teicoplanine (tableau 24).

**Tableau 24:** Etude de l'antibiorésistance chez les souches d'*E. faecalis* sensibles et résistantes à la vancomycine.

	Faible % (n)			Modéré %(n)			Fort %(n)		
	VanR (2)	VanS (8)	p	VanR (1)	VanS (5)	p	VanR (5)	VanS (24)	p
<b>TEC</b>	100% (2)	0	S	0	20% (1)	NS	40% (2)	16.66% (4)	NS
<b>L</b>	100% (2)	87.50% (7)	NS	100% (1)	80% (4)	NS	80% (4)	95.83% (23)	NS
<b>KAN</b>	50% (1)	12.50% (1)	NS	0	20% (1)	NS	0	12.50% (3)	NS
<b>GEN</b>	0	0	-	0	0	-	0	4.16% (1)	NS
<b>TET</b>	100% (2)	75%(6)	NS	100% (1)	100% (5)	NS	60% (3)	87.5 % (21)	NS
<b>ERY</b>	100% (2)	62.50%(5)	NS	100% (1)	80% (4)	NS	80% (4)	91.66% (22)	NS
<b>RIF</b>	100% (2)	62.50%(5)	NS	100% (1)	100% (5)	NS	40% (2)	58.33% (14)	NS

**n:** nombre, **TEC:** teicoplanine, **L:** lincomycine, **KAN:** kanamycine, **GEN:** gentamicine, **TET:** tétracycline, **ERY:** érythromycine, **RIF:** rifampicine, **NS:** non significatif, **S:** significatif.

$p < 0.05$  est statistiquement significatif.

### III.2.6 Prévalence des gènes de virulences

La présence des gènes codant pour les facteurs de virulence potentiels a été étudiée par PCR multiplex. La figure 45 montre une électrophorèse des gènes de virulences chez les souches d'*E. faecalis*.



**Figure 47:** Gel de migration pour la recherche des gènes de virulences virulence *hyl*, *asa1*, *gelE*, *cylA* et *esp* par PCR chez *E. faecalis*.

M : Marqueur de poids moléculaire 100 pb

Ligne 1 : *E. faecalis* MMH594 (contrôle positive pour *asa1*, *gelE*, *cylA* et *esp*)

Ligne 2 : *E. faecium* C68 (contrôle positive pour *hyl* et *esp*)

Ligne 3 : 22I, souche *gelE* positive

Ligne 4 : 23, souche *gelE* positive

Ligne 5 : 14IL, souche *gelE* positive

Ligne 6 : 51Z, souche *gelE* positive

Ligne 7 : 71L, souche négative pour tous les gènes recherchés

Ligne 8 : 14L1, souche *gelE* positive

Ligne 9 : 30Z souche négative pour tous les gènes recherchés

Ligne 10 : 34Z souche négative pour tous les gènes recherchés

Ligne 11 : 45Z, souche négative pour tous les gènes recherchés

Ligne 12 : 37Z, souche *asa1* positive

Ligne 13 : 50L, souche *asa1* positive

Ligne 14 : 33Z, souche *cylA* et *esp* positive

C : Contrôle négatif

Nos résultats montrent que 22 souches (48.88%) possèdent un seul gène de virulence. Les gènes *gelE*, *asaI* et *esp* sont présents dans 6 souches (13.33%) et le gène *cylA* est présent dans 4 souches (8.88%). Les isolats qui hébergent deux gènes représentent 11.10% des souches d'*E. faecalis*. Le profil « *esp*, *gelE* » est détecté chez une seule souche (2.22%), et les profils « *esp*, *cylA* » et « *esp*, *hyl* » ont été détectés dans 2 souches (4.44%) (tableau 25).

**Tableau 25:** le pourcentage des gènes de virulences chez *E. faecalis*.

Gènes de virulence	Les isolats résistants à la vancomycine n=8	Les isolats sensibles à la vancomycine n=37	p-value	Tous les isolats n=45
<i>gelE</i>	0	16.21% (6)	NS	13.33% (6)
<i>asaI</i>	25% (2)	10.81% (4)	NS	13.33% (6)
<i>esp</i>	25% (2)	10.81% (4)	NS	13.33% (6)
<i>cylA</i>	12.5% (1)	8.10% (3)	NS	8.88% (4)
<i>esp</i> , <i>gelE</i>	0	2.70% (1)	NS	2.22% (1)
<i>esp</i> , <i>cylA</i>	0	5.40% (2)	NS	4.44% (2)
<i>esp</i> , <i>hyl</i>	12.5% (1)	2.70% (1)	NS	4.44% (2)
Négatif	25% (2)	37.83% (14)	NS	35.56% (16)
Touts	100% (8)	100% (37)	-	100% (45)

### III.2.7 Etude de la virulence et la résistance aux antibiotiques des souches d'*E. faecalis* résistantes à la vancomycine

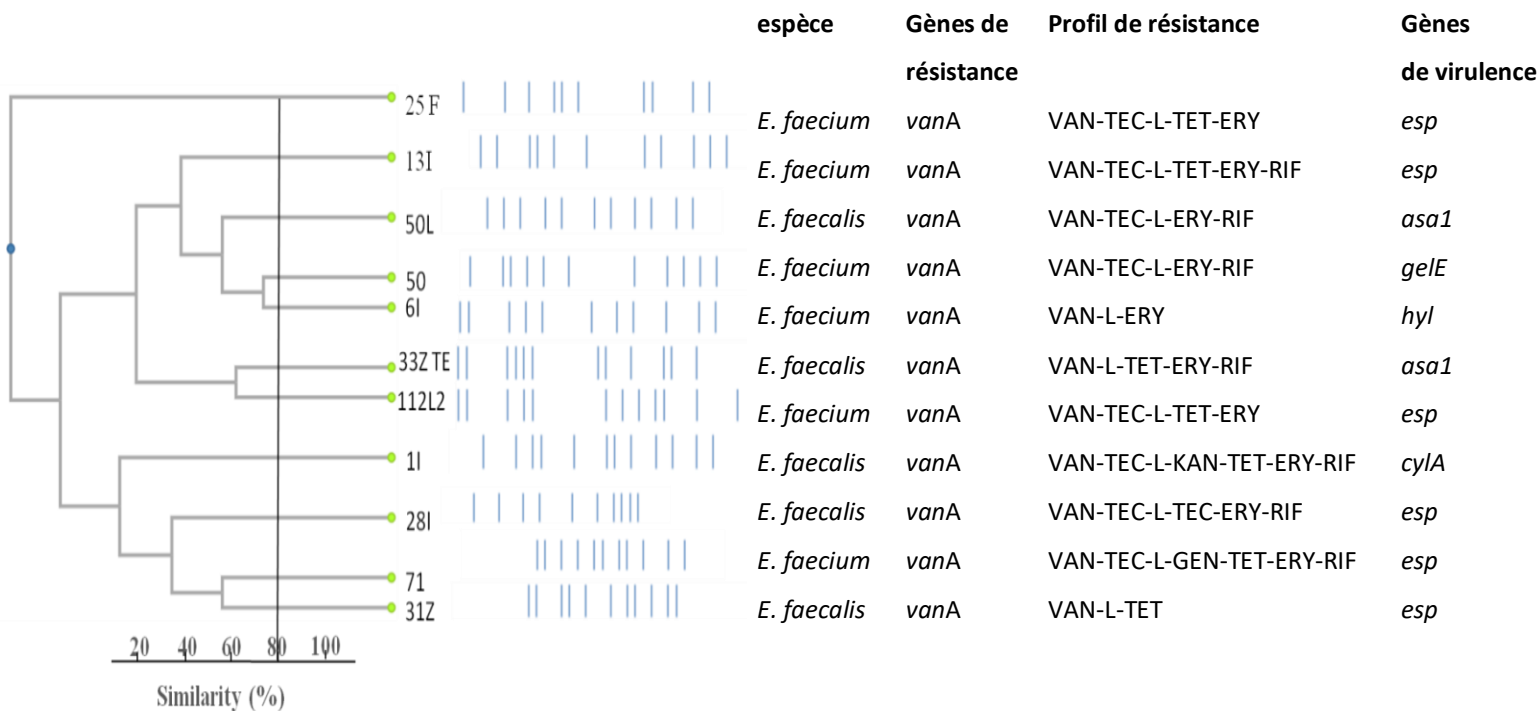
Le profil de résistance montre que toutes les souches d'*E. faecalis* résistantes à la vancomycine sont multirésistantes et la plus part de ces souches (75%) hébergent au moins un facteur de virulence (tableau 26)

**Tableau 26:** profil de résistance et gènes de virulence d'*E. faecalis* résistants à la vancomycine.

<b>EVR</b>	<b>Profilde résistance</b>	<b>Gènes de virulence</b>
22I	VAN-TEC-TET-ERY	-
35	VAN-L-TET-ERY-RIF	-
33Z TE	VAN-L-TET-ERY-RIF	<i>asal</i>
50L	VAN-TEC-L-ERY-RIF	<i>asal</i>
1I	VAN-TEC-L-KAN-TET-ERY-RIF	<i>cylA</i>
31Z	VAN-L-TET	<i>esp</i>
3IL	VAN-TEC-L-KAN-TET-ERY-RIF	<i>hyl, esp</i>
28I	VAN-TEC-L-TEC-ERY-RIF	<i>esp</i>

### IV-Champ pulsé

L'électrophorèse en champ pulsé utilisant une endonucléase de restriction *Sma*I à faible fréquence de coupure permettant ainsi d'avoir des fragments d'ADN. Les similarités entre les profils, basées sur la position des fragments restreints, sont calculées à l'aide du coefficient de Dice avec une tolérance maximale de 1%. Des dendrogrammes sont construits suivant la méthode Unweight Pair Group Method with arithmetic mean. Les isolats qui ont une forte similarité peuvent être considérés comme dérivant de la même souche mère. Les typages moléculaires des 11 souches d'EVR les plus virulentes et résistantes ont montré suite à leur soumission à une électrophorèse en champ pulsé, qu'elles appartenaient à différents pulsotypes. La différence dans le profil basée sur le coefficient de similitude de Dice a montré qu'ils appartiennent aux différents clones avec des degrés de similitude inférieure à 80%.



**Figure 48:** dendrogrammes des souches d'entérocoques résistantes à la vancomycine, réalisés par la méthode Unweight Pair Group Method with arithmetic mean, après électrophorèse en champ pulsé.

## **4ème partie : Discussion**

Les épidémies d'entérocoques résistants aux glycopeptides représentent actuellement un problème de santé publique émergent en Amérique du nord et en Europe. Le risque est de se retrouver rapidement dans une situation épidémique semblable à celle d'autres pays européens géographiquement proche de notre territoire. En outre la présence de ces souches naturellement multirésistantes colonisant de nombreux patients est une difficulté additionnelle pour le contrôle des infections. Pour y faire face la prise en charge de façon appropriée de la survenue d'une colonisation ou d'une infection à ERV et la prévention de leur diffusion épidémique dans le milieu communautaire Marocain, représentent un enjeu capital et correspondent aux objectifs de cette étude.

### **Facteurs de risque associés à la colonisation**

Au cours de notre travail, parmi 150 échantillons de selles reçues de la part des habitants des différents quartiers à Casablanca, seulement 113 ont été inclus dans l'étude. Les prélèvements qui ont été écartés (37 échantillons de selles) appartiennent soit à des professionnels de la santé, à des patients hospitalisés durant les 6 mois qui précèdent l'étude ou à des patients sous traitement d'antibiotiques ou présentant une pathologie quelconque. Ils n'ont donc pas répondu aux critères d'inclusions des souches à étudier. La répartition de la population étudiée sur le territoire de la ville de Casablanca nous a laissé supposer que nos souches d'entérocoques isolées étaient choisies au hasard et nous a donné une idée sur les espèces d'entérocoques qui circulaient dans cette ville de plus de 4 millions d'habitants.

Cette étude rapporte la fréquence de la résistance antibactérienne des entérocoques isolés à partir des échantillons de matières fécales prélevés auprès des Homme dans le milieu communautaire à Casablanca. Les entérocoques ont été trouvés dans 70.8% des échantillons de selle de la population étudiée. Les germes qui ont été écartés de cette étude (29.2%), ont montré une discordance d'identification (par exemple la culture négative sur BEA ou l'absence de noircissement de ce milieu, le résultat négatif du test de croissance sur un bouillon hyper salé ou du test de la résistance à la chaleur). Cette proportion de sujets dans la communauté qui sont colonisées par les entérocoques est approximativement semblable à celle trouvée dans des études précédentes, où 70-80% de la communauté portait ces micro-organismes.

L'identification phénotypique et génotypique a montré que les isolats obtenus dans cette étude étaient *E. faecium* (55%) suivi par *E. faecalis* (45%). Cette répartition des espèces retrouvée est comparable à celle rapportée en Ethiopie où l'*E. faecium* prédominait sur les isolats de l'*E. faecalis* provenant des tractus intestinaux des patients hospitalisés [267].

On souligne que le taux de colonisation enregistré chez les sujets de sexe féminin (52.5%) est supérieur à celui enregistré chez le de sexe masculin (47.5%). Ce résultat est en accord avec une étude faites en Algérie, où les souches d'entérocoque étaient majoritairement isolées chez les femmes avec un pourcentage de 59% [268], et s'oppose a celui rapporté en Ethiopie avec une prévalence de 50.7% pour les hommes [267]. Toutefois, et se basant sur la conclusion d'autres auteurs, Le sexe n'était pas un facteur de risque significatif associé à la colonisation par les entérocoques et spécifiquement par les EVR [269, 270].

Nos résultats montrent également que toutes les tranches d'âge peuvent être colonisées par les entérocoques avec des taux variables. Le nombre maximal de colonisation est retrouvé chez la catégorie d'âge allant de 16 ans à 65ans comprenant 70% des souches isolées et dont 84% sont des sujets âgés de plus de 50 ans. Ceci peut s'expliquer par le terrain fragilisé des personnes âgées qui peuvent présenter des maladies sous-jacentes non diagnostiqué, (diabète, cancer du colon, insuffisance rénale, insuffisance cardiaque...). Par ailleurs, en Iran, une étude qui porte sur les facteurs de risque associée à la colonisation avec les EVR a montrée que la prévalence est plus élevée chez la tranche d'âge allant d'une année à 16 ans [269].

L'analyse des données du niveau socio-économique des zones résidentielles a révélé que 88.75% des sujets colonisés par les entérocoques habitent dans une zone résidentielle pauvre. Ce taux d'isolement des entérocoques dans ces zones est statistiquement significatif. Ceci peut être expliquer par la situation sanitaire globale des habitats dans ses différents composantes, y compris le manque d'assainissement et le nombre élevé des membres de la famille vivant dans une petite superficie, ce qui accroît le risque de la contamination et la colonisation par les entérocoques.

### **Résistance des entérocoques aux antibiotiques**

Le genre *Enterococcus* possèdent de nombreuses résistances naturelles aux antibiotiques comme les aminosides (à bas niveau), les fluoroquinolones, les céphalosporines ou encore la clindamycine chez toutes les espèces sauf *E. faecium*, *E. hirae* et *E. durans*. Ces nombreuses résistances naturelles expliquent en partie l'émergence de certaines espèces comme germes

opportunistes nosocomiaux et communautaires. En plus de ces résistances dites naturelles, de nombreuses résistances acquises aux principales classes d'antibiotiques utilisées dans le traitement des infections à entérocoques que sont les pénicillines, les glycopeptides et les aminosides lorsque ces derniers sont utilisés en association (haut niveau de résistance), ont été rapportées [271].

Les aminosides (AG) se lient à la sous-unité 30S des ribosomes bactériens, induisant une modification conformationnelle au niveau de l'ARN 16S [272]. Cette modification permet la liaison d'ARN de transfert non apparenté, entraînant de nombreuses erreurs de traductions, avec production de protéines anormales [273]. Cela stimule la formation de radicaux libres, conduisant à la mort bactérienne [274]. Les entérocoques peuvent acquérir des gènes de résistance aux AG, ce qui leur confère une résistance de haut niveau, empêchant l'effet synergique avec les antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi. Le plus souvent, la bactérie acquiert une « enzyme modifiant les AG » (AME pour Aminoglycoside Modifying Enzyme), ce qui lui confère une résistance de haut niveau à un ou plusieurs AG. Par exemple, les entérocoques porteurs de l'enzyme bifonctionnelle Aac (6')-Ie-aph (2'')-Ia sont résistants à la plupart des AG disponibles en pratique clinique (gentamicine, tobramycine, amikacine, kanamycine et netilmicine), mais pas à la streptomycine. Plus rarement, les bactéries acquièrent un gène codant pour une ARN 16S méthyltransférase, aboutissant à une modification de l'ARN ribosomal, et à une résistance aux AG. Les deux types d'enzymes de résistance (AME et ARN 16S méthyltransférase) sont fréquemment présentes sur des pathogènes issus d'Asie. Les gènes de résistance aux AG peuvent provenir de plasmides contenant également des séquences de résistance aux fluoroquinolones ou des bêtalactamases à spectre élargi [275].

Nous avons cherché la résistance à la gentamicine car elle est fréquemment utilisée comme indicateur de la résistance aux AG (sauf la streptomycine) [276]. Le taux d'entérocoques présentant une résistance à la gentamicine de haut niveau observée dans cette étude (2%) était inférieur à celui observé en Éthiopie (34.2%) [277], au Mexique (35.4%) [278], en Algérie (54,4%) [268], en Espagne (66%) [279] et en Egypte (56%) [280]. Il ressort de ce résultat qu'il existe une certaine variation de la résistance à la gentamicine d'un pays à l'autre mais cet antibiotique reste un bon choix thérapeutique au Maroc en cas d'infection à *Enterococcus*.

Nous avons déterminé également le taux des isolats d'entérocoques résistants à un autre antimicrobien de la famille des AG qui est la Kanamycine. La résistance à cet antibiotique

retrouvé (15%) représente un taux élevé a celui rapporté dans une étude antérieur (8.5%) [281].

D'autre part, il est connu que les macrolides, les lincosamides et les streptogramines (MLS<sub>B</sub>) appartiennent à un même groupe, du fait d'un mode d'action proche (inhibition de la synthèse protéique par fixation sur l'ARN 23S de la sous-unité 50S du ribosome bactérien) et d'une résistance croisée entre ces antibiotiques. Le phénotype de résistance MLS<sub>B</sub> constitutive (c) défini par une résistance simultanée à l'érythromycine et la lincomycine, a été identifié chez 78%, alors que le phénotype MLS<sub>B</sub> inducible (i) (montrant une résistance à l'érythromycine et une sensibilité à la lincomycine, avec un aplatissement de la zone d'inhibition autours du disque contenant l'antibiotique on inducteur « lincomycine » en regard du disque inducteur « érythromycine », formant une zone en forme de D) n'a pas été détecté.

Cinq souches ont exprimé une résistance aux macrolides par efflux (phénotype MS<sub>b</sub>) ; La résistance isolée de l'érythromycine et l'absence de zone en forme de D entre un disque d'érythromycine et un disque de lincomycine permettent de reconnaître ce phénotype, bien qu'une recherche de la présence du gène *mef* Soit sollicitée pour confirmer ce type de résistance.

Dans notre étude des profils de résistance de nos isolats à partir des antibiogrammes a montré que les souches d'entérocoques isolées présentent un taux de résistance à l'érythromycine de 89%. Ce taux de résistance est supérieur à ceux retrouvés en Algérie [268] et en Egypte [280].

La résistance obtenue pour la lincomycine est de 89%. Contrairement à ce que témoigne une étude menée en France qui montre une résistance plus élevée à cet antibiotique (98%) [282].

Deux autres antibiotiques : tétracycline et rifampicine, assez utilisés au Maroc étaient moins actifs avec des taux de résistance de 79% et 64% respectivement. Ces résultats, en accord avec ceux rapportés par ailleurs [281, 283, 284]. Les taux élevés de la résistance pourront être justifiés par le fait qu'à Casablanca, comme partout au Maroc, ces antibiotiques sont disponibles à des prix accessibles et parfois même sont livrés sans prescription médicale.

L'acquisition de la résistance à la tétracycline peut s'effectuée par différents mécanismes, parmi lesquels le mécanisme d'efflux codés par les gènes *tet K* et *tet L*, protection de la sous unité du ribosome codée par les gènes *tet M*, *tet O* ou *tet S*, ainsi qu'un mécanisme inconnu codé par le gène *tet U* [285], Alors que la résistance à la rifampicine est médiée par des mutation dans le gène *rpo B* qui code pour la sous unité de l'ARN polymérase [286].

À notre connaissance, il s'agit de la première étude qui rapporte la fréquence du portage fécal des VRE dans la communauté marocaine et en Afrique. Cette étude a révélé que le taux d'isolement des VRE dans la ville de Casablanca était de 21%, ce qui est plus élevé de celui rapporté dans les communautés de la République tchèque (0.4%) [287], la Suisse (4.9%) [288], le Mexique (6.7%) [289], l'Allemagne (12%) [290] et la France (12%) [291]. Il a été rapporté que le portage intestinale communautaire des VRE dépassait 21% dans certains pays comme le Taiwan (24.9%) [292] et la Belgique (28%) [293]. La vancomycine est l'antibiotique de dernier recours lors de nombreuses infections causées par des bactéries à Gram positif. La résistance à cet antibiotique est due à l'acquisition de la souche de l'opéron Van, codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse de précurseurs du peptidoglycane de faible affinité pour la vancomycine [294].

La téicoplanine, un autre antimicrobien de la famille des glycopeptides, a été examiné. Nous avons trouvé un taux de résistance de 23% à cet antibiotique. Dans une étude iranienne, Le profil de résistance était différent de celui de notre étude, où les isolats étaient résistants à la téicoplanine atteint 3% [295]. Cela montre que la résistance varie d'une région à l'autre ou d'un établissement à l'autre dans la même région. Par conséquent, il est essentiel de connaître l'antibiogramme des isolats d'entérocoque dans une zone donnée pour élaborer une politique convenable en matière de prescription médicale [296].

Le fait que les VRE soient isolées auprès des sujets de la communauté suggère que de telles souches se sont peut-être déjà propagées dans la communauté générale au Maroc. En outre, le risque de colonisation par les VRE est lié à la propagation de la résistance aux glycopeptides chez des bactéries pathogènes, y compris *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) [297].

En concordance avec des études antérieures, parmi les six gènes de la résistance à la vancomycine qui codent pour la résistance aux glycopeptides, seul le *vanA* a été trouvé dans tous les isolats des VRE [288, 293]. Outre le niveau élevé de résistance aux glycopeptides conféré par le gène *vanA*, les plasmides transférables hébergeant ce gène présentent également d'autres gènes codant pour la résistance à d'autres antibiotiques [298]. La dissémination de ces plasmides entre les espèces d'*Enterococcus* peut conduire à la production d'entérocoques multirésistants.

Les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques ont révélé que la plupart des isolats étaient résistants à trois ou quatre antibiotiques qui sont couramment utilisés dans la thérapie des infections aux entérocoques. La détection des entérocoques multirésistants dans cette

étude, en particulier VRE, est alarmante puisque ces organismes limitent le nombre de choix thérapeutique disponible aux cliniciens. Dans la présente étude, *E. faecium* a montré une incidence plus élevée de la résistance aux antibiotiques testés comparativement à *E. faecalis*. Des résultats similaires sont rapportés dans une étude réalisée en Europe [299].

### **Pouvoir pathogène des entérocoques**

Le rôle pathogène des entérocoques reste controversé dans un certain nombre de pathologies telles que les infections intra-abdominales, les infections urinaires ou les bactériémies, le pouvoir pathogène de ces germes, modeste pris isolément, est très largement majoré par des mécanismes de synergie dans les infections polymicrobiennes [300].

Les infections communautaires à entérocoques sont essentiellement dues à *E. faecalis* (80 à 90% des cas) et à *E. faecium* (5 à 10% des cas), il s'agit principalement d'infections urinaires basses, de pyélonéphrites, de bactériémies et d'endocardites [276]. D'autres infections moins communes sont la méningite, l'ostéomyélite hématogène, l'arthrite septique, les infections néonatales et la pneumonie [276]. Dans certaines infections telles que les endocardites, les infections urinaires et génitales, les méningites et infections néonatales, l'entérocoque est isolé comme seul agent pathogène alors qu'il est presque toujours en association avec d'autres bactéries (anaérobies du genre *Bacteriodes*, entérobactéries) dans les infections intra-abdominales et dans les suppurations des plaies chirurgicales d'origine abdominale [300].

Les infections du tractus urinaire constituent la source d'isolement la plus fréquente des entérocoques, qui sont impliqués dans approximativement 10% de toutes les infections des voies urinaires, leur incidence a augmenté surtout chez les immunodéprimés, les porteurs d'infections urinaires compliquées ou d'uropathies malformatives ou présentant des facteurs de risque comme une instrumentation, une antibiothérapie préalable [301].

La septicémie due aux entérocoques est fréquemment associée aux infections des voies urinaires et, dans de plus rares cas, aux endocardites, le plus souvent une procédure invasive à destination diagnostique ou thérapeutique (le sondage urinaire, ou l'exploration endoscopique par exemple) est l'élément responsable de la septicémie. La septicémie polymicrobienne est très commune et la mortalité est généralement élevée, probablement en raison de pathologies sous-jacentes et des facteurs de complication [301].

Les entérocoques sont considérés depuis leurs premières descriptions comme étant une cause importante d'endocardite, elles viennent au troisième rang de l'ensemble des endocardites (5 à

15 %) et sont principalement dues à *E. faecalis* (80%). Les endocardites à entérocoques sont observées le plus fréquemment chez les hommes âgés, souffrant souvent d'infections des voies urinaires ou venant de subir des tests invasifs impliquant de l'instrumentation, c'est ainsi que l'infection survient sur une valvulopathie préexistante dans 17 % des cas et sur prothèse valvulaire dans 25 % des cas et la porte d'entrée est urinaire dans plus d'un tiers des cas [301]. La survenue fréquente d'une insuffisance cardiaque, aggrave le pronostic des endocardites à entérocoques dont la mortalité est évaluée à 20%. Bien que l'endocardite due aux entérocoques soit une sérieuse infection, celle-ci est moins commune que les bactériémies [302].

Les entérocoques peuvent également être responsables d'infections abdominopelviennes, par exemple en cas de perforation digestive (péritonite appendiculaire, diverticulaire, perforation d'origine traumatique), ou d'infections hépatobiliaires (cholécystite, abcès hépatique). Il s'agit alors le plus souvent d'infections poly microbiennes, dans lesquelles le rôle pathogène de l'entérocoque reste incertain [303].

Les infections néonatales constituent une entité pathologique bien distincte, quand elles surviennent c'est généralement sur terrain fragilisé (prématurité, faible poids de naissance, résorption intestinale). Elles se caractérisent par une survenue précoce d'une bactériémie accompagnée d'une détresse respiratoire et d'une méningite [304].

Devant l'émergence de souches résistantes aux glycopeptides et en particulier de souches multi-résistantes appartenant au complexe clonal CC17, des impasses thérapeutiques ont rapidement été rapportées dès les années 1990, nécessitant la synthèse de nouvelles molécules, efficaces contre ces souches. Ces molécules comme le linézolide, la daptomycine, la quinupristine-dalfopristine ou encore la tigécycline ont été développées à cet égard. Cependant, de nouveau des cas d'échecs thérapeutiques ou l'apparition de souches résistantes ont été rapidement rapportés dans la littérature [305-308].

### **Traitements des infections dues aux entérocoques**

Le traitement habituel des infections à entérocoques repose soit sur l'ampicilline (ou l'amoxicilline), soit sur la vancomycine associée à la gentamicine dans les infections sévères. Ces antibiotiques ne sont pas utilisables en présence d'*E. faecium* résistants aux glycopeptides car ils sont presque toujours résistants à l'ampicilline.

Face à cette impasse thérapeutique, le développement de nouveaux antibiotiques a permis d'apporter quelques solutions. Le premier antibiotique développé a été la quinupristine dalfopristine, une streptogramine injectable, dérivée de la pristinamycine [309]. La nécessité d'une administration de cet antibiotique par cathéter central, l'apparition de résistance chez *E. faecium* (environ 10 %) et la résistance naturelle, constante, d'*E. faecalis* en ont limité son usage. Le linézolide, seul représentant d'une nouvelle famille, les oxazolidinones, administrable en intra veineux ou par voie orale, est actif contre les ERG (CMI modale 1 mg/l) quelle que soit l'espèce, et a été utilisé dans cette indication [309]. Alors que la fréquence de l'utilisation de cet antibiotique allait croissant, quelques souches d'ERG résistantes au linézolide, parfois épidémiques, ont été rapportées, notamment aux États-Unis [310]. La résistance est due à des mutations ribosomiques au niveau du site de fixation de l'oxazolidinone. La tigécycline est une glycylycine qui a l'intérêt, par rapport aux tétracyclines classiques, d'être active contre les souches résistantes à ces dernières [309]. Les souches cliniques résistantes sont exceptionnelles. Cependant, l'expérience clinique avec la tigécycline dans le traitement des infections à ERG est très limitée.

Ces trois antibiotiques récemment développés sont bactériostatiques contre les entérocoques. Seule la daptomycine, un nouveau lipo-peptide cyclique administrable par voie intraveineuse, se montre bactéricide. Cependant, cet antibiotique a surtout été développé contre les staphylocoques et l'expérience clinique, insuffisante dans les infections à entérocoques, ne permet pas son utilisation dans le cadre de l'autorisation de mise sur le marché. Au total, si plusieurs antibiotiques sont maintenant disponibles, l'efficacité de la plupart d'entre eux dans les infections à ERG reste à valider.

### **L'émergence des ERV dans l'environnement**

Puisque les gènes de résistance aux antibiotiques sont, en partie, transférés via des plasmides, les entérocoques peuvent contribuer à la propagation des résistances aux antibiotiques dans l'environnement [298]. Plusieurs études ont montré que le taux d'isolement des ERV a augmenté dans l'environnement et dans les hôpitaux dans le monde entier [311]. Le mécanisme de propagation dans ces cas n'est pas encore défini. Il a été suggéré que les patients colonisés pendant leur hospitalisation pourraient être la source de la transmission [289].

L'entérocoque peut croître et survivre dans la plupart des milieux, pendant des périodes de temps variant de 5 jours à environ 4 mois, selon les conditions environnementales. La littérature fait état de nombreuses situations dans lesquelles l'environnement a été impliqué dans la transmission de l'ERV [312]. Notamment, le fait de séjourner dans la même chambre qu'un porteur d'ERV ou dans une chambre préalablement occupée par un porteur d'ERV a été identifié comme un facteur de risque pour l'acquisition de l'ERV [313, 314].

L'ensemble des études tendent à démontrer que l'environnement, pris dans son sens large, joue un rôle important dans la transmission de l'ERV [315-317]. Notamment, une étude a démontré une association entre la diminution de la contamination environnementale par l'ERV et l'incidence de l'ERV chez les patients [315]. La contamination des surfaces et des objets de l'environnement immédiat des patients porteurs d'ERV est fréquente et peut toucher les cloches d'appel, téléphones, télécommandes de téléviseur, interrupteurs de lumières, ainsi que les équipements de soins comme les stéthoscopes, les thermomètres électroniques, les électrodes d'ECG, les saturomètres et autres équipements [317-322].

Une étude a permis de constater que 42 % (21/50) des rideaux séparateurs étaient contaminés par l'ERV. Dans cette même étude, la contamination des mains du personnel associée à la manipulation des rideaux contaminés a également été observée, d'où la possibilité de transmission à la clientèle non porteuse [323]. Il est de plus démontré que l'uniforme du personnel devient fréquemment contaminé lorsque des patients porteurs séjournent dans une unité de soins [320].

Les mesures touchant l'organisation des lieux physiques, dont les chambres individuelles avec toilette non partagée, l'équipement dédié en nombre suffisant et les mesures d'hygiène et salubrité revêtent donc une importance cruciale, tout comme les pratiques de base et les précautions additionnelles contre la transmission par contact.

La contribution relative de l'utilisation judicieuse des antibiotiques pour le contrôle de l'ERV demeure inconnue. L'utilisation de la vancomycine ou de la teicoplanine a été associée à la colonisation et/ou à l'infection par l'ERV dans plusieurs études; parfois la réduction de son utilisation a mené à une élimination ou un meilleur contrôle de l'ERV, bien qu'en général cette réduction ait été accompagnée de plusieurs autres mesures [317, 324]. Par ailleurs, d'autres études arrivent à des conclusions différentes [325, 326].

L'utilisation des céphalosporines, surtout à large spectre, a aussi été identifiée comme un facteur de risque de colonisation [327, 328], bien que certaines études n'ont pas démontré une telle association [326, 329]. Les antibiotiques ayant une activité anti-anaérobie (clindamycine, métronidazole, céfotetan, ticarcilline-acide clavulanique) ont aussi été associés avec un risque augmenté d'acquisition de l'ERV, de même que les quinolones, et les carbapénèmes [326, 330, 331]. La pipéracilline-tazobactam est un des rares antibiotiques à avoir été associé à un risque plus faible d'acquisition de l'ERV dans certaines études [327, 332], bien que cette observation n'a pas été corroborée par d'autres études [333].

La diminution globale de l'utilisation des antibiotiques a été moins étudiée mais a été associée à la maîtrise de quelques éclosions [334]. L'antibiothérapie est généralement considérée comme un facteur de risque associé à la dissémination de l'ERV. La revue de la littérature réalisée par Muto et al. a permis aux auteurs de conclure que l'utilisation des antibiotiques favorise le développement d'une flore résistante, mais que l'acquisition de l'ERV dans les milieux de soins se fait principalement par la transmission par contact [312]. Certains soutiennent que cela représente même un facteur de risque de développer une infection à ERV [335]. Le contrôle de l'utilisation d'une classe particulière d'antibiotique aura probablement moins d'impact qu'une réduction globale de l'utilisation des antibiotiques qui viserait particulièrement ceux qui ont été associés le plus souvent avec l'ERV (agents avec activité anaérobie, céphalosporines à large spectre, quinolones, carbapénèmes, glycopeptides). Il est reconnu que l'utilisation judicieuse des antibiotiques doit être intégrée dans l'approche multifactorielle requise pour la prévention et le contrôle de l'ERV.

### **Etude de la virulence des entérocoques**

Dans ce travail, nous avons étudié la cinétique de formation de biofilm par les entérocoques qui ont une place importante et croissante dans les infections communautaires et nosocomiales. La prévalence de la production de biofilms varie dans le monde. Nous avons trouvé que l'ensemble des souches d'entérocoques (d'*E. faecium* et d'*E. faecalis*) isolées du portage intestinal ont pu adhérer à la surface de polystyrène et former un biofilm. Ce résultat est similaire à une étude faite au Japon, réalisée sur des isolats d'*E. faecalis* causant des infections des voies urinaires [336], et supérieur à celui rapporté au Bangladesh où 68% des isolats d'entérocoques nosocomiales provenant d'infections des voies urinaires produisent le biofilms [337]. En revanche, d'autres travaux suggèrent que les souches d'*E. faecalis* produisent plus de biofilm que les isolats d'*E. faecium*. A Rome, Italie, 80% d'*E. faecalis* et 48% d'*E. faecium* isolés de patients infectés ont pu former des biofilm [338]. À Pampelune,

en Espagne, 57% d'*E. faecalis* isolés de divers isolats cliniques sont des formateurs de biofilm [339]. A Sardaigne, Italie, la production de biofilm a été identifiée chez 87% d'*E. faecalis* et 16% d'*E. faecium* des isolats cliniques [340]. La différence de la prévalence de la production du biofilm par les entérocoques peut être dû soit à la méthode utilisée pour la détection du biofilm soit à l'origine des isolats [296].

On note que nos souches ont formé un biofilm à partir de 2h, mais à une densité variable avec un maximum de formation de biofilm à 24h d'incubation. Selon l'intensité du biofilm formé nous avons différencié les isolats d'entérocoques en souches fortes (79.63%, 64.44%), modérées (3.70%, 13.33%) et faibles (16.67%, 22.22%) pour *E. faecium* et *E. faecalis* respectivement. Nos résultats diffèrent de ceux trouvés par Sindhanai et ses collègues, qui ont rapporté que 34% de leurs isolats ont formé un biofilm fort, 49% ont formé un biofilms modérés et 17% ont formé un faible biofilm [341]. Alors que Hashem et ses collègues ont trouvé que seulement 5.5% des isolats cliniques ont formé un fort biofilm, 42% ont formé un biofilm modéré, 48% ont formé un biofilm faible et 4.5% des souches sont non biofilmiques [342]. Il a été rapporté dans la littérature que la différenciation de l'intensité de formation de biofilms peut être associée à la substance d'agrégation, car ce gène est fréquemment trouvé chez les isolats modérés et forts [342]. L'étendue de la formation de biofilms et la différenciation entre la capacité de formation de biofilms faible, moyenne et forte sont importantes dans l'approche clinique, car la possibilité de l'implication des souches formatrices de biofilm dans l'infection des patients hospitalisés pourrait être sérieuse [343].

Nous avons porté intérêt à l'étude de l'éventuelle association entre la résistance des entérocoques aux antibiotiques et la formation de biofilm. Pour *E. faecium*, les souches résistantes à la vancomycine ont une capacité supérieure à former le biofilm comparativement aux souches sensibles à la vancomycine durant toutes les heures d'incubations. Cependant les *E. faecium* VanS forment plus de biofilm de forte intensité comparativement aux souches *E. faecium* VanR.

Contrairement à *E. faecium*, on a trouvé que les souches d'*E. faecalis* sensibles à la vancomycine ont formé plus de biofilm comparativement aux souches résistantes à la vancomycine durant toutes les heures d'incubations à part à 6h et à 24h. En outre, les souches d'*E. faecalis* VanS forment plus de biofilm de forte intensité comparativement aux souches *E. faecalis* VanR durant toutes les heures d'incubation à part à 8h où c'est l'inverse et qu'à 22h,

la totalité des isolats d'*E. faecalis* sensibles et résistants à la vancomycine forment un biofilm intense.

Concernant les souches d'ERV, il semblerait qu'il n'y a pas de liens entre la résistance à la vancomycine et la formation de biofilm. ce résultat est identique à ceux publiés dans d'autres études, qui signalent qu'aucune corrélation significative n'a été observée entre la multirésistance des entérocoques et la formation de biofilm [296, 344]. En effet, d'autres auteurs suggèrent que les micro-organismes producteurs de biofilm sont plus résistants aux antibiotiques [345]. La compréhension des mécanismes de résistance des biofilms aux antibiotiques, est devenue un challenge aussi bien pour la communauté médicale que pour la recherche fondamentale, d'autant plus que cette problématique rejoint très intimement la propagation de souches multirésistantes ces dernières années. En effet, il est maintenant bien établi que les transferts horizontaux de gènes et en particulier ceux relatifs à la résistance aux antibiotiques se font à une fréquence beaucoup plus importante entre les cellules d'un biofilm qu'entre leurs homologues planctoniques. Outre ces résistances génétiques, l'organisation spatiale des biofilms peut être à l'origine de tolérance aux antibiotiques et de chronicité d'infections toute aussi préoccupantes.

Les entérocoques ne sont pas des bactéries très virulentes par rapport aux *Staphylococcus* ou aux *Pneumococcus*, pour devenir pathogènes, ils ont besoin d'exprimer des caractéristiques de virulence associées à l'adhésion, la translocation et la disparition de la réponse immunitaire. Il existe plusieurs facteurs de virulence chez *E. faecalis* et *E. faecium* qui sont impliqués dans la pathogenèse des infections entérocoques. Dans cette étude, tous les isolats d'*E. faecalis* et d'*E. faecium* ont été examinés pour chercher la présence de gènes *cylA*, *esp*, *asa1*, *hyl* et *gelE* codant pour la cytolysine, protéine de surface de l'entérocoque, substance d'agrégation, hyaluronidase et gélatinase respectivement par amplification génique. *gelE* et *asa1* sont les gènes les plus fréquemment détectés chez *E. faecalis*. Pour les isolats d'*E. faecalis*, Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par d'autres auteurs qui ont trouvé que les gènes *gelE* et *asa1* étaient les gènes de virulence les plus répandus parmi les isolats d'*E. faecalis* et *E. faecium* prélevés sur des échantillons cliniques [346, 347]. Cependant, certains rapports ont indiqué l'absence ou la faible incidence du gène *gelE* chez les isolats d'*E. faecalis* et d'*E. faecium* [348, 349]. Nous avons souligné l'absence du gène *asa1* chez les souches d'*E. faecium* ce qui est appuyée par d'autres études antérieures [347, 349]. Par ailleurs, d'autres travaux ont souligné la présence très rare du gène *gelE* chez *E. faecium* alors qu'il est

largement présent chez les isolats d'*E. faecalis* [350, 351], cependant deux études [352, 353] n'ont trouvé aucun gène *gelE* dans un grand groupe d'isolats d'*E. faecium*.

D'autres études ont montré que le gène *gelE*, qui hydrolyse la gélatine, le collagène et l'hémoglobine, est associé au développement des biofilms chez les souches d'*E. faecalis* [354, 355]. Cependant, dans une vaste collection d'isolats d'*E. faecalis*, aucune relation significative n'a été trouvée entre la présence du gène *gelE* et la formation de biofilm [356, 357]. Cette étude a montré que la formation de biofilm était plus fréquente dans les isolats *gelE* négatifs que dans les isolats *gelE* positifs. Cela était particulièrement vrai pour les isolats ayant la capacité de former des biofilms forts. Il est possible que les types de séquences géniques des isolats d'*E. faecalis* dans cette étude diffèrent de ceux des études précédentes, ou que des facteurs inconnus contribuent à la formation de biofilms forts chez *E. faecalis* [358]. Pour les souches d'*E. faecium*, une étude a confirmé qu'il y a pas d'association entre la gélatinase et la production de biofilm [359]. Ce résultat ne concorde pas avec ceux d'autres travaux qui rapporte que les gènes *gelE* étaient plus fréquents dans les souches formatrices de biofilm [343, 360].

La substance d'agrégation (SA) est une adhésine bactérienne codée par un plasmide qui assure un contact efficace entre les bactéries donneuses et les bactéries receveuses, facilitant ainsi l'échange plasmidique [361]. En plus de sa fonction adhésive au cours de la conjugaison bactérienne, la SA agit sur l'adhérence d'*E. faecalis* à diverses cellules eucaryotes in vitro et joue un rôle essentiel dans la colonisation de l'hôte. L'adhérence des bactéries aux tissus de l'hôte est une étape cruciale dans le processus d'infection et la présence de SA dans les souches peut conduire à l'accroissement de la capacité de colonisation [358]. Une étude suggère que la combinaison de  $\beta$  hémolysine et de la substance d'agrégation entraîne une mortalité accrue dans l'endocardite due à *E. faecalis* [362]. Concernant l'association entre la présence du gène *asa1* et la formation de biofilm, il a été rapporté que cette dernière est favorisée par le gène *asa1* chez *E. faecalis* [363]. Le rôle de la SA dans la formation de biofilm est sous-rapporté et nécessite un complément d'étude [358].

Chez *E. faecium*, *esp* et *hyl* étaient les seuls facteurs de virulence retrouvés. L'analyse du profil des gènes de virulence montre que 3.63% d'*E. faecium* et 11.10% d'*E. faecalis* hébergent deux gènes de virulence à la fois. Ce résultat s'oppose à d'autres études qui rapportent que les isolats d'*E. faecium* n'hébergent pas plus qu'un facteur de virulence [349, 364]. L'émergence des souches d'*E. faecium* hébergeant à la fois plusieurs facteurs de

virulences ainsi que les gènes qui codent pour la multirésistance aux antimicrobiens, pourrait conduire à une mauvaise gestion de l'infection dû aux entérocoques [365].

le gène *esp* a aussi un rôle important, il code pour une protéine associée à la paroi bactérienne qui est impliqué dans l'échappement immunitaire [366]. Des études antérieures ont associé la présence du gène *esp* à la formation de biofilm [339, 358]. Il a été démontré que le gène *esp* renforce la formation de biofilm intense chez *E. faecalis* [296, 367]. De même, une étude japonaise antérieure a montré que les isolats d'*E. faecalis* exprimant le gène *esp* formaient des biofilms à un taux significativement plus élevé que ceux qui sont dépourvus de ce gène [336].

D'autres travaux ont souligné que la présence du gène *esp* d'*Enterococcus* résistants aux antimicrobiens isolés d'urine a entraîné une forte formation de biofilm et une ferme adhérence aux cellules hôtes [296, 354]. Une autre étude indienne a montré que les isolats producteurs de biofilm moyens et forts étaient particulièrement *esp* positifs [368]. En revanche, deux études sur des isolats cliniques et de laboratoire d'*E. faecalis* n'ont révélé aucune relation significative entre la formation de biofilm et la présence d'*esp* [357, 369]. Dans ces études, aucune association d'*esp*, avec une formation de biofilm faible ou forte n'a été trouvée. Des résultats similaires ont démontré que la formation de biofilm *in vitro* se produit, non seulement en absence d'*esp*, mais aussi en absence de toute l'île de pathogénicité qui héberge la séquence codante pour ce gène [369]. L'explication de l'éventuelle implication des facteurs de virulence dans la formation du biofilm nécessite des recherches supplémentaires [358].

D'autres facteurs de virulences sont élaborés par les entérocoques notamment les enzymes hydrolytiques produites, telles que la hyaluronidase [370]. C'est une enzyme qui dégrade l'acide hyaluronique, constituant majeur de la matrice extracellulaire des cellules animales. Il a été rapporté que le gène *hyl* codant pour la hyaluronidase est plus fréquent chez les souches biofilm positives [371]. Différents résultats ont été trouvés [360]; les auteurs ont montré que les souches présentant le gène *hyl* avaient une capacité de formation de biofilm significativement plus faible, ce qui indique que les isolats porteurs de ce gène préfèrent un mode de vie planctonique plutôt qu'un mode de vie par biofilm.

La cytolysine est l'un des facteurs de virulence les plus étudiés. Cette toxine peptidique lyse les cellules animales en générant des pores dans la membrane cellulaire. La production de la cytolysine semble être un facteur de risque important lié aux entérocoques pathogènes, ce mécanisme de lyse est une stratégie bactérienne pour contourner les réactions immunitaires de l'hôte [361]. Les gènes de cytolysine sont souvent portés par des plasmides et régulés par des

phéromones. La fréquence de mortalité causée par une infection par entérocoque  $\beta$ -hémolytique est cinq fois supérieure à celle observée par une infection a entérocoques non  $\beta$ - hémolytiques [372]. Il a été démontré que le gène *cylA* était associé à une faible formation de biofilm [358]. Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée entre la formation de biofilm et la présence des gènes *cylA* dans les isolats pathogènes et fécaux [344].

## CONCLUSION :

Les souches bactériennes qui ont fait l'objet de cette étude ont montré un haut niveau de résistance à la lincomycine (L), l'érythromycine (E), la tétracycline (TE) et la rifampicine (RA), avec un pourcentage de résistance de 89% (n=89), 89% (n=89), 79% (n=79), 64% (n=64) respectivement. De même, nous notons que 23 souches (23%) sont résistantes au teicoplanine et 15 souches (15%) sont résistantes la kanamycine (K). Deux souches seulement ont montré une résistance à la Gentamicine (G), soit une fréquence de 2%.

Les souches d'*E. faecium* ont présenté un taux élevé de la résistantes comparativement à *E. faecalis* pour tous les antibiotiques testés mis a part pour la tétracycline et la lincomycine. La sensibilité des souches étudiées ont montré que 88% des isolats étaient résistants à plusieurs antibiotiques (MDR).

Les résultats de l'étude moléculaire a confirmé ceux de l'identification biochimique des différentes espèces d'entérocoques par la détection du gène *ddl* *E. faecalis* chez les 45 souches identifiées *E. faecalis* et la présence du gène *ddl* *E. faecium* chez les 55 souches identifiées *E. faecium*. Parmi les 100 isolats d'entérocoques, 21 (21%) étaient résistants à la vancomycine par possession du gène *vanA*, dont 13 étaient *E. faecium* (23.6% de tous les *E. faecium*) et 8 étaient *E. faecalis* (17.8% de *E. faecalis*). Dans l'ensemble, les ERV ont été isolées de 18.6% (21/113) des sujets de l'étude.

La totalité de nos isolats ont la capacité de produire le biofilm. L'étude de l'intensité de formation de ce dernier, montre que la majorité des souches ont formé un biofilm de haute intensité au cours des premières heures avec un maximum de formation à 22 heures d'incubation. Pour les deux espèces d'entérocoques isolés, les souches VanS ont formé de fort biofilm comparativement aux souches VanR. Contrairement à *E. faecium*, les souches VanS d'*E. faecalis* ont formé plus de biofilms que les VanR. Aucune corrélation entre la résistance à la vancomycine et la production de biofilm n'a été trouvée.

Les gènes codant pour la gélatinase (*gelE*), La protéine de surface (*esp*) et la substance d'agrégation (*asaI*) ont été les principaux déterminants de la virulence chez *E. faecalis*. 27 de ces souches (60%) possèdent au moins un gène de virulence. les gènes *gelE*, *asaI* et *esp* ont été détectés respectivement dans 6 souches (13.33%), et *cylA* a été trouvé dans 4 isolats (8.88%). Les souches contenant deux gènes présentent 11.11% des isolats d'*E. faecalis*, dont une souche (2.22%) possède « *esp*, *gelE* » et 2 souches (4.44%) hébergent « *esp*, *cylA* »

et «*esp*, *hyl* » respectivement. Pour *E. faecium*, 25.45% (n=14) étaient positifs pour *esp*, 21.81 % (n=12) étaient positifs pour *hyl* et 3.63% (n=2) avaient à la fois les gènes *esp* et *hyl*. Les gènes *cylA*, *gelE* et *asal* étaient totalement absents chez toutes les souches d'*E. faecium*. Aucune association n'a été observée entre les gènes de virulence et la formation de biofilm chez *E. faecalis* et *E. faecium*.

### **PERSPECTIVES :**

Pour mieux caractériser les souches d'ERV, nous envisageons élargir notre population d'étude sur une grande population de souches communautaires et nosocomiales, qui circulent dans les principaux hôpitaux et villes du Maroc.

D'autres part, nous pensons à réaliser des tentatives de transfert des gènes de résistance à la vancomycine entre une souche résistante (donatrice) et une autre sensible à la vancomycine (réceptrice) afin de répondre à la question du rôle essentiel des bactéries commensales comme source de dissémination de la résistance dans la communauté marocaine. Et enfin chercher les autres gènes virulences qui existent chez les entérocoques tels que *CME* (composantes de la matrice extracellulaire), *Ace* (adhésine de liaison au collagène d'*E. faecalis*), *Scm* (Seconde adhésine de liaison au collagène d'*E. faecium*), *Acm* (adhésine de liaison au collagène d'*E. faecium*).

## RÉFÉRENCES

1. Paulsen IT, Banerjee L, Myers GS, Nelson KE, Seshadri R, Read TD, Fouts DE, Eisen JA, Gill SR, Heidelberg JF, Tettelin H, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac L, Beanan M, Daugherty S, DeBoy RT, Durkin S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, Vamathevan J, Tran B, Upton J, Hansen T, Shetty J, Khouri H, Utterback T, Radune D, Ketchum KA, Dougherty BA, Fraser CM. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*, 2003. **299**: p. 2071-2074.
2. Ruoff KL, de la Maza L, Murtagh MJ, Spargo JD, Ferraro MJ. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 1990. **28**: p. 435-437.
3. Schleifer KH, Kilpper-Bälz R. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol Immunol*, 1987. **10**: p. 1-19.
4. Galvez A, Dubois-Dauphin R, Destain J, Campos D, Thonart P. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement Biotechnol. Agron Soc Environ*, 2012. **16**(1): p. 67-76.
5. Schloissnig S, Arumugam M, Sunagawa S, Mitreva M, Tap J, Zhu A, Waller A, Mende DR, Kultima JR, Martin J, Kota K, Sunyaev SR, Weinstock GM, Bork P. Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature*, 2013. **493**: p. 45-50.
6. Gilmore MS, Lebreton F, van Schaik W. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Current Opinion in Microbiology*, 2013. **16**: p. 10.
7. Flahaut S, Boutibonnes P, Auffray. Enterococci in human environment. *Can J Microbiol*, 1997. **43**: p. 699-708.
8. Wheeler AL, Hartel PG, Godfrey DG, Hill JL, Segars WI. Potential of *Enterococcus faecalis* as a human fecal indicator for microbial source tracking. *Journal of Environmental Quality* 2002. **31**: p. 1286-93.
9. Thiercelin ME. Sur W1 diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène. *C R Soc Biol*, 1899. **5**: p. 269-271.
10. Flores MR, Ross TW, Lee H. Vancomycin Resistant Enterococci : approach to treatment and control. *Contr J*, 1996. **3**(1): p. 1-8.
11. Hall G. Prevention and control of vancomycin resistance in Gram positive coecal microorganisms : Prevention and control. *Infect Contr Hosp Epidemiol*, 1996. **17**: p. 353-355.
12. Van Tine D, Gilmore MS. Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. *Annual Review of Microbiology*, 2014. **68**: p. 337-56.
13. Lleó MM, Tafi M, Canepari P. Nonculturable *Enterococcus faecalis* cells are metabolically active and capable of resuming active growth. *Syst Appl Microbiol*, 1998. **21**: p. 333-339.
14. Kau AL, Martin SM, Lyon W, Hayes E, Caparon MG, Hultgren SJ. *Enterococcus faecalis* tropism for the kidneys in the urinary tract of C57BL/6J mice. *Infect Immun*, 2005. **73**: p. 2461-2468.
15. Filloux A, Vallet I. Biofilm: set-up and organization of a bacterial community. *Med Sci (Paris)*, 2003. **19**: p. 77-83.
16. Hendrickx AP, Willems RJ, Bonten MJ, van Schaik W. LPxTG surface proteins of enterococci. *Trends Microbiol.*, 2009. **17**(9): p. 423-30.
17. Sillanpää J, Nallapareddy SR, Prakash VP, Qin X, Höök M, Weinstock GM, Murray BE. Identification and phenotypic characterization of a second collagen adhesin, Scm, and

- genome-based identification and analysis of 13 other predicted MSCRAMMs, including four distinct pilus loci, in *Enterococcus faecium*. *Microbiology*, 2008. **154**: p. 3199-211.
18. Kowalski WJ, Kasper EL, Hatton JF, Murray BE, Nallapareddy SR, Gillespie MJ. *Enterococcus faecalis* adhesin, Ace, mediates attachment to particulate dentin. *J Endod*. **32**(7): p. 634-7.
  19. Rich RL, Kreikemeyer B, Owens RT, LaBrenz S, Narayana SV, Weinstock GM, Murray BE, Höök M. Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(38): p. 26939-45.
  20. Nallapareddy SR, Singh KV, Murray BE. Construction of improved temperature-sensitive and mobilizable vectors and their use for constructing mutations in the adhesin-encoding *acm* gene of poorly transformable clinical *Enterococcus faecium* strains. *Appl Environ Microbiol*, 2006. **72**(1): p. 334-45.
  21. Nallapareddy SR, Singh KV, Okhuysen PC, Murray BE. A functional collagen adhesin gene, *acm*, in clinical isolates of *Enterococcus faecium* correlates with the recent success of this emerging nosocomial pathogen. *Infect Immun*, 2008. **76**(9): p. 4110-9.
  22. Zong Y, Xu Y, Liang X, Keene DR, Höök A, Gurusiddappa S, Höök M, Narayana S. Collagen Hug<sup>1</sup> model for *Staphylococcus aureus* CNA binding to collagen. *EMBO J*, 2005. **24**(24): p. 4224-36.
  23. Hall AE, Gorovits EL, Syribeyts PJ, Domanski PJ, Ames BR, Chang CY, Vernachio JH, Patti JM, Hutchins JT. Monoclonal antibodies recognizing the *Enterococcus faecalis* collagen-binding MSCRAMM Ace: conditional expression and binding analysis. *Microb Pathog*, 2007. **43**(2-3): p. 55-66.
  24. Hendrickx AP, Willems RJ, Bonten MJ, van Schaik W. LPxTG surface proteins of enterococci. *Trends Microbiol*, 2009. **17**(9): p. 423-30.
  25. Hendrickx AP, van Luit-Asbroek M, Schapendonk CM, van Wamel WJ, Braat JC, Wijnands LM, Bonten MJ, Willems RJ. A nidogen-binding LPxTG surface adhesin implicated in biofilm formation, and EcbA, a collagen binding MSCRAMM, are two novel adhesins of hospital-acquired *Enterococcus faecium*. *Infect Immun*, 2009. **77**(11): p. 5097-106.
  26. Hendrickx AP, van Luit-Asbroek M, Schapendonk CM, van Wamel WJ, Braat JC, Wijnands LM, Bonten MJ, Willems RJ. SgrA, a nidogen-binding LPxTG surface adhesin implicated in biofilm formation, and EcbA, a collagen binding MSCRAMM, are two novel adhesins of hospital-acquired *Enterococcus faecium*. *Infect Immun*, 2009. **77**(11): p. 5097-106.
  27. Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun*, 1999. **67**(1): p. 193-200.
  28. Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *International journal of food microbiology*, 2006. **106**(1): p. 1-24.
  29. Baylan O, Nazik H, Bektöre B, Citil BE, Turan D, Ongen B, Ozyurt M, Açikel CH, Haznedaroğlu T. The relationship between antibiotic resistance and virulence factors in urinary *Enterococcus* isolates. *Mikrobiyol Bul*, 2011. **45**(3): p. 45.
  30. Borgmann S, Niklas DM, Klare I, Zabel LT, Buchenau P, Autenrieth IB, Heeg P. Two episodes of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreaks caused by two genetically different clones in a newborn intensive care unit. *Int J Hyg Environ Health*, 2004. **207**(4): p. 86-9.
  31. Leavis H, Top J, Shankar N, Borgen K, Bonten M, van Embden J, Willems RJ. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J Bacteriol*, 2004. **186**: p.3672-82.
  32. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol*, 2001. **183**(9): p. 2888-96.
  33. Lindahl G, Ståhlhammar-Carlemalm M, Areschoug T. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clin Microbiol Rev*, 2005. **18**(1): p. 102-27.
  34. Heikens E, Bonten MJ, Willems RJ. Enterococcal surface protein *Esp* is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J Bacteriol*, 2007. **189**(22): p. 8233-40.

35. Latasa C, Solano C, Penadés JR, Lasa I. Biofilm-associated proteins. *C R Biol*, 2006. **329**(11): p. 849-57.
36. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. The N-terminal domain of enterococcal surface protein, Esp, is sufficient for Esp-mediated biofilm enhancement in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*, 2005. **187**(17): p. 6213-22.
37. Leavis HL, Willems RJ, van Wamel WJ, Schuren FH, Caspers MP, Bonten MJ. Insertion sequence-driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faeciu*. *PLoS Pathog*, 2007. **3**(1): p. e7.
38. Billström H, Lund B, Sullivan A, Nord CE. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents*, 2008. **32**(5): p. 374-7.
39. Mandlik A, Swierczynski A, Das A, Ton-That H. Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol*, 2008. **16**(1): p. 33-40.
40. Handley PS, Jacob AE. Some structural and physiological properties of fimbriae of *Streptococcus faecalis*. *Journal of General Microbiology*, 1981. **127**: p. 289-293.
41. Tendolkar PM, aghdayan AS, Shankar N. Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*, 2006. **188**(6): p. 2063-72.
42. Cobo Molinos A, Abriouel H, Omar NB, López RL, Galvez A. Detection of ebp (endocarditis- and biofilm-associated pilus) genes in enterococcal isolates from clinical and non-clinical origin. *Int J Food Microbiol*, 2008. **126**(1-2): p. 123-6.
43. Hendrickx AP, Bonten MJ, van Luit-Asbroek M, Schapendonk CM, Kragten AH, Willems RJ. Expression of two distinct types of pili by a hospital-acquired *Enterococcus faecium* isolate. *Microbiology*, 2008. **154**: p. 3212-23.
44. Galloway-Pen JR, Nallapareddy SR, Arias CA, Eliopoulos G, Murray BE .Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. *J Infect Dis*, 2009. **200**(10): p. 1566-73.
45. Bourgogne A, EbpR is important for biofilm formation by activating expression of the endocarditis and biofilm-associated pilus operon (ebpABC) of *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J Bacteriol*, 2007. **189**(17): p. 6490-3.
46. Kemp KD, Singh KV, Nallapareddy SR, Murray BE. Relative contributions of *Enterococcus faecalis* OG1RF sortase-encoding genes, srtA and bps (srtC), to biofilm formation and a murine model of urinary tract infection. *Infect Immun*, 2007. **75**(11): p. 5399-404.
47. Singh KV, Nallapareddy SR, Murray BE. Importance of the ebp (endocarditis- and biofilm-associated pilus) locus in the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* ascending urinary tract infection. *J Infect Dis*, 2007. **195**(11): p. 1671-7.
48. Horn DL, Morrison DC, Opal SM, Silverstein R, Visvanathan K, Zabriskie JB. What are the microbial components implicated in the pathogenesis of sepsis? Report on a symposium. *Clinical Infectious Diseases*, 2000. **31**(4): p. 851-858.
49. Opal SM, Cohen J. Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis?. *Crit Care Med*, 1999. **27**(8): p. 1608-16.
50. Sriskandan S, Cohen J. Gram-positive sepsis. Mechanisms and differences from gram-negative sepsis. *Infect Dis Clin North Am*, 1999. **13**(2): p. 397-412.
51. Wicken AJ, Elliott SD, Baddiley J. The identity of streptococcal group D antigen with teichoic acid. *J Gen Microbiol*, 1963. **31**: p. 231-9.
52. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2004. **15**(5): p. 308-20.
53. Fisher W. Lipoteichoic acids and Lipoglycans in Bacterial cell wall. Elsevier, Amsterdam: New York : J.M. Ghuysen and R. Hakenbeck, Editors, 1994. **27**: p.201.
54. Bhakdi S, Klönisch T, Nuber P, Fischer W. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect Immun*, 1991. **59**(12): p. 4614-20.

55. Saetre T, Kähler H, Foster SJ, Lyberg T. Aminoethyl-isothiourea inhibits leukocyte production of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines induced by streptococcal cell wall components in human whole blood. *Shock*, 2001. **15**(6): p. 455-60.
56. Card GL, Jasuja RR, Gustafson GL. Activation of arachidonic acid metabolism in mouse macrophages by bacterial amphiphiles. *J Leukoc Biol*, 1994. **56**(6): p. 723-8.
57. Harrop PJ, O'Grady RL, Knox KW, Wicken AJ. Stimulation of lysosomal enzyme release from macrophages by lipoteichoic acid. *J Periodontal Res*, 1980. **15**(5): p. 492-501.
58. Levy R, Kotb M, Nagauker O, Majumdar G, Alkan M, Ofek I, Beachey EH. Stimulation of oxidative burst in human monocytes by lipoteichoic acids. *Infect Immun*, 1990. **58**(2): p. 566-8.
59. Cleveland RF, Daneo-Moore L, Wicken AJ, Shockman GD. Effect of lipoteichoic acid and lipids on lysis of intact cells of *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol*, 1976. **127**(3): p. 1582-4.
60. Ehrenfeld EE, Kessler RE, Clewell DB. Identification of pheromone-induced surface proteins in *Streptococcus faecalis* and evidence of a role for lipoteichoic acid in formation of mating aggregates. *J Bacteriol*, 1986. **168**(1): p. 6-12.
61. Bensing BA, Dunny GM. Cloning and molecular analysis of genes affecting expression of binding substance, the recipient-encoded receptor(s) mediating mating aggregate formation in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*, 1993. **175**(22): p. 7421-9.
62. Trotter KM, Dunny GM. Mutants of *Enterococcus faecalis* deficient as recipients in mating with donors carrying pheromone-inducible plasmids. *Plasmid*, 1990. **24**(1): p. 57-67.
63. Chandler JR, Hirt H, Dunny GM. A paracrine peptide sex pheromone also acts as an autocrine signal to induce plasmid transfer and virulence factor expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(43): p. 15617-22.
64. Kozłowicz BK, Dworkin M, Dunny GM. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: a model for the evolution of biological complexity? *Int J Med Microbiol*, 2006. **296**(2-3): p. 141-7.
65. Galli D, Lottspeich F, Wirth R. Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. *Mol Microbiol*, 1990. **4**: p. 6895-904.
66. Wirth R. The sex pheromone system of *Enterococcus faecalis*. More than just a plasmid-collection mechanism?. *Eur J Biochem*, 1994. **222**(2): p. 235-46.
67. Hirt H, Wanner G, Galli D, Wirth R. Biochemical, immunological and ultrastructural characterization of aggregation substances encoded by *Enterococcus faecalis* sex-pheromone plasmids. *Eur J Biochem*, 1993. **211**(3): p. 711-6.
68. Waters CM, Hirt H, McCormick JK, Schlievert PM, Wells CL, Dunny GM. An amino-terminal domain of *Enterococcus faecalis* aggregation substance is required for aggregation, bacterial internalization by epithelial cells and binding to lipoteichoic acid. *Mol Microbiol*, 2004. **52**(4): p. 1159-71.
69. Sartingen S, Rozdzinski E, Muscholl-Silberhorn A, Marre R. Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells in vitro. *Infect Immun*, 2000. **68**(10): p. 6044-7.
70. Rakita RM, Vanek NN, Jacques-Palaz K, Mee M, Mariscalco MM, Dunny GM, Snuggs M, Van Winkle WB, Simon SI. *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. *Infect Immun*, 1999. **67**(11): p. 6067-75.
71. Sussmuth SD, Muscholl-Silberhorn A, Wirth R, Susa M, Marre R, Rozdzinski E. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infect Immun*, 2000. **68**(9): p. 4900-6.

72. Rozdzinski E, Marre R, Susa M, Wirth R, Muscholl-Silberhorn A. Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. *Microb Pathog*, 2001. **30**(4): p. 211-20.
73. Johnson JR, Clabots C, Hirt H, Waters C, Dunny G. Enterococcal aggregation substance and binding substance are not major contributors to urinary tract colonization by *Enterococcus faecalis* in a mouse model of ascending unobstructed urinary tract infection. *Infect Immun*, 2004. **72**(4): p. 2445-8.
74. Chuang ON, Schlievert PM, Wells CL, Manias DA, Tripp TJ, Dunny GM. Multiple functional domains of *Enterococcus faecalis* aggregation substance Asc10 contribute to endocarditis virulence. *Infect Immun*, 2009. **77**(1): p. 539-48.
75. McCormick JK, Hirt H, Waters CM, Tripp TJ, Dunny GM, Schlievert PM. Antibodies to a surface-exposed, N-terminal domain of aggregation substance are not protective in the rabbit model of *Enterococcus faecalis* infective endocarditis. *Infect Immun*, 2001. **69**(5): p. 3305-14.
76. Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine*, 2004. **22**(7): p. 822-30.
77. Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore MS. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature*, 2002. **417**(6890): p. 746-50.
78. Coburn PS, Gilmore MS. The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell Microbiol*, 2003. **5**(10): p. 661-9.
79. Haas W, Shepard BD, Gilmore MS. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature*, 2002. **415**(6867): p. 84-7.
80. Budzik JM, Schneewind O. Pili prove pertinent to enterococcal endocarditis. *J Clin Invest*, 2006. **116**(10): p. 2582-4.
81. Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*, 2000. **13**(4): p. 513-22.
82. Hancock LE. Pathogenicity of Enterococci, in *Gram-positive Pathogens*. Wiley-Blackwell, Editor. ASM Press: Washington D.C., 2006: p. 299-311.
83. Chow JW, Thal LA, Perri MB, Vazquez JA, Donabedian SM, Clewell BD, Zervos MJ. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993. **37**(11): p. 2474-7.
84. Huycke MM, Spiegel CA, Gilmore MS. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991. **35**(8): p. 1626-34.
85. Ike Y, Hashimoto H, Clewell BD. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus* (*Streptococcus*) *faecalis* strains associated with human parenteral infections. *J Clin Microbiol*, 1987. **25**(8): p. 1524-8.
86. Wells CL, Jechorek RP, Erlandsen SL. Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. *J Infect Dis*, 1990. **162**(1): p. 82-90.
87. Gilmore MS, Segarra RA, Booth MC, Bogie CP, Hall LR, Clewell DB. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J Bacteriol*, 1994. **176**(23): p. 7335-44.
88. Huyck MM, DF Sahm, Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis*, 1998. **4**(2): p. 239-49.
89. Gilmore MS. Enterococcal Virulence, in *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. ASM Press: Washington, D.C, 2002: p. 301-354.
90. Garneau S, Martin NI, Vederas JC. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 2002. **84**(5-6): p. 577-92.
91. Van den Berghe E, De Winter T, De Vuyst L, Van den Berghe E, De Winter T, De Vuyst L. Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to

- nutrient depletion. *Int J Food Microbiol*, 2006. **107**(2): p. 159-70 *Int J Food Microbiol*, 2006. **107** (2): p. 159-70.
92. Campos CA, Rodriguez O, Calo-mata P, Prado M, Barros-Velázquez J. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Research International*, 2006. **39**: p. 356-364.
  93. De Kwaadsteniet M, Todorov SD, Knoetze H, Dicks LM. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol*, 2005. **105**(3): p. 433-44.
  94. Leroy F, Foulquie Moreno MR, De Vuyst L. *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *Int J Food Microbiol*, 2003. **88**(2-3): p. 235-40.
  95. García MT, Marínez Cañamero M, Lucas R, Ben Omar N, Pérez Pulido R, Gálvez A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin EJ97 produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Int J Food Microbiol*, 2004. **90**(2): p. 161-70.
  96. Lucas R, Grande MA, Abriouel H, Maqueda M, Ben Omar N, Valdivia E, Martínez-Cañamero M, Gálvez A. Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. *Food Chem Toxicol*, 2006. **44**(10): p. 1774-81.
  97. Yamashita, H., Tomita H, Inoue T, Ike Y. Genetic organization and mode of action of a novel bacteriocin, bacteriocin 51: determinant of VanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. **55**(9): p. 4352-60.
  98. Héchard Y, Sahl HG. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*, 2002. **84**(5-6): p. 545-57.
  99. Mohamed JA. Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol*, 2007. **56**(Pt 12): p. 1581-8.
  100. Prokesová L, Potuzníková B, Potempa J, Zikán J, Radl J, Hachová L, Baran K, Porwit-Bohr Z, John C. Cleavage of human immunoglobulins by serine proteinase from *Staphylococcus aureus*. *Immunol Lett*, 1992. **31**(3): p. 259-65.
  101. Duesbery NS, Webb CP, Leppla SH, Gordon VM, Klimpel KR, Copeland TD, Ahn NG, Oskarsson MK, Fukasawa K, Paull KD, Vande Woude GF. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science*, 1998. **280**(5364): p. 734-7.
  102. Tashiro M, Ciborowski P, Klenk HD, Pulverer G, Rott R. Role of *Staphylococcus* protease in the development of influenza pneumonia. *Nature*, 1987. **325**(6104): p. 536-7.
  103. McGavin MJ, Zahradka C, Rice Z, Scott JE. Modification of the *Staphylococcus aureus* fibronectin binding phenotype by V8 protease. *Infect Immun*, 1997. **65**(7): p. 2621-8.
  104. Lantz MS, Allen RD, Vail TA, Switalski LM, Hook M. Specific cell components of *Bacteroides gingivalis* mediate binding and degradation of human fibrinogen. *J Bacteriol*, 1991 **173**(2): p. 495-504.
  105. Ashbaugh CD, Warren HB, Carey VJ, Wessels MR. Molecular analysis of the role of the group A streptococcal cysteine protease, hyaluronic acid capsule, and M protein in a murine model of human invasive soft-tissue infection. *J Clin Invest*, 1998. **102**(3): p. 550-60.
  106. García de Fernando GD, Hernández PE, Burgos J, Sanz B, Ordóñez JA. Extracellular proteinase from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. II. Partial purification and some technological important properties. *Folia Microbiol (Praha)*, 1991. **36**(5): p. 429-36.
  107. Waters CM, Antiporta MH, Murray BE, Dunne GM. Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J Bacteriol*, 2003. **185**(12): p. 3613-23.
  108. Thomas VC, Hiromasa Y, Harms N, Thurlow L, Tomich J, Hancock LE. A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol*, 2009. **72**(4): p. 1022-36.

109. Kühnen E, Richter F, Richter K, Andries L. Establishment of a typing system for group D streptococci. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A*, 1988. **267**(3): p. 322-30.
110. Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*, 2004. **72**(6): p. 3658-63.
111. Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM, Murray BE. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *J Infect Dis*, 1995. **171**(5): p. 1223-9.
112. Thurlow LR, Thomas VC, Narayanan S, Olson S, Fleming SD, Hancock LE. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*, 2010. **78**(11): p. 4936-43.
113. Borgmann S, Niklas DM, Klare I, Zabel LT, Buchenau P, Autenrieth IB, Heeg P. Two episodes of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreaks caused by two genetically different clones in a newborn intensive care unit. *Int J Hyg Environ Health*, 2004. **207**(4): p. 386-9.
114. Lopes Mde F, Simões AP, Tenreiro R, Marques JJ, Crespo MT. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *Int J Food Microbiol*, 2006. **112**(3): p. 208-14.
115. Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect Immun*, 2000. **68**(5): p. 2579-86.
116. Peng HL, Novick RP, Kreiswirth B, Kornblum J, Schlievert P. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 1988. **170**(9): p. 4365-72.
117. Cheung AL, Eberhardt K, Heinrichs JH. Regulation of protein A synthesis by the *sar* and *agr* loci of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 1997. **65**(6): p. 2243-9.
118. Vankerckhoven V, Van Outgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, Jabes D, Goossens H. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*, 2004. **42**(10): p. 4473-9.
119. Freitas AR, Tedim AP, Novais C, Ruiz-Garbajosa P, Werner G, Laverde-Gomez JA, Cantón R, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Global spread of the *hyl*(Efm) colonization-virulence gene in megaplasmids of the *Enterococcus faecium* CC17 polyclonal subcluster. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010. **54**(6): p. 2660-5.
120. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med*, 1987. **107**(4): p. 526-45.
121. Huycke MM, Joyce W, Wack MF. Augmented production of extracellular superoxide by blood isolates of *Enterococcus faecalis*. *J Infect Dis*, 1996. **173**(3): p. 743-6.
122. Huycke MM, Gilmore MS. In vivo survival of *Enterococcus faecalis* is enhanced by extracellular superoxide production. *Adv Exp Med Biol*, 1997. **418**: p. 781-4.
123. Thakker M, Park JS, Carey V, Lee JC. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect Immun*, 1998. **66**(11): p. 5183-9.
124. Maekawa S, Yoshioka M, Kumamoto Y. Proposal of a new scheme for the serological typing of *Enterococcus faecalis* strains. *Microbiol Immunol*, 1992. **36**(7): p. 671-81.
125. Arduino RC, Murray BE, Rakita RM. Roles of antibodies and complement in phagocytic killing of enterococci. *Infect Immun*, 1994. **62**(3): p. 987-93.
126. Huebner J, Wang Y, Krueger WA, Madoff LC, Martirosian G, Boisot S, Goldmann DA, Kasper DL, Tzianabos AO, Pier GB. Isolation and chemical characterization of a capsular polysaccharide antigen shared by clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun*, 1999. **67**(3): p. 1213-9.

127. Hufnagel M, Hancock LE, Koch S, Theilacker C, Gilmore MS, Huebner J. Serological and genetic diversity of capsular polysaccharides in *Enterococcus faecalis*. *J Clin Microbiol*, 2004. **42**(6): p. 2548-57.
128. Hancock LE, Shepard BD, Gilmore MS. Molecular analysis of the *Enterococcus faecalis* serotype 2 polysaccharide determinant. *J Bacteriol*, 2003. **185**(15): p. 4393-401.
129. Thurlow LR, Thomas VC, Hancock LE. Capsular polysaccharide production in *Enterococcus faecalis* and contribution of CpsF to capsule serospecificity. *J Bacteriol*, 2009. **191**(20): p. 6203-10.
130. Bottone E., Encapsulated *Enterococcus faecalis*: role of encapsulation in persistence in mouse peritoneum in absence of mouse lethality. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1999. **33**(1): p. 65-8.
131. McBride SM, Fischetti VA, LeBlanc DJ, Moellering RC Jr, Gilmore MS. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS One*, 2007. **2**(7): p. e582.
132. Teng F, Jacques-Palaz KD, Weinstock GM, Murray BE. Evidence that the enterococcal polysaccharide antigen gene (*epa*) cluster is widespread in *Enterococcus faecalis* and influences resistance to phagocytic killing of *E. faecalis*. *Infect Immun*, 2002. **70**(4): p. 2010-5.
133. Xu Y, Murray BE, Weinstock GM. A cluster of genes involved in polysaccharide biosynthesis from *Enterococcus faecalis* OG1RF. *Infect Immun*, 1998. **66**(9): p. 4313-23.
134. Baldassarri L, Cecchini R, Bertuccini L, Ammendolia MG, Iosi F, Arciola CR, Montanaro L, Di Rosa R, Gherardi G, Dicuonzo G, Orefici G, Creti R. *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. *Med Microbiol Immunol*, 2001. **190**(3): p. 113-20.
135. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, Amorena B, Leiva J, Penadés JR, Lasa I. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, 2001. **67**(10): p. 4538-45.
136. Duprè I, Zanetti S, Schito AM, Fadda G, Sechi LA. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J Med Microbiol*, 2003. **52**(Pt 6): p. 491-8.
137. Sandoe JA, Witherden IR, Cove JH, Heritage J, Wilcox MH. Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medical-device-related infection potential in vivo. *J Med Microbiol*, 2003. **52**(Pt 7): p. 547-50.
138. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*, 2004. **72**(10): p. 6032-9.
139. Dworniczek E, Wojciech Ł, Sobieszkańska B, Seniuk A. Virulence of *Enterococcus* isolates collected in Lower Silesia (Poland). *Scand J Infect Dis*, 2005. **37**(9): p. 630-6.
140. Ramadhan AA, Hegedus E. Biofilm formation and esp gene carriage in enterococci. *J Clin Pathol*, 2005. **58**(7): p. 685-6.
141. Van Merode AE, Van der Meij HC, Busscher HJ, Krom BP. Influence of culture heterogeneity in cell surface charge on adhesion and biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*, 2006. **188**(7): p. 2421-6.
142. Nallapareddy SR, Singh KV, Sillanpää J, Garsin DA, Höök M, Erlandsen SL, Murray BE. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(10): p. 2799-807.
143. Schlüter S, Franz CM, Gesellchen F, Bertinetti O, Herberg FW, Schmidt FR. The high biofilm-encoding Bee locus: a second pilus gene cluster in *Enterococcus faecalis*?. *Curr Microbiol*, 2009. **59**(2): p. 206-11.
144. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clinical microbiology reviews* 1994. **7**(4): p. 462-478.
145. Clewell DB. Properties of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1, a member of a widely disseminated family of pheromone-responding, conjugative, virulence elements encoding cytolysin. *Plasmid*, 2007. **58**(3): p. 205-227.

146. Axelrod P, Talbot GH. Risks factors for acquisition of gentamicin-resistant enterococci. A multivariate analysis. *Arch. Med*, 1989. **49**: p. 1397-1401.
147. LEWIS CM, Zervos MJ, Clinical manifestations of enterococcal infection. *Eur J Clin Microbiology. Infection*, 1990. **9** (111-117).
148. Murray BE. The life and times of the enterococcus. *Clin. Microbiol. Rev*, 1990. **3**: p. 46-65.
149. Laupland KB, Bagshaw SM, Gregson DB, Kirkpatrick AW, Ross T, Church DL. Intensive care unit-acquired urinary tract infections in a regional critical care system. *Critical care*, 2005. **9**(2): p. 60-65.
150. Wazieres BD. Infections urinaires nosocomiales: qui traiter, quand traiter et comment traiter en gériatrie ?. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 2003. **33**(9): p. 469-473.
151. Schmitt JL, Leclercq R, Scheimberg A, Landauer D. Approche épidémiologique et clinique des entérocoques : résultats d'une enquête. *Med Mal Inf*, 1994. **24**: p. 141-148.
152. Edwards JR, Peterson KD, Andrus ML, Tolson JS, Goulding JS, Dudeck MA, Mincey RB, Pollock DA, Horan TC; NHSN Facilities. National Healthcare Safety Network (NHSN) Report, data summary for 2006, issued June 2007. *Am J Infect Control*, 2007. **35**(5): p. 290-301.
153. Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P. Précis de Bactériologie Clinique. 2ème édition. Editions ESKA, éditions Alexandre Lacassagne, Paris, France, 2007.
154. Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miró JM, Fowler VG Jr, Bayer AS, Karchmer AW, Olaison L, Pappas PA, Moreillon P, Chambers ST, Chu VH, Falcó V, Holland DJ, Jones P, Klein JL, Raymond NJ, Read KM, Tripodi MF, Utili R, Wang A, Woods CW, Cabell CH. Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Pro prospective Cohort Study. *Archives of internal medicine*, 2009. **169**(5): p. 463-473.
155. Besnier M. Implications cliniques. de la résistance des entérocoques aux antibiotiques. *Presse Med*, 1997. **26**: p. 1781-1787.
156. Facklam RA, Balows WJ, Hausler Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. Streptococcus and related catalase-negative gram-positive cocci. *Manual of clinical microbiology*, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., p. 238-257 1991.
157. Murray BE. The life and times of the enterococcus. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1990. **3**: p. 46-65.
158. WOLFF M, Leclercq B. Infections nosocomiales à entérocoques en réanimation et en hématologie. *Med Mal Infect*, 1994. **24**: p. 191-198.
159. Bavikatte K, Schreiner RL, Lemons JA., Gresham EL. Group D Streptococcal septicemia in the neonate. *Am J Dis Child*, 1979. **133**: p. 493-496.
160. Pintado V, Cabellos C, Moreno S, Meseguer MA, Ayats J, Viladrich PF, Enterococcal meningitis: a clinical study of 39 cases and review of the literature. *Medicine*, 2003. **82**(5): p. 346-364.
161. Korten V, Murray BE. The nosocomial transmission of enterococci. *Curr Opin Infect Dis*, 1993. **6**: p. 498-505.
162. Arthur M, Reynolds P, Courvalin P. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends in Microbiol*, 1996. **4**: p. 401-407.
163. Pace JL, Yang G. Glycopeptides : update on an old successful antibiotic class. *Bioch Pharmacol*, 2006. **71**: p. 968-980.
164. Mercier RC, Hrebickova L. Oritavancin: a new avenue for resistant Gram-positive bacteria. *Expert Rev Anti-Infect Ther*, 2005. **3**: p. 325-332.
165. Seltzer E, Dorr MB, Goldstein BP, Perry M, Dowell JA, Henkel T. one-weekly dalbavancin versus standard-of-care antimicrobial regimens for treatment of skin and soft-tissue infections. *Clin Infect Dis*, 2003. **37**: p. 1298-1303.
166. Barcia-Macay M, Lemaire S, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM, Van Bambeke F. Evaluation of the extracellular and intracellular activities (human THP-1 macrophages) of telavancin versus vancomycin against methicillin susceptible, methicillin-resistant, vancomycin-intermediate

- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, 2006. **58**: p. 1177-1184.
167. Stryjewski ME, O'Riordan WD, Lau WK, Pien FD, Dunbar LM, Vallee M, Fowler VG Jr, Chu VH, Spencer E, Barriere SL, Kitt MM, Cabell CH, Corey GR; FAST Investigator Group. Telavancin versus standard therapy for treatment of complicated skin and soft-tissue infections due to Gram-positive bacteria. *Clin Infect Dis*, 2005. **40**: p. 1601-1607.
168. Higgins DL, Chang R, Debabov DV, Leung J, Wu T, Krause KM, Sandvik E, Hubbard JM, Kaniga K, Schmidt DE Jr, Gao Q, Cass RT, Karr DE, Benton BM, Humphrey PP. Telavancin, a multifunctional lipoglycopeptide, disrupts both cell wall synthesis and cell membrane integrity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**: p. 1127-1134.
169. Allen NE, LeTourneau DL, Hobbs Jr JN, Thompson RC. Hexapeptide derivatives of glycopeptide antibiotics: tools for mechanism of action studies. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. **46**: p. 2344-2348.
170. Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin Microbiol Rev*, 2007. **20**: p. 79-114.
171. Bonora MG, Solbiati M, Stepan E, Zorzi A, Luzzani A, Catania MR, Fontana R. Emergence of linezolid resistance in the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* multilocus sequence typing C1 epidemic lineage. *J Clin Microbiol*, 2006. **44**: p. 1153-1155.
172. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med*, 1988. **319**: p. 157-161.
173. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*, 1988. **1**: p. 57-58.
174. Sahm DF, Kissinger J, Gilmore MS, Murray PR, Mulder R, Solliday J, Clarke B. In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989. **33**: p. 1588-1591.
175. Leavis HL, Bonten MJ, Willems RJ. Willems R.J.L. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol*, 2006. **9**: p. 454-460.
176. Top J, Willems R, Bonten M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2008. **52**: p. 287-308.
177. Ergani-Ozcan A, Naas T, Baysan BO, Ogunc D, Inan D, Colak D, Nordmann P. Nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a paediatric unit at a Turkish university hospital. *J Antimicrob Chemother*, 2008. **61**: p. 1033-1039.
178. Werner G, Klare I, Fleige C, Witte W. Increasing rates of vancomycin resistance among *Enterococcus faecium* isolated from German hospitals between 2004 and 2006 are due to wide clonal dissemination of vancomycin-resistant enterococci and horizontal spread of *vanA* clusters. *Int J Med Microbiol*, 2008. **298**( 5-6): p. 515-527.
179. Borgmann S, Schulte B, Wolz C, Gruber H, Werner G, Goerke C, Klare I, Beyser K, Heeg P, Autenrieth IB. Discrimination between epidemic and non-epidemic glycopeptide-resistant *E. faecium* in a post-outbreak situation. *J Hosp Inf*, 2007. **67**(1): p. 49-55.
180. Edwards JR, Peterson KD, Andrus ML, Tolson JS, Goulding JS, Dudeck MA, Mincey RB, Pollock DA. National Healthcare Safety Network (NHSN) Report, data summary for 2006, issued June 2007. *Am J Infect Control*, 2007. **35**: p. 290-301.
181. Fujita N, Yoshimura M, Komori T, Tanimoto ., Ike Y. First report of the isolation of high-level vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from a patient in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. **42**: p. 2150.

182. Yang KS, Fong YT, Lee HY, Kurup A, Koh TH, Koh D, Lim MK. Predictors of vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) carriage in the first major VRE outbreak in Singapore. *Ann Acad Med Singapore*, 2007. **36**(379-383).
183. Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2004. **50**: p. 59-69.
184. Leclercq R. Les entérocoques résistants aux glycopeptides : situation en France en 2005. *BEH*, 2006. **13**: p. 85-87.
185. (EARSS), E.A.R.S.S., Data summary from January 1999 through December 2005, issued September 2006. [www.rivm.nl/earss](http://www.rivm.nl/earss), Annual Report 2005.
186. Goossens H, Jabes D, Rossi R, Lammens C, Privitera G, Courvalin P. European survey of vancomycin-resistant enterococci in at-risk hospital wards and in vitro susceptibility testing of ramoplanin against these isolates. *J Antimicrob Chemother*, 2003. **51**: p. S5-S12.
187. Bonadio M, Meini M, Tagliaferri E, Gigli C, Vigna A. Enterococcal glycopeptide resistance at an Italian teaching hospital. *J Antimicrob Chemother*, 2000. **46**: p. 129-131.
188. Guerin F, Perrier-Gros-Claude JD, Foissaud V, Masseron T, Thierry J. Vancomycin-resistant *Enterococcus* in France. High prevalence in a young ambulatory care patient population. *Presse Med*, 1998. **27**: p. 1427-1429.
189. Deshpande LM, Fritsche TR, Moet GJ, Biedenbach DJ, Jones RN. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe : a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007. **58**: p. 163-170.
190. Sahm DF, Marsilio MK, Piazza G. Antimicrobial resistance in key bloodstream bacterial isolates : electronic surveillance with the Surveillance Network Database – USA. *Clin Infect Dis*, 1999. **29**: p. 259-263.
191. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis*, 2006. **42**: p. S25-S34.
192. Leclercq R, Dutka-Malen S, Duval J, Courvalin P. Vancomycin resistance gene *vanC* is specific to *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992. **36**: p. 2005-2008.
193. Navarro F, Courvalin P. Analysis of genes encoding D-Alanine-D-Alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994. **38**: p. 1788-1793.
194. Arthur M, Depadrieu F, Courvalin P. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *Journal of Bacteriology*, 1993. **175**(1): p. 117-127.
195. Al-Obeid S, Van Heijenoort J, Collatz E, Gutmann L. Replacement of the essential penicillin-binding protein 5 by high molecular mass PBPs may explain vancomycin- $\beta$ -lactam synergy in low-level vancomycin resistant *Enterococcus faecium* D366. *FEMS Microbiol Lett*, 1992. **91**: p. 79-84.
196. Arthur M, Depadrieu F, Molinas C, Reynolds P, Courvalin P. The *vanZ* gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin. *Gene*, 1995. **154**: p. 87-92.
197. Novais C, Freitas AR, Sousa JC, Baquero F, Coque TM, Peixe LV. Diversity of Tn1546 and its role in the dissemination of vancomycin-resistant enterococci in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008. **52**: p. 1001-1008.
198. Depadrieu F, Courvalin P, Msadek T. A six amino acid deletion, partially overlapping the VanSB G2 ATP-binding motif, leads to constitutive glycopeptide resistance in VanB-type *Enterococcus faecium*. *Mol Microbiol Immunol*, 2003. **50**: p. 1069-1083.

199. Domingo M-C, Huletsky A, Giroux R, Picard FJ, Bergeron MG. Characterization of the vanD and vanG-like gene clusters in a Ruminococcus species isolated from the human bowel flora. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. **51**: p. 4111-4117.
200. Guardabassi L, Perichon B, Heijenoort Jv, Blanot D., Courvalin P. Glycopeptide resistance vanA operons in Paenibacillus strains isolated from soil. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**: p. 4227-4233.
201. Depardieu F, Reynolds PE, Courvalin P. vancomycin-resistant Enterococcus faecium 10/96A. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. **47**: p. 7-18.
202. Reynolds PE, Courvalin P. Vancomycin-resistance in Enterococci due to synthesis of precursors terminating in D-Alanyl-D-Serine. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**: p. 21-25.
203. Boyd DA, Du T, Hizon R, Kaplen B, Murphy T, Tyler S, Brown S, Jamieson F, Weiss K, Mulvey MR. VanG-type vancomycin resistant Enterococcus faecalis strains isolated in Canada. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006. **50**: p. 2217-2221.
204. Kacica M. Brief Report: vancomycin-resistant Staphylococcus aureus, New York 2004. *MMWR*, 2004. **52**: p. 322-323.
205. Furano JP, Johnson JA, Wright MO, McGregor JC, Morris JG, Strauss, Nemoy LL, Standiford HC, Hebden JN, Harris AD. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and vancomycin-resistant enterococci co-colonization. *Emerg Inf Dis*, 2005. **11**: p. 1539-1544.
206. Warren DK, Nitin A, Hill C, Fraser VJ, Kollef MH. Occurrence of co-colonization or co-infection with vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a medical intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2004. **25**: p. 99-104.
207. McDonald JR, Engemann JJ, Kaye KS, Sexton DJ. Co-infection or co-colonization with vancomycin-resistant Enterococci and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in a network of community hospitals. *Inf Cont Hosp Epidemiol*, 2004. **25**: p. 622.
208. Weigel LM, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, Kolonay JF, Shetty J, Tenover FC. Genetic analysis of high-level vancomycin-resistant isolate of Staphylococcus aureus. *Science*, 2003. **302**: p. 1569-1571.
209. Flannagan SE, Chow JW, Donabedian SM, Brown WJ, Perri MB, Zervos MJ, Ozawa Y, Clewell DB. Plasmid content of a vancomycin-resistant Enterococcus faecalis isolate from a patient also colonized by Staphylococcus aureus with VanA phenotype. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. **47**: p. 3954-3959.
210. Whitener CJ, Park SY, Browne FA, Parent LJ, Julian K, Bozdogan B, Appelbaum PC, Chaitram J, Weigel LM, Jernigan J, McDougal LK, Tenover FC, Fridkin SK. Vancomycin resistant Staphylococcus aureus in the absence of vancomycin exposure. *Clin Infect Dis*, 2004. **38**: p. 1049-1055.
211. Severin A, Tabei K, Tenover F, Chung M, Clarke N, Tomasz A. High level of 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*, 2004. **279**: p. 3398-3407.
212. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, Robinson-Dunn B, Tenover FC, Zervos MJ, Band JD, White E, Jarvis WR. Emergence of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus. *New Engl J Med*, 1999. **340**: p. 493-501.
213. 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*, 1997. **350**: p. 1670-1673.
214. Cui L, Iwamoto A, Lian J-Q, Neoh H-M, Maruyama T, Horikawa Y, Hiramatsu K. Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006. **50**: p. 428-438.

215. Cui L, Murakami H, Kuwahara-Arai K, Hanaki H, Hiramatsu K. Contribution of thickened cell wall and its glutamine nonaminated component to vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. **44**: p. 2276-2285.
216. Bonten MJ, Weinstein RA. The role of colonization in the pathogenesis of nosocomial infections. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1996. **17**(3): p. 193-200.
217. Endtz HP, Van den Braak N, Van Belkum A, Kluytmans JA, Koeleman JG, Spanjaard L, Voss V, Weersink AJ, Buitting AG, van Duin A, Verbrugh HA. Fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients and those living in the community in The Netherlands. *J. Clin. Microbiol*, 1997. **35**: p. 3026-3031.
218. Gordts B, Van Landuyt H, Ieven M, Vandamme P, Goossens H. Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. *J. Clin. Microbiol*, 1995. **33**: p. 2842-2846.
219. Metallidis S, Chatzidimitriou M, Tsona A, Bisikis A, Larazaki G, Koumentaki E, Gikas A, Alexiou-Daniel S, Nikolaidis P. Vancomycin-resistant enterococci, colonizing the intestinal tract of patients in a University Hospital in Greece. *Braz J Inf Dis*, 2006. **10**: p. 179-184.
220. Green M, Barbadora K, Michaels M. Recovery of vancomycin-resistant Gram-positive cocci from pediatric liver transplant recipients. *J Clin Microbiol*, 1991. **29**: p. 2503-2506.
221. Livornese LL, Dias S, Samel C. Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. *Ann Intern Med*, 1992. **117**: p. 112-116.
222. Boyce JM, Mermel LA, Zervos MJ, Rice LB, Potter-Bynoe G, Giorgio C, Medeiros AA. Controlling vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1995. **16**: p. 634-637.
223. Tornieporth NG, Roberts RB, John J, Hafner A, Riley LW. Risk factors associated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection or colonization in 145 matched case patients and control patients. *Clin Infect Dis*, 1996. **23**: p. 767-772.
224. Ray AJ, Hoyer CK, Taub TF, Eckstein EC, Donskey CJ. Nosocomial transmission of vancomycin-resistant enterococci from surfaces. *JAMA*, 2002. **287**: p. 1400-1401.
225. Chavers LS, Moser SA, Benjamin WH, Banks SE, Steinhauer JR, Smith AM, Johnson CN, Funkhouser E, Chavers LP, Stamm AM, Waites KB. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. *J Hosp Inf*, 2003. **53**: p. 159-171.
226. Drees M, Snyderman DR, Schmid CH, Barefoot L, Hansjosten K, Vue PM, Cronin M, Nasraway SA, Golan Y. Prior environmental contamination increases the risk of acquisition of vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis*, 2008. **46**: p. 678-685.
227. Noskin GA, Stosor V, Cooper I, Peterson LR. Recovery of vancomycin-resistant enterococci on fingertips and environmental surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1995. **16**: p. 577-581.
228. Morris JG Jr, Shay DK, Hebden JN, McCarter RJ Jr, Perdue BE, Jarvis W, Johnson JA, Dowling TC, Polish LB, Schwalbe RS. Enterococci resistant to multiple antimicrobial agents, including vancomycin. Establishment of endemicity in a university medical center. *Ann Intern Med*, 1995. **123**: p. 250-259.
229. Pittet D, Mourouga P, Perneger TV. Compliance with handwashing in a teaching hospital. *Infection Control Program. Ann Intern Med*, 1999. **130**: p. 126-130.
230. Guerin F, Perrier-Gros-Claude JD, Foissaud V, Masseron T, Thierry J. Vancomycin-resistant *Enterococcus* in France. High prevalence in a young ambulatory care patient population. *Presse Med*, 1998. **27**: p. 1427-1429.
231. Petsaris O, Miszkczak F, Gicquel-Bruneau M, Perrin-Guyomard A, Humbert F, Sanders P, Leclercq R. Combined antimicrobial resistance in *Enterococcus faecium* isolated from chicken. *Environ Microbiol*, 2005. **43**: p. 3642-3649.

232. Bates J, Jordens Z, Selkon JB. Evidence for an animal origin of vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*, 1993. **342**: p. 490-491.
233. Acar J, Casewell M, Freeman J, Friis C, Goossens H. Avoparcin and virginiamycin as animal growth promoters: a plea for science in decision-making. *Clin Microbiol Infect*, 2000. **6**: p. 477-482.
234. De Niederhäusern S, Sabia C, Messi P, Guerrieri E, Manicardi G, Bondi M. VanA-Type vancomycin-resistant enterococci in equine and swine rectal swabs and in human clinical samples. *Curr Microbiol*, 2007. **55**: p. 240-246.
235. Ghidán A, Kaszanyitzky EJ, Dobay O, Nagy K, Amyes SG, Rozgonyi F. Distribution and genetic relatedness of vancomycin-resistant enterococci (VRE) isolated from healthy slaughtered chickens in Hungary from 2001 to 2004. *Acta Vet Hung*, 2008. **56**: p. 13-25.
236. Coque TM, Tomayko JF, Ricke SC, Okhyusen PC, Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community and animal sources in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996. **40**: p. 2605-2609.
237. Bischoff WE, Reynolds TM, Hall GO, Wenzel RP, Edmond MB. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a large urban hospital over a 5-year period. *J Clin Microbiol*, 1999. **37**: p. 3912-3916.
238. Beier RC, Duke SE, Ziprin RL, Harvey RB, Hume ME, Poole TL, Scott HM, Highfield LD, Alali WQ, Andrews K, Anderson RC, Nisbet DJ. Antibiotic and disinfectant susceptibility profiles of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) isolated from community wastewater in Texas. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2008. **80**: p. 188-194.
239. Talebi M, Rahimi F, Katouli M, Möllby R, Pourshafie MR. Epidemiological link between wastewater and human vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. *Curr Microbiol*, 2008. **56**: p. 468-473.
240. Sakka V, Tsiodras S, Galani L, Antoniadou A, Souli M, Galani I, Pantelaki M, Siafakas N, Zerva L, Giamarellou H. Risk-factors and predictors of mortality in patients colonised with vancomycin resistant enterococci. *Clin Microbiol Infect*, 2008. **14**(1): p. 14-21.
241. Rice LB, LaktičDvaá V, Helfand MS, Hutton-Thomas R. In vitro antienterococcal activity explains associations between exposures to antimicrobial agents and risk of colonization by multiresistant enterococci. *J Inf Dis*, 2004. **190**: p. 2162-2166.
242. De Bruin MA, Riley LW. Does vancomycin prescribing intervention affect vancomycin-resistant *Enterococcus* infection and colonization in hospitals ?. A systematic review. *BMC Inf Dis*, 2007. **7**: p. 24-34.
243. Paterson DL, Muto CA, Ndirangu M, Linden PK, Potoski BA, Capitano B, Bonomo RA, Aron DC, Donskey CJ. Acquisition of rectal colonization by vancomycin-resistant *Enterococcus* among intensive care unit patients treated with piperacillin-tazobactam versus those receiving cefepime-containing antibiotic regimens. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008. **52**(2): p. 465-9.
244. Zhou Q, Moore C, Eden S, Tong A, McGeer A. Factors associated with acquisition of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in roommate contacts of patients colonized or infected with VRE in a tertiary care hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008. **29**: p. 398-403.
245. Donskey CJ, Chowdhry TK, Hecker MT, Huyen CK, Hanrahan JA, Hujer AM, Hutton-Thomas RA, Whalen CC, Bonomo RA, Rice LB. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N Engl J Med*, 2000. **343**: p. 1925-1932.
246. Montecalvo MA, Horowitz H, Gedris C, Carbonaro C, Tenover FC, Issah A, Cook P, Wormser GP. Outbreak of vancomycin-, ampicillin-, and aminoglycoside-resistant *Enterococcus* bacteremia in an adult oncology unit. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994. **38**: p. 1363-1367.

247. Freitas MCS, Pacheco-Silva A, Barbosa D, Silbert S, Sader H, Sesso R, Camargo LFA. Prevalence of vancomycin-resistance *Enterococcus* fecal colonization among kidney transplant patients. *BMC Inf Dis*, 2006. **6**: p. 133-139.
248. Ostrowsky BE, Venkataramen L, D'Agata EMC, Gold HS, DeGirolami PC, Samore MH. Vancomycin-resistant enterococci in Intensive Care Units. *Arch Intern Med*, 1999. **159**: p. 1467-1472.
249. Vergis EN, Hayden MK, Chow JW, Snyderman DR, Zervos MJ, Linden PK, Wagener MM, Schmitt B, Muder RR. Determinants of vancomycin resistance and mortality rates in enterococcal bacteremia. *Ann Intern Med*, 2001. **135**: p. 484-492.
250. DiazGranados CA, Jernigan JA. Impact of vancomycin-resistance on mortality among patients with neutropenia and enterococcal bloodstream infection. *J Infect Dis*, 2005. **191**: p. 588-595.
251. Yoo JH., Lee DG, Choi SM, Choi JH, Shin WS, Kim M, Yong D, Lee K, Min WS, Kim CC. Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia in a hematology unit: molecular epidemiology and analysis of clinical course. *J Korean Med Sci*, 2005. **20**: p. 169-176.
252. Zirakzadeh A, Gastineau DA, Mandrekar JN, Burke JP, Johnston PB, Patel R. Vancomycin-resistant enterococcal colonization appears associated with increased mortality among allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*, 2008. **41**(4): p. 385-92.
253. Olivier CN, Blake RK, Steed LL, Salgado CD. Risk of vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) bloodstream infection among patients colonized with VRE. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008. **29**: p. 404-409.
254. Duerden ME, Bergeron J, Baker RL, Braddom RL. Braddon R.L, Controlling the spread of vancomycin-resistant enterococci with a rehabilitation cohort unit. *Arch Phys Med Rehabil*, 1997. **78**: p. 553-555.
255. Long JK, Choueiri TK, Hall GS, Avery RK, Sekeres MA. Daptomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a patient with acute myeloid leukemia. *Mayo Clin Proc*, 2005. **80**: p. 1215-1216.
256. Bonora MG, Solbiati M, Stepan E, Zorzi A, Luzzani A, Catania MR, Fontana R. Emergence of linezolid resistance in the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* multilocus sequence typing C1 epidemic lineage. *J Clin Microbiol*, 2006. **44**: p. 1153-1155.
257. Schulte B, Heining A, Autenrieth IB, Wolz C. Emergence of increasing linezolid-resistance in enterococci in a post-outbreak situation with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Epidemiol Infect*, 2007. **25**: p. 1-3.
258. Lee DK, Kim Y, Park KS, Yang JW, Kim K, Ha NJ. Antimicrobial activity of mupirocin, daptomycin, linezolid, quinupristin/dalfopristin and tigecycline against vancomycin-resistant enterococci (VRE) from clinical isolates in Korea (1998 and 2005). *J Biochimie Mol Biol*, 2007. **40**: p. 881-887.
259. Lee DK, Kim Y, Park KS, Yang JW, Kim K, Ha NJ. Antimicrobial activity of mupirocin, daptomycin, linezolid, quinupristin/dalfopristin and tigecycline against vancomycin-resistant enterococci (VRE) from clinical isolates in Korea (1998 and 2005). *J Biochimie Mol Biol*, 2007. **40**: p. 881-887.
260. Lucet JC, Armand-Lefevre L, Laurichesse JJ, Macrez A, Papy E, Ruimy R, Deblangy C, Lozach A, Lolom I, Jarlier V, Andremont A, Leport C. Rapid control of an outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a French university hospital. *J Hosp Inf*, 2007. **67**(1): p. 42-8.
261. Kurup A, Chlebicki MP, Ling ML, Koh TH, Tan KY, Lee LC, Howe KB. Control of a hospital-wide vancomycin-resistant *Enterococci* outbreak. *Am J Infect Control*, 2008. **36**: p. 206-211.
262. Eckstein BC, Adams DA, Eckstein EC, Rao A, Sethi AK, Yadavalli GK, Donskey CJ. Reduction of *Clostridium difficile* and vancomycin-resistant *Enterococcus* contamination of environmental surfaces after an intervention to improve cleaning methods. *BMC Inf Dis*, 2007. **7**: p. 61-66.
263. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **74**: p. 560-4.

264. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **74**: p. 5463–5467.
265. Zhang JH, Wu LY, Zhang XS. Reconstruction of DNA sequencing by hybridization. *Bioinformatics*, 2003. **19**: p. 14-21.
266. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol*, 2006. **24**(1): p. 25-9.
267. Abamecha A, Wondafrash B, Abdissa A. Antimicrobial resistance profile of Enterococcus species isolated from intestinal tracts of hospitalized patients in Jimma, Ethiopia. *BMC research notes*, 2015. **8**.
268. Djahmi N, Boutet-Dubois A, Nedjai S, Dekhil M, Sotto A, Lavigne JP. Molecular epidemiology of Enterococcus sp. isolated in a university hospital in Algeria. *Scand J Infect Dis*, 2012. **44**: p. 656–662.
269. Askarian M, Rahim Afkhamzadeh R, Monabbati A, Daxboeck F, Assadian O. Risk factors for rectal colonization with vancomycin-resistant enterococci in Shiraz, Iran. *International Journal of Infectious Diseases*, 2008. **12**: p. 171–175.
270. Van den Braak N, Ott A, Van Belkum A, Kluytmans JA, Koeleman JG, Spanjaard L, Voss A, Weersink AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Buiting AG, Verbrugh HA, Endtz HP. Prevalence and determinants of fecal colonization with vancomycin-resistant Enterococcus in hospitalized patients in The Netherlands. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2000. **21**: p. 520-4.
271. Cattoir V, Leclercq R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: Is it time to divorce?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013. **68**(4): p. 731–42.
272. Britan LE, Kwan S. Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother*, 1983. **23**: p. 835–845.
273. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*, 2010. **13**: p. 151–171.
274. Jackson J, Chen C, Buising K. Aminoglycosides: how should we use them in the 21st century? *Curr Opin Infect Dis*, 2013. **26**: p. 516-525.
275. Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist Updat.*, 2012. **15**: p. 133–148.
276. Sood S, Malhotra M, Das BK, Kapil A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian J Med Res*, 2008. **128**: p. 111-21.
277. Abamecha A, Wondafrash B, Abdissa A. Antimicrobial resistance profile of Enterococcus species isolated from intestinal tracts of hospitalized patients in Jimma, Ethiopia. *BMC research notes*, 2015. **8**: p. 213.
278. Garcia-G MC, Leo-Amador GE, Avila-Morales J, Zaldívar-Lelo de Larrea J G? Sanchez-Corona J. Vancomycin-resistant Enterococcus spp isolated from community acquired infections and colonizations in Querétaro City, Mexico. *American Journal of Infection Control* 2014. **42**: p. 578-580.
279. Medell M, Hart M, Batista ML. Sensibilidad antimicrobiana in vitro en aislamientos de Enterococcus faecalis y Enterococcus faecium obtenidos de pacientes hospitalizados. *Biomédica*, 2014. **34**: p. 50–57.
280. Hashem YA, Yassin AS, Amin MA. Molecular characterization of Enterococcus spp. clinical isolates from Cairo, Egypt. *Indian J Med Microbiol* 2015. **33**: p. 80–86.
281. Furtula V, Jackson CR, Farrell EG, Barrett JB, Hiott LM, Chambers PA. Antimicrobial Resistance in Enterococcus spp. Isolated from Environmental Samples in an Area of Intensive Poultry Production. *Int J Environ Res Public Health*, 2013. **10**: p. 1020-1036.

282. Bourdon N, Lemire A, Fines-Guyon M, Auzou M, Périchon B, Courvalin P, Cattoir V, Leclercq R. Comparison of four methods, including semi-automated Rep-PCR, for the typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Journal of Microbiological Methods*, 2011. **84**: p. 74–80.
283. Weijia J, Gang L, Wang W. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* species: A Hospital-Based Study in China. *Int J Environ Res Public Health*, 2014. **11**: p. 3.
284. Zouain MG, Araj G. Antimicrobial resistance of enterococci in Lebanon. *Inter J Antimicrob*, 2001. **17**: p. 209-213.
285. Chopra I, Roberts M. Tetracyclin antibiotics: mode of non infectious drug resistance plasmid. *J. Bacteriol* 2001. **124**: p. 784-790.
286. Enne VI, Delsol AA, Roe JM, Bannett PM. Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Ch.*, 2004. **53**: p. 203-7.
287. Kolar M, Pantucek R, Vagnerova I, Sauer P, Kesselova M, Cekanova L, Koukalova D, Doska J, Ruzickova V. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients and those living in the community in the Czech Republic. *New Microbiologica*, 2006. **29**: p. 121-125.
288. Balzereit-Scheuerlein F, Stephan R. Prevalence of colonisation and resistance patterns of vancomycin-resistant enterococci in healthy, non-hospitalised persons in Switzerland. *Swiss medical weekly*, 2001. **131**: p. 280.
289. Garcia-G MC, Leo-Amador GE, Avila-Morales J, Zaldívar-Lelo de Larrea J, Sanchez-Corona J. Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp isolated from community acquired infections and colonizations in Querétaro City, Mexico. *American Journal of Infection Control* 2014. **42**: p. 578-580.
290. Klare I, Heier H, Claus H, Böhme G, Marin S, Seltmann G, Hakenbeck R, Antanassova V, Witte W. *Enterococcus faecium* strains with vanA-mediated high-level glycopeptide resistance isolated from animal foodstuffs and fecal samples of humans in the community. *Microbial Drug Resistance*, 1995. **1**: p. 265-272.
291. Gambarotto K, Ploy MC, Turlure P, Grélaud C, Martin C, Bordessoule D, Denis F. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and nonhospitalized controls in a cattle-rearing area of France. *Journal of clinical microbiology* 2000. **38**: p. 620-624.
292. Wang J-T, Chang S-C, Wang H-Y, Chen PC, Shiau YR, Lauderdale T-L. High rates of multidrug resistance in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* isolated from inpatients and outpatients in Taiwan. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 2013. **75**: p. 406-411.
293. Van der Auwera P, Pensart N, Korten V, Murray BE, Leclercq R. Influence of oral glycopeptides on the fecal flora of human volunteers: selection of highly glycopeptide-resistant enterococci. *Journal of Infectious Diseases* 1996. **173**: p. 1129-1136.
294. Cattoir V, Leclercq R. Enterococci resistant to glycopeptides. *Med Sci (Paris)*, 2010. **26**: p. 936-942.
295. Talebi M, Moghadam A., Mamooii Z, Enayati M, Saif M, Pourshafe MR. Antibiotic resistance and biofilm formation of *enterococcus faecalis* in patient and environmental samples. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2015. **8**: p. e23349.
296. Shridhar S, Dahanashree B. Antibiotic Susceptibility Pattern and Biofilm Formation in Clinical Isolates of *Enterococcus* spp. *Hindawi*, 2019. **5**: p. 1-6.
297. Van Bambeke F, Van Laethem Y, Courvalin P, Tulkens PM. Glycopeptide Antibiotics from Conventional Molecules to New Derivatives. *Drugs* 2004. **64**: p. 913-936.
298. Borhani K, Ahmadi A, Rahimi F, Pourshafie MR, Talebi M. Determination of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* diversity in Tehran sewage using plasmid profile, biochemical fingerprinting and antibiotic resistance. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2014. **7**: p. 8951.
299. Kuch A, WILLEMS RJ, Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Sundsfjord A, Klare I, Ruiz-Garbajosa P, Simonsen GS, van Luit-Asbroek M, Hryniewicz W, Sadowy E. Insight into antimicrobial susceptibility and population structure of contemporary human *Enterococcus*

- faecalis isolates from Europe. . The Journal of antimicrobial chemotherapy, 2011. **67**: p. 551-8.
300. Montravers P. Les modèles expérimentaux permettent-ils de caractériser le rôle pathogène des entérocoques? Médecine et maladies infectieuses 1994. **24**: p. 152-7.
301. François-ngo S. Enterococcus faecalis: aspects bacteriologique, epidemiologique et thérapeutique. Feuillet de biologie, 1998. **39**: p. 21-6.
302. Besnier J, Leport C. Implications cliniques de la résistance des enterocoques aux antibiotiques. La Presse médicale 1997;. **26**: p. 1781-7.
303. Moellering RC Jr. Emergence of Enterococcus as a significant pathogen. Clinical infectious diseases, 1992. **14**: p. 1173-6.
304. Hancock LE. Pathogenicity of enterococci, in Gram-Positive Pathogens. Second Edition. American Society of Microbiology, 2006: p. 299-311.
305. Sinel C, Cosquer T, Auzou M, Goux D, Giard J-C, Cattoir V. Sequential steps of daptomycin resistance in Enterococcus faecium and reversion to hypersusceptibility through Is-mediated inactivation of the liaFSR operon. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2016. **71**: p. 2793–2797.
306. Cattoir V, Isnard C, Cosquer T, Odhiambo A, Bucquet F, Guérin F, Giard JC. Genomic analysis of reduced susceptibility to tigecycline in Enterococcus faecium. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015. **59**: p. 239–44.
307. Munita JM, Mishra NN, Alvarez D, Tran TT, Diaz L, Panesso D, Reyes J, Murray BE, Adachi JA, Bayer AS, Arias CA. Failure of high-dose daptomycin for bacteremia caused by daptomycin-susceptible Enterococcus faecium harboring LiaSR substitutions. Clinical Infectious Diseases, 2014. **59**: p. 1277–1280.
308. Arias CA, Panesso D, McGrath DM, Qin X, Mojica MF, Miller C, Diaz L, Tran TT, Rincon S, Barbu EM, Reyes J, Roh JH, Lobos E, Sodergren E, Pasqualini R, Arap W, Quinn JP, Shamoo Y, Murray BE, Weinstock GM. Genetic basis for in vivo Daptomycin resistance in Enterococci. The New England Journal of Medicine, 2011. **365**: p. 892–900.
309. Cattoir V. , Quelles nouveautés en antibiothérapie ? Med. Mal. Infect., 2010. **40**: p. 135-54.
310. Kainer MA, Devasia RA, Jones TF, Simmons BP, Melton K, Chow S, Broyles J, Moore KL, Craig AS, Schaffner W. Response to emerging infection leading to outbreak of linezolid-resistant enterococci. Emerg. Infect. Dis., 2007. **13**: p. 1024-30.
311. Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, Klare I, Kristinsson KG, Leclercq R, Lester CH, Lillie M, Novais C, Olsson-Liljequist B, Peixe LV, Sadowy E, Simonsen GS, Top J, Vuopio-Varkila J, Willems RJ, Witte W, Woodford N. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. Euro Surveill. , 2008. **13**: p. 19046.
312. Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, Boyce JM, Farr BM. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of Staphylococcus aureus and Enterococcus. Infect. Control. Hosp. Epidemiol, 2003. **24**: p. 362-386.
313. Hamel M, Zoutman D, O'Callaghan C. Exposure to hospital roommates as a risk factor for health care-associated infection. Am.J Infect.Control, 2010. **38**: p. 173-181.
314. Huang SS, Datta R, Rifas-Shiman S, Kleinman K, Placzek H, Lankiewicz JD, Platt R. Colonization with antibiotic-susceptible strains protects against methicillin-resistant Staphylococcus aureus but not vancomycin-resistant enterococci acquisition: a nested casecontrol study. Crit.Care, 2011. **15**: p. R210.
315. Perugini MR, Nomi SM, Lopes GK, Belei RA, van dHI, Mostachio AK, Grion C, Couto EB Jr, Costa SF. Impact of the reduction of environmental and equipment contamination on vancomycin-resistant Enterococcus rates. Infection, 2011. **39**: p. 587-593.
316. Hayden MK. Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant enterococci. Clin.Infect.Dis 2000. **31**: p. 1058-1065.

317. Martinez JA, Ruthazer R, Hansjosten K, Barefoot L, Snyderman DR. Role of environmental contamination as a risk factor for acquisition of vancomycin-resistant enterococci in patients treated in a medical intensive care unit. . *Arch.Intern.Med*, 2003. **163**: p. 1905-1912.
318. DeLisle S, Perl TM. Vancomycin-resistant enterococci: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. *Chest.*, 2003. **123**: p. 504S-518S.
319. Montecalvo MA, Jarvis WR, Uman J, Shay DK, Petrullo C, Horowitz HW, Wormser GP. Costs and savings associated with infection control measures that reduced transmission of vancomycin-resistant enterococci in an endemic setting. *Infect.Control.Hosp.Epidemiol.*, 2001. **22**: p. 437-442.
320. Perry C, Marshall R, Jones E. Bacterial contamination of uniforms. *J. Hosp. Infect.*, 2001. **48**: p. 238-241.
321. Puzniak LA, Leet T, Mayfield J, Kollef M, Mundy LM. To gown or not to gown: the effect on acquisition of vancomycin-resistant enterococci. *Clin.Infect.Dis*, 2002. **35**: p. 18-25.
322. Trick WE, Temple RS, Chen D, Wright MO, Solomon SL, Peterson LR. Patient colonization and environmental contamination by vancomycin-resistant enterococci in a rehabilitation facility. *Arch.Phys.Med Rehabil.*, 2002. **83**: p. 899-902.
323. Trillis F 3rd, Eckstein EC, Budavich R, Pultz MJ, Donskey CJ. Contamination of hospital curtains with healthcare-associated pathogens. *Infect. Control.Hosp. Epidemiol.*, 2008. **29**: p. 1074-1076.
324. Zaas AK, Song X, Tucker P, Perl TM. Risk factors for development of vancomycin-resistant enterococcal bloodstream infection in patients with cancer who are colonized with vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Infect. Dis*, 2002. **35**: p. 1139-1146.
325. McCann S, Byrne JL, Rovira M, Shaw P, Ribaud P, Sica S, Volin L, Olavarria E, Mackinnon S, Trabasso P, VanLint MT, Ljungman P, Ward K, Browne P, Gratwohl A, Widmer AF, Cordonnier C. Outbreaks of infectious diseases in stem cell transplant units: a silent cause of death for patients and transplant programmes. . *Bone. Marrow. Transplant.*, 2004. **33**: p. 519-529.
326. Padiglione AA, Wolfe R, Grabsch EA, Olden D, Pearson S, Franklin C Spelman D, Mayall B, Johnson PDR, Lindsay MG. Risk factors for new detection of vancomycin-resistant enterococci in acute-care hospitals that employ strict infection control procedures. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 2003. **47**: p. 2492-2498.
327. Gearhart M, Martin J, Rudich S, Thomas M, Wetzel D, Solomkin J, Hanaway MJ, Aranda-Michel J, Weber F, Trumball L, Bass M, Zavala E, Woodle ES, Buell JF. Consequences of vancomycin-resistant *Enterococcus* in liver transplant recipients: a matched control study. *Clin.Transplant.*, 2005. **19**: p. 711-716.
328. Oh HS, Kim EC, Oh MD, Choe KW. Outbreak of vancomycin resistant *Enterococcus* in a hematology/oncology unit in a Korean University Hospital, and risk factors related to patients, staff, hospital care and facilities. *Scand. J Infect. Dis.*, 2004. **36**: p. 790-794.
329. Timmers GJ, van der Zwet WC, Simoons-Smit IM, Savelkoul PH, Meester HH, Vandenbroucke-Grauls CM, Huijgens PC. Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a haematology unit: risk factor assessment and successful control of the epidemic. *Br. J. Haematol.*, 2002. **116**: p. 826-833.
330. Atta MG, Eustace JA, Song X, Perl TM, Scheel PJ Jr. Outpatient vancomycin use and vancomycin-resistant enterococcal colonization in maintenance dialysis patients. *Kidney. Int.*, 2001. **59**: p. 718-724.
331. Byers KE, Anglim AM, Anneski CJ, Farr BM. Duration of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Infect.Control. Hosp. Epidemiol.*, 2002. **23**: p. 207-211.
332. Hotchkiss JR, Strike DG, Simonson DA, Broccard AF, Crooke PS. An agent-based and spatially explicit model of pathogen dissemination in the intensive care unit. *Crit.Care Med*, 2005. **33**: p. 168-176.

333. Stiefel U, Paterson DL, Pultz NJ, Gordon SM, Aron DC, Donskey CJ. Effect of the increasing use of piperacillin/tazobactam on the incidence of vancomycin-resistant enterococci in four academic medical centers. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 2004. **25**: p. 380-383.
334. Pearman JW. 2004 Lowbury Lecture: the Western Australian experience with vancomycin-resistant enterococci - from disaster to ongoing control. *J. Hosp. Infect.*, 2006. **63**: p. 14- 26.
335. Patel R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2003. **51**: p. 13-21.
336. Seno Y, Kariyama R, Mitsuhashi R, Monden K, Kumon H. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta Med Okayama*, 2005. **59**: p. 79–87.
337. Akhter J, Ahmed S, Saleh AA, Anwar S. Antimicrobial resistance and in vitro biofilm-forming ability of *Enterococci* spp. isolated from urinary tract infection in a tertiary care hospital in Dhaka. *Bangladesh Med. Res. Counc. Bull.*, 2014. **40**: p. 6–9.
338. Baldassarri L, Cecchini R, Bertuccini L, Ammendolia MG, Iosi F, Arciola CR, Montanaro L, Di Rosa R, Gherardi G, Dicuonzo G, Orefici G, Creti R. *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. *Med Microbiol Immunol*, 2001. **190**: p. 113–120.
339. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, Amorena B, Leiva J, Penadés JR, Lasa I. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, 2001. **67**: p. 4538–4545.
340. Dupre I, Zanetti S, Schito AM, Fadda G, Sechi LA. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J Med Microbiol* 2003. **52**: p. 491–498.
341. Sindhanai V, Avanthiga SS, Suresh, Chander VC. Antibiotic susceptibility pattern of biofilm forming and biofilm non forming enterococci species. *IOSR J. Dent. Med. Sci* 2016. **15**: p. 33–37.
342. Hashem YA, Amine HM, Essam TM, Yassin AS, Aziz RK. Biofilm formation in enterococci: genotype-phenotype correlations and inhibition by vancomycin. *Scientific RepoRts* 2017. **7**: p. 5733.
343. Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. *J. Med. Microbiol.*, 2007. **56**: p. 1581–1588.
344. Saffari F, Dalfardi MS, Mansouri S, Ahmadrajabi R. Survey for correlation between biofilm formation and virulence determinants in a collection of pathogenic and fecal *Enterococcus faecalis* isolates. *Infect Chemother* 2017. **49**: p. 176-183.
345. Paganelli FL, Willems RJ, Jansen P, Hendrickx A, Zhang X, Bonten MJ, Leavis HL. *Enterococcus faecium* biofilm formation: identification of major autolysin AtIAEfm, associated Acm surface localization, and AtIAEfm-independent extracellular DNA Release. *MBio*, 2013. **4**: p. e00154-13.
346. Shahraki S, Morteza MRN. Determination of virulence factors in clinical multidrug resistance *Enterococci* isolates at Southeast of Iran. *Jundishapur J Microbiol.* , 2017. **10**: p. e45514.
347. Shokoohizadeh L, Ekrami A, Labibzadeh M, Ali L, Alavi SM. Antimicrobial resistance patterns and virulence factors of enterococci isolates in hospitalized burn patients. *BMC Res Notes* 2018. **11**: p. 1.
348. Sharifi Y, Hasani A, Ghotaslou R, Naghili B, Aghazadeh M, Milani M, Bazmany A. Virulence and antimicrobial resistance in enterococci isolated from urinary tract infections. *Adv. Pharmaceut. Bull.* , 2013. **3**: p. 197.
349. Hällgren A, Claesson C, Saeedi B, Monstein HJ, Hanberger H, Nilsson LE. Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. *Int. J. Med. Microbiol. Suppl.*, 2009. **299**: p. 323-32.

350. Comerlato CB, Resende MC, Caierão J, d'Azevedo PA. Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2013. **108**: p. 590–595.
351. Hasani A, Sharifi Y, Ghotaslou R, Naghili B, Hasani A, Aghazadeh M, Milani M, Bazmani A. Molecular screening of virulence genes in high level gentamicin resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from clinical specimens in northwest Iran. *Indian J Med Microbiol* 2012. **30**: p. 175–181.
352. Vankerckhoven V, Van Outgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, Jabes D, Goossens H. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in *Enterococci* and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*, 2004. **42**: p. 4473–4479.
353. Diani. M., Günay-Esiyok Ö, Ariafar MN, Yuksel FN, Altuntas EG, Akcelik N. The interactions between *esp*, *fsr*, *gelE* genes and biofilm formation and pfge analysis of clinical *Enterococcus faecium* strains. *Afr J Microbiol Res*, 2014. **8**: p. 129–137.
354. Park SY, Kim KM, Lee JH, Seo SJ, Lee IH. Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infect Immun*, 2007. **75**: p. 1861–1869.
355. Thomas VC, Thurlow LR, Boyle D, Hancock LE. Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development. *J Bacteriol*, 2008. **190**: p. 5690–5698.
356. Mohamed JA, Murray BE. Lack of correlation of gelatinase production and biofilm formation in a large collection of *Enterococcus faecalis* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2005. **43**: p. 5405–5407.
357. Anderson AC, Jonas D, Huber I, Karygianni L, Wölber J, Hellwig E, Arweiler N, Vach K, Wittmer A, Al-Ahmad A. *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. *Front Microbiol* 2016. **6**: p. 1534.
358. J Zheng JX, Zhi-wei Lin BB, Pu ZY, Wei-ming Yao, Chen Z, Li D Y, Deng XB, Deng QW, Yu ZJ, Characterization of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* isolates derived from urinary tract infections in China. *Journal of Medical Microbiology*, 2018. **67**: p. 60–67.
359. Di Rosa R, Creti R, Venditti M, D'Amelio R, Arciola CR, Montanaro L, Baldassarri L. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett*, 2006. **256**: p. 145–150.
360. Kafil HS, Mobarez A. Assessment of biofilm formation by enterococci isolates from urinary tract infections with different virulence profiles. *J King Saud Univ Sci*, 2015. **27**: p. 312–317.
361. LeBlanc D. *Enterococcus*. *Prokaryotes*, 2006. **4**: p. 175-204.
362. Chow JW, Thal LA, Perri MB, Vazquez JA, Donabedian SM, Clewell DB, Zervos MJ. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1993. **37**: p. 2474-7.
363. Chuang-Smith ON, Wells CL, Henry-Stanley MJ, Dunny GM. Acceleration of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by aggregation substance expression in an ex vivo model of cardiac valve colonization. *PLoS One*, 2010. **5**: p. e15798.
364. Terkuran M, Erg Z, Ünal E, Guran M, Kizilyildirim S, Gökce U. The relationship between virulence factors and vancomycin resistance among *Enterococci* collected from food and human samples in Southern Turkey. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2014. **61**: p. 133-40.
365. Soares RO, Fedi AC, Reiter KC, Caierão J, d'Azevedo PA. Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. *Virulence*, 2014. **5**: p. 634-7.

- 
366. Del Papa MF, Hancock LE, Thomas VC, Perego M. Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. *Journal of bacteriology*, 2007. **189**: p. 8835-43.
  367. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*, 2004. **72**: p. 6032–6039.
  368. Garg S, Mohan B, Taneja N. Biofilm formation capability of enterococcal strains causing urinary tract infection vis-a-vis colonisation and correlation with enterococcal surface protein gene. *Indian J Med Microbiol Immunol*, 2017. **35**: p. 48–52.
  369. Kristich CJ, Li YH, Cvitkovitch DG, Dunny GM. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*, 2004. **186**: p. 154–163.
  370. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 2009. **155**: p. 1749-57.
  371. Sieńko A, Wieczorek P, Majewski P, Ojdana D, Wieczorek A, Olszańska D, Tryniszewska E. Comparison of antibiotic resistance and virulence between biofilm-producing and non-producing clinical isolates of *Enterococcus faecium*. *Acta Biochimica Polonica*, 2015. **62**: p. 859–866.
  372. Huycke MM, Spiegel CA, Gilmore MS. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1991. **35**: p. 1626-34.

## LES ANNEXES

### ANNEXE 1 : Formulaire de consentement de participation a une recherche biomédicale

**Titre de l'étude** : Caractérisation phénotypique et génotypique et étude de la virulence des entérocoques résistants à la vancomycine isolés du portage intestinal en milieu communautaire à Casablanca, Maroc.

Je soussigné(e) .....(nom et prénom du sujet),j'accepte de participer à l'étude nommée « Caractérisation phénotypique et génotypique et étude de la virulence des entérocoques résistants à la vancomycine isolés du portage intestinal en milieu communautaire à Casablanca, Maroc ».

Les objectifs et modalités de l'étude m'ont été clairement expliqués par Mlle Imane HANNAOUI.

Je consens au prélèvement, à leur conservation et à leur utilisation ultérieure dans le cadre de cette étude. J'accepte que les informations qui se rapportent à l'étude puissent être accessibles aux responsables de l'étude et éventuellement aux autorités de la santé. A l'exception de ces personnes, qui traiteront les informations dans le plus strict respect du secret médical, mon anonymat sera préservé.

J'ai bien compris que ma participation à l'étude est volontaire.

Je suis libre d'accepter ou de refuser de participer, et je suis libre d'arrêter à tout moment ma participation en cours d'étude.

Après en avoir discuté et avoir obtenu la réponse à toutes mes questions, j'accepte librement et volontairement de participer à la recherche qui m'est proposée.

Fait à .....,

le .....

*Nom et signature de l'investigateur*

*Signature du sujet*

## Formulaire de participation à l'étude

Code de l'échantillon : .....

Date de prélèvement : .....

Nom : .....

Prénom : .....

Sexe : .....

Age : .....

Adresse : .....

.....

Numéro de téléphone : .....

E mail.....

Niveau socio-économique : .....

Profession : .....

Maladies chroniques : .....

.....

Utilisation d'antibiotique : .....

.....

Date(s) d'hospitalisation(s) : .....

.....

Lieu(x) d'hospitalisation(s) : .....

.....

Durée(s) d'hospitalisation(s) : .....

## ANNEXE 2 : Liste des milieux de culture et de solutions utilisés

**Le bouillon d'enrichissement cœur-cervele (Brain Heart Infusion : BHI) :** Le bouillon cœur-cervele est un milieu nutritif tamponné, servant à cultiver des microorganismes exigeants et non exigeants. Il s'est révélé efficace pour la culture d'un grand nombre de microorganismes, y compris de nombreux types de pathogènes, ainsi que le développement des bactéries stressées et en faible quantité. Composition du BHI : Formule approximative par litre d'eau purifiée

Cœur-cervele, infusion à partir de (matières solides) .....	6,0 g
Digestion peptique de tissu animal .....	6,0 g
Chlorure de sodium .....	5,0 g
Dextrose .....	3,0 g
Digestion pancréatique de gélatine .....	14,5 g
Phosphate disodique .....	2,5 g

Le BHI hypersalé contient 6.5% de chlorure de sodium en plus des ingrédients énumérés ci-dessus.

**Milieu Bile Esculine Azide (BEA) :** C'est un milieu sélectif d'isolement et de différenciation des streptocoques fécaux : Enterococcus et genre Streptococcus du groupe D.

- L'azide de sodium provoque l'inhibition des bactéries à Gram négatif.
- La bile de bœuf empêche la croissance des bactéries à Gram positif.

Composition du BEA : Pour 1 litre de milieu :

Tryptone.....	17,00 g
Peptone pepsique de viande .....	3,00 g
Extrait autolytique de levure.....	5,00 g
Bile de bœuf bactériologique .....	10,00 g
Chlorure de sodium.....	5,00 g
Esculine .....	1,00 g
Citrate ferrique ammoniacal.....	0,50 g
Azide de sodium .....	0,15 g
Agar-agar bactériologique.....	13,00 g

PH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C :  $7,1 \pm 0,2$ .

**La gélose Mueller-Hinton (M-H)** : C'est le milieu de référence pour les tests de sensibilité des germes aux antibiotiques et sulfamides. Sa formulation est conforme aux recommandations du CLSI, du CA-SFM ou de l'EUCAST. Elle peut également être additionnée de sang pour réaliser l'antibiogramme des germes fragiles, tels que *Haemophilus influenzae*, *Neisseria* et *Streptococcus pneumoniae*.

La composition du MH :

Infusion de viande de bœuf : .....300,0 ml  
 Peptone de caséine : ..... 17,5 g  
 Amidon de maïs : ..... 1,5 g  
 Agar : .....17,0 g  
 Eau distillée : ..... qsp 1 litre  
 pH = 7,4

EDTA (Disodium ethyl diamine tétraacétate) 0.5M pH=8

- Dissoudre 93,05g d'EDTA dans 40 ml d'eau distillée.
- Agiter vigoureusement en ajustant le pH à 8 avec du NaOH 10N .
- Ajuster le volume final à 500 ml
- Aliquoter et autoclaver.

### **TBE 0.5X**

- Tris HCl : ..... 0.045M  
 - Acide borique : ..... 0.045M  
 - EDTA : ..... 0.001M  
 pH=8.3

**Bromure d'éthidium 10 mg/ml (BET)**

- Ajouter 1g de BET à 100 ml d'eau distillée.
- Laisser dissoudre sous agitation et couvrir le flacon avec du papier aluminium.
- Stocker à température ambiante.

C'est un produit mutagène, travailler avec des gants et un masque

**Tampon de charge**

- Bleu de bromophénol (BBP) : .....12.5 mg
- Xylène : .....12.5 mg
- Glycérol 30% : .....1.5 ml
- Compléter à 10 ml avec de l'eau distillée.

### **ANNEXE 3 : Coloration de Gram**

- Déposer une goutte d'eau stérile
- Étaler quelques colonies de la culture bactérienne à l'aide d'une anse de platine stérilisée
- Sécher et fixer le frottis au-dessus de la flamme du bec Bunsen
- Colorer le frottis par le violet de gentiane ou le cristal violet. Laisser agir 30 secondes à une minute
- Ajouter le lugol et le laisser agir 20 secondes ; Rincer avec l'eau distillée
- Verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement, et surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Rincer sous un filet d'eau distillée.
- Recolorer à la fuchsine. Laisser agir pendant 30 secondes pendant 1 minute. Laver avec l'eau distillée. Sécher la lame
- Observer la coloration des bactéries au microscope

**ANNEXE 4 : Lecture des résultats du système d'identification « Api 20 Strep » selon Bio Mérieux**

Tests	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS			
				NEGATIF		POSITIF	
<b>VP</b>	Sodium pyruvate	1.9	Production d'actoïne (vagues Proskauer)	VP1+ VP2/ jusqu'à 2min (3)			
				Incolore		Rose-rouge	
<b>HIP</b>	Acide hippurique	0.4	Hydrolyse (acide HIPpurique)	NIN/ jusqu'à 10min			
				Incolore/Bleu pâle/Gris-bleuté		Bleu foncé/ Violet	
<b>ESC</b>	Esculine Citrate de fer	0.16 0.152	Hydrolyse $\beta$ -glucosidase (ESCuline)	4h	24h	4h	24h
				Incolore/ jaune pâle	Incolore/ jaune pâle/ Gris clair	Noir/ Gris	Noir
<b>PYRA</b>	Acidepyroglucotamique- $\beta$ -naphtylamide	0.0256	PYRrolidonyl Arylamidase	ZIM A +ZIM B/10min (PYR a LAP) (1) au besoin décoloré par éclaircissement intense			
				Incolore ou orange très pâle		Orange	
<b><math>\alpha</math>-GAL</b>	6-bromo-2-naphtyl $\alpha$ D-galactopyranoside	0.0376	$\alpha$ -GALactosidase	Incolore		Violet	
<b><math>\beta</math>-GUR</b>	Acide naphtol-ASBI-glucuronique	0.0537	$\beta$ -GURcuRonidase	Incolore		Bleu	
<b><math>\beta</math>-GAL</b>	2-naphtyl $\beta$ D-galactopyranoside	0.0306	$\beta$ -GALactosidase	Incolore ou violet très pâle		Violet	
<b>PAL</b>	2-naphtyl phosphate	0.244	Phosphatase ALcaline	Incolore ou violet très pâle		Violet	
<b>LAP</b>	L-leucine $\beta$ -naphtylamide	0.0256	Leucine AminoPeptidase	Incolore		Orange	
<b>ADH</b>	L-arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	Jaune		Rouge	
<b>RIB</b>	D-ribose	1.4	Acidification(RIBose)	4h	24h	4h	24h
				Rouge	Orange/ rouge	Orange/ jaune	Jaune
<b>ARA</b>	L-arabinose	1.4	Acidification(ARAbinose)	Rouge	Orange/ rouge	Orange/ jaune	Jaune
<b>MAN</b>	D-mannitol	1.36	Acidification(MANnitrol)	Rouge	Orange/ rouge	Orange/ jaune	Jaune
<b>SOR</b>	D-sorbitol	1.36	Acidification(SORbitol)	Rouge	Orange/ rouge	Orange/ jaune	Jaune
<b>LAC</b>	D-lactose (Origine bovine)	1.4	Acidification (LACTose)	Rouge	Orange/ rouge	Orange/ jaune	Jaune
<b>TRE</b>	D-tréhalose	1.32	Acidification (TREhalose)	Rouge	Orange/ rouge	Orange/ jaune	Jaune
<b>INU</b>	Inuline	5.12	Acidification (INUline)	Rouge	Orange/ rouge	Orange/ jaune	Jaune
<b>RAF</b>	D-raffinose	3.12	Acidification (RAFFinose)	Rouge	Orange/ rouge	Orange/ jaune	Jaune
<b>AMD</b>	Amidon (2)	2.56	Acidification (AMiDon)	Rouge	Orange/ rouge	Orange/ jaune	Jaune
<b>GLYG</b>	Glycogène	1.28	Acidification (GLYcoGène)	Rouge ou orange		Jaune franc	

## **ANNEXE 5 : Extraction d'ADN par le Mini kit**

### **Préparation du lysat :**

- 1- Préparer deux bains d'eau à 37°C et 55°C.
- 2- Préparer le lysozyme digestion buffer (25mM Tris HCl, pH=8, 2.5mM EDTA, 1% triton x-100)  $\approx$  200 $\mu$ l/échantillon.  
  
Ajouter le lysozyme frais pour obtenir une concentration finale du lysozyme égale à 20 mg/ml.
- 3- Centrifuger jusqu'à l'obtention de  $2 \times 10^9$  de bactéries gram+.
- 4- Remettre le culot cellulaire en suspension dans 180  $\mu$ l de lysozyme digestion buffer contenant le lysozyme de l'étape 2. Bien mélanger par bref vortex.
- 5- Incuber à 37°C pendant 30 min.
- 6- Ajouter 20  $\mu$ l de protéinase K et mélanger par des brefs vortex.
- 7- Ajouter 200  $\mu$ l de pure link genomic lysis/ binding buffer et mélanger par brefs vortex.
- 8- Incuber à 55°C pendant 30 min.
- 9- Ajouter 200  $\mu$ l de l'éthanol 96% -100% au lysat. Bien mélanger par le vortex pendant 5s pour obtenir une solution homogène.

### **Liaison d'ADN :**

- 1- Mettre la colonne de centrifugation pure link dans le tube de collecte.
- 2- Ajouter le lysis/binding buffer et l'éthanol au lysat ( $\approx$  640  $\mu$ l).
- 3- Centrifuger la colonne à 10 000g pendant 1min à température ambiante.
- 4- Jeter les tubes de collectes et placer les colonnes de centrifugation dans des nouveaux tubes de collecte.

### **Lavage d'ADN :**

- 1- Laver la colonne avec 500  $\mu$ l de wash baffle 1.
- 2- Centrifuger la colonne à 10 000g pendant 1min à température ambiante. Jeter les tubes de collecte et placer les colonnes dans des nouveaux tubes.
- 3- Ajouter 500  $\mu$ l de wash baffle 2 aux colonnes.

4- Centrifuger la colonne à la vitesse maximale pendant 3min à température ambiante.

**Elution d'ADN :**

1- Placer les colonnes de centrifugation dans les microtubes stériles (1,5ml).

2- Diluer l'ADN avec 25-200  $\mu$ l de pure link genomic elution buffer.

3- Incuber la colonne à température ambiante pendant 1min.

4- Centrifuger les colonnes à la vitesse maximale pendant 1min à température ambiante (les tubes contenant l'ADN purifié).

5- Conservation à 4°C pour le court terme et à -20°C pour le long terme.

## **ANNEXE 6 : Protocole expérimental de la purification enzymatique et du séquençage**

### **A/ Purification par EXOSAP**

#### **1- Principe**

L'Exonucléase I agit par son activité exonucléasique pour éliminer les amorces en excès. Elle permet de dégrader tout fragment d'ADN simple brin inférieur à 100 pb.

La phosphatase Alcaline (SAP) permet d'enlever le groupement phosphate de l'extrémité 5' des dNTP et empêche ainsi leurs incorporation dans l'ADN en cours de synthèse.

La purification enzymatique fait par deux incubations successives :

- Une incubation à 37°C pendant 20 minutes durant laquelle agissent les enzymes.
- Une incubation à 85°C pendant 20 minutes pour dénaturer les enzymes.

Le produit de PCR est ensuite prêt à l'emploi comme matrice pour la réaction de séquence.

#### **2- Matériel et réactifs**

- Thermocycleur
- TubesPCR stériles de 0.2 ml
- Pipettes P10 ET P2 ainsi que les cônes adaptés
- Exonucléase I (10 units/ µl)
- Phosphatase Alcaline Shrimp (SAP, 1 units/ µl)
- Tampon 10X de la SAP (200 mM Tris pH=8, 100 mM MgCl<sub>2</sub>)

#### **3- Mode opératoire**

De préférence la purification se fait le jour même de la réaction de séquence éviter de congeler le produit purifié.

Les produits de PCR sont contrôlés et quantifiés sur un gel d'agarose.

#### **Préparation du Mix de purification :**

Dans un tube eppendorf de 0.2 ml, préparer un volume de Mix suffisant pour n+2 échantillons selon le tableau suivant :

Réactifs	Volume/ échantillon (µl)	Volume/ n échantillon (µl)
H <sub>2</sub> O	5	X
Tampon SAP 10X	0.5	X
SAP (1 units/µl)	1	X
Exonucléase I (10 units/µl)	0.5	X

Numéroter n tubes eppendorf de 0.2 ml pour PCR

Distribuer 7 µl de Mix de purification dans les tubes

Ajouter un vlume de produit de PCR à purifier, correspondant à 30 ng d'ADN (3 à 10 µl)

Incuber dans le thermocycleur selon le programme suivant :

<b>Température</b>	37 °C	85 °C	+4 °C
<b>Durée</b>	20 min	20 min	infini

Utiliser un volume correspondant à 10ng d'ADN pour effectuer la réaction de séquence.

De préférence la purification se fait le jour de la réaction de séquence. Si non, éviter de congeler le produit de PCR purifié car il y'a risque de dégradation de l'ADN purifié et formation de fragments simple brins susceptibles d'agir comme amorces pour la réaction de séquence.

## **B/ Réaction de séquençage en plaque 96 puits- Recommandations**

### **1- Réactifs et produits**

- ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit version 3.1 (Applied Biosystems réf. 337456, magasin general réf. 99219)
- Ou version 1.1 (Applied Biosystems réf. 43374510, magasin general réf. 98150) à stocker à -20 °C.
- Tampon 5X (fourni avec le kit version 3.1, applied Biosystems) à stoker à + 4°C
- Plaque 96 puits (ABgene ref. AB11000, magasin général ref. 42741) ou 4titude Durtscher (Dustscher réf. 044754)
- H<sub>2</sub>O filtrée type MilliQ Synthesis (Millipore)
- Ethanol absolu

- Acétate de sodium 3M pH 5.2
- EDTA 125Mm pH 8

### Recommandations

- Il est impératif de mettre les échantillons en colonnes (de A1 à H1 et ensuite de A2 à H2...) et non en ligne.
- Ecrire sur la tranche de la plaque la référence et la version de la chimie utilisée (v1.1 ou v3.1)
- Vérifier les quantités et la qualité des matrices par une mesure des absorbances (DO 260, DO 280, DO 230) et par un dépôt et migration sur gel d'agarose

## 2- Protocoles

### 2.1 Protocoles pour les réactions de séquence : ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready –version 3.1 ou version 1.1

Ces protocoles sont standardisés et peuvent être adaptés au besoin après le résultat d'un premier passage sur le séquenceur :

Type de matrice	Quantité nécessaire
<b>Produit PCR</b> 200- 500 bp 500- 1000 bp 1000- 2000 bp 2000 bp <	8- 10 ng 15- 20 ng 10- 40 ng 30- 50 ng
<b>ADN Plasmidique</b> De 4.5 à 8 kb +/- 15 kb	75- 150 ng 200 à 500 ng
Cosmide, fosmide (+/- 40 kb)	0.5- 1.0 µg
BAC	1.5 à 2 µg
ADN génome bactérien	2- 3 µg

Mélange réactionnel pour une réaction de séquence dans un volume final de 10 µl :

Réactifs	Produits PCR 200-500 pb	Produits PCR 500-1000 pb	Produits PCR 1000 pb <	ADN plasmidique
Amorce à 4 µM	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
ABI Prism solution version 3.1 ou 1.1	0.5 µl	0.8 µl	1 µl	1 µl
Tampon 5X	2 µl	2 µl	2.5 µl	2 µl
Matrice	<i>cf</i> tableau sus- cité	<i>cf</i> tableau sus- cité	<i>cf</i> tableau sus- cité	<i>cf</i> tableau sus- cité
H <sub>2</sub> O	qsp 10 µl	qsp 10 µl	qsp 10 µl	qsp 10 µl

Ne jamais mettre plus que 1 µl d'ABI Prism solution

Mélange réactionnel pour une réaction de séquence dans un volume final de 20 µl :

Réactifs	Fosmide/ Cosmide	ADN BAC
Tampon 5X	3.5 µl	3.5 µl
ABI Prism solution version 3.1 ou 1.1	2 µl	2 µl
Amorce à 10 µM	1 µl	1 µl
Matrice	<i>cf</i> tableau sous- cité	<i>cf</i> tableau sous- cité
H <sub>2</sub> O	qsp 20 µl	qsp 20 µl

Ne jamais mettre plus que 1 µl d'ABI Prism solution

- **Programme utilisé pour une machine GeneAmp 9700 :**

Pour des réactions de séquences à partir de produits PCR et ADN plasmidique :

96°C 1 min

96°C 10 sec }

50°C 5 sec 25 à 35 cycles }

60°C 4 min }

Pour des réactions de séquences à partir de matrices Cosmide, fosmide, BAC :

98°C 2 min

95°C 20 sec }

53°C 10 sec } 50 cycles

60°C 3 min }

72°C -15C 5 min

Et dans les deux cas :

15°C for ever

Conserver la plaque à 4°C ou à -20°C

## **2.2 Elimination de l'excès des réactifs de séquençage par précipitation éthanol**

- Ajouter 1 µl d'acétate de sodium 3M, 1 µl d'EDTA 125mM et 50 µl d'éthanol 95% dans chaque puits.
- Retourner la plaque plusieurs fois et laisser 15 minutes sur la paillasse.
- Centrifuger pendant 30 minutes rpm à 15°C.
- Jeter le surnageant.
- Centrifuger la plaque à l'envers posée sur du papier absorbant à 1000 rpm pendant 1 minute (éliminer les traces résiduelles d'éthanol).
- Ajouter 50 µl d'éthanol 70%.
- Centrifuger pendant 15 minutes à 3300 rpm à 15°C.
- Jeter le surnageant.
- Centrifuger la plaque à l'envers posée sur du papier absorbant à 1000 rpm pendant 1 minute (éliminer les traces résiduelles d'éthanol).
- Laisser sécher à l'air libre sur la paillasse 15 minutes.
- Conserver la plaque à -20°C avant le chargement sur les séquenceurs à capillaires.

## ANNEXE 7 : Préparation des réactifs et tampon pour le champ pulsé

**Tampon TN** : (1M Nacl, 10mM tris-cl)

- Nacl : PM=58.44g/mol ; Solution de stock de 5M dans 100ml (29.22g dans l'eau ultrapure)

- Tris-cl : PM=157.6g g/mol; Solution de stock de 1M (31.52g dans 200 ml d'eau ultrapure à ph= 8)

Pour préparer 100 ml du tampon TN : prendre 20 ml de Nacl (5M) + 1ml de Tris-cl (1M) pour une qsp 100 ml.

**Agarose incert** :

0.8g d'agarose low melting dans le tampon TN (agarose incert à 2% en tampon TN)

**Gel d'agarose**

1.2g d'agarose ultrapure grade ECP dans 120 ml (1%) de TBE 0.5x concentré (préparer a partir de TBE 10x)

**Tampon EC** : 6mM Tris-cl, 1M Nacl, 10mM EDTA, 0.5% Brij, 0.5% sarcosine, 0.2% désoxycholate de sodium)

-EDTA : PM= 372.2g/mol, solution de stock de 0.5M (37.22g dans 200ml d'eau ultrapure à ph=8)

- Tris-cl : 157.6g/mol, solution de stockde 1M (31.52g dans 200ml d'eau ultrapure à ph=8)

- Nacl : PM=58.44g/mol, Solution de stock 5MQ DANS 100ML 529.22g dans l'eau ultrapure)

-Sarcosine : Solution de stock de 5% (5g dans 100ml d'eau ultrapure)

- Brij 58 : Solution de stock de 5% (5g dans 100ml d'eau ultrapure)

- Désoxycholate de sodium : Solution de stock de 5% (5g dans 100ml d'eau ultrapure)

Pour préparer 200 ml du tampon EC de stock : ajouter 1.2ml de Tris-cl (1M), 40ml de Nacl (5M), 40ml d'EDTA (0.5M), 20 ml de brij (5%), 20ml de sarcosine (5%), 8ml de desoxycholate de sodium (5%) qsp 200 ml

Le tampon EC contient une mutanolysine à 5U/ml de lysozyme à 1mg/ml ajoutés extratemporanément lors de l'ajout des blocs d'agarose à ph=8

**Tampon ESP** : 0.5M EDTA, 1% de sarcosine et 1mg/ml de protéinase K

- EDTA : PM=372.2g/mol ; Solution de stock de 1M (74.44g dans 200ml d'eau ultrapure à ph=8)

- Sarcosine : solution de stock de 5% (5g dans 100 ml d'eau ultrapure)

Pour préparer 200ml de tampon ESP : ajouter 100 ml d'EDTA (1M) + 40 ml de sarcosine qsp 200 ml à ph=8.

Le tampon ESP contient de la protéinase K ajoutée extratemporanément lors de l'ajout des blocs d'agarose à ph=8

**Tampon TE** : 10 mM Tris-cl, 1mM d'EDTA à ph=8

- EDTA : PM : 372.2g/mol solution de stock de 0.5M (37.22g dans 200ml d'eau untrapure à ph=8)

- Tris-cl : PM : 157.6g/mol; Solution de stock 1M (31.52 g dans 200ml d'eau ultrapure à ph=8)

Pour préparer 200ml de tampon TE de stock : ajouter 2ml de Tris-cl (1M), 0.4 ml d'EDTA qsp 200ml à ph=8.

**Tampon de migration** : TBE 0.5x

-Diluer le tampon TBE commercialisé 10x à 1/20 dans l'eau ultrapure

- Pour préparer 4l de stock de TBE 0.5x : ajouter 200ml de TBE 10x plus 3800 ml d'eau ultrapure (qsp = 4000 ml)

## ANNEXE8 : résultats du séquençage de l'ARNr 16S des entérocoques

### *E. faecalis*

#### *E. faecalis* 221 (6)

TCAGACGAACCGGGCGGCGTGCCTATACATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACCTC  
AATTGGAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGGATAACACTT  
GGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTTCGGGTGT  
CGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATA  
GCCGACCTGAGAGGGTGCATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
AGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCG  
TAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACAGAA  
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGG  
CGTAAAGCGGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTG  
GAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA  
TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAG  
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCC  
CTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGAGACCCTGGTTGG

#### *E. faecalis* 23 (15)

GGCATGGCGCGTGCTATCTGCAGTCGACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACCTCAATTGGAAAAGAGGA  
GTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAAACAGGTGCT  
AATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTTCGGGTGTGCTGATGGATGG  
ACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGAGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAG  
GGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGG  
CAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTG  
TTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAAC  
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCG  
CAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGAC  
TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCA  
GTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG  
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCA  
GCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAGGGAATTGACGGGGGC  
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTGCAAGCAACCGCAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCT  
TTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTACAGGTTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCT  
CGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTT  
GGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT  
TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTGCCTAGACCCGAGGTCATGCAAAAT  
CTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAAT  
CGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCAGAGAGTT  
TGTAACACCCGAAGTCCGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGTGATCAAT

#### *E. faecalis* 141L (18)

CGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACCTCAATTGGAAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG  
TAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCAT  
GGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTTCGGGTGTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGA  
GGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGCATCGGCCACACTGGGACTGAGAC  
ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGGACCAAC  
GCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAAC  
TGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT  
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAA  
AGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTT  
CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTA  
ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG  
ATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGG  
GAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTT  
AATTCGAAGCAACCGCAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCC

CTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC  
 CGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGGAGACTGCCGGTGAC  
 AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA  
 ATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATT  
 GCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATAC  
 GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAAC  
 C

*E. faecalis* 14IL TE (19)

CGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCCTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG  
 TAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCAT  
 GGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGA  
 GGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC  
 ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGAGCAAC  
 GCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAAC  
 TGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT  
 AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAAGTCTGATGTGAA  
 AGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAAT  
 CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTA  
 ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACG  
 ATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGG  
 GAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT  
 AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCC  
 CTTCCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC  
 CGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGGAGACTGCCGGTGAC  
 AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA  
 ATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATT  
 GCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATAC  
 GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAAC  
 C

*E. faecalis* 33Z (24)

ACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCCTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG  
 GTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCA  
 TGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTG  
 AGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA  
 CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGAGCAA  
 CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAA  
 CTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
 TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAAGTCTGATGTGA  
 AAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAAT  
 TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGT  
 AACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAC  
 GATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCTGG  
 GGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT  
 TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTC  
 CCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTC  
 CCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGGAGACTGCCGGTGA  
 CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC  
 AATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGAT  
 TGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATA  
 CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAA  
 CCTT

*E. faecalis* 33Z TE (26)

ACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCCTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG  
 GTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCA  
 TGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTTCGGGTGTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTG  
 AGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA  
 CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAA  
 CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAA  
 CTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
 TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGA  
 AAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAAT  
 TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGT  
 AACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAC  
 GATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGG  
 GGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT  
 TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTC  
 CCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTC  
 CCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGA  
 CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC  
 AATGGGAAGTACAACGAGTGCCTAGACCCGCGAGGTGCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGGAT  
 TGCAGGCTGCAACTCGCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATA  
 CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAA  
 CCTT

*E. faecalis* 33Z KAN (27)

ACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCCTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG  
 GTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCA  
 TGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTTCGGGTGTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTG  
 AGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA  
 CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAA  
 CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAA  
 CTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
 TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGA  
 AAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAAT  
 TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGT  
 AACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAC  
 GATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGG  
 GGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT  
 TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTC  
 CCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTC  
 CCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGA  
 CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC  
 AATGGGAAGTACAACGAGTGCCTAGACCCGCGAGGTGCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGGAT  
 TGCAGGCTGCAACTCGCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATA  
 CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAA  
 CC

*E. faecalis* 14L1E (31)

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTGAACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCCTCA  
 ATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACACTT  
 GGAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTTCGGGTGT  
 CGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGAGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATA  
 GCCGACTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
 AGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACCGCGGTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCG  
 TAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACGTAACGTCCTTACCGGTATCTAACCAGAA  
 AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGG  
 CGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTG  
 GAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA  
 TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAG

CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCC  
 CTTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAG  
 AATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAG  
 GTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATG  
 GTTGTGCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTG  
 CCATCATTAGTTGGGCACCTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAA  
 TCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCG  
 AGGTCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGG  
 AATCGCTAGTAATCGCGGATCACACGCCCGGTGAAGAAAATTTCCCGGGCCCTGTACACCCGCCCGTC  
 ACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGA  
 TAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAA

### *E. faecalis* 50L (34)

GAGTTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCC  
 TCCCGAGTGCTTGCCTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCA  
 TCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGT  
 GAAAGGCGCTTTCCGGTGTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTC  
 ACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGCATCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC  
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGT  
 GAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACGTAACGTCCCC  
 TGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGTTGGCAAGC  
 GTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCT  
 CAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGC  
 GGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTAACGCTGA  
 GGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAA  
 GTGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCG  
 CAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCA  
 ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACA  
 AAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTCAGTTCGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG  
 CAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCCGGAGGA  
 AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTAC  
 AACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTGCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTTCGGATTGCAGGCTGCAA  
 CTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC  
 TTGTACACACCCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGC  
 CAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGATTGGGGGTGAAGTCGTAACAAG

### *E. faecalis* 11 (37)

GGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA  
 TATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGACTGACGCTGAGGCTCGAAAAGCGTGGGG  
 AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCG  
 CCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAA  
 GGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACC  
 AGGTCCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGC  
 TGCCATCATTAGTTGGGCACCTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA  
 AATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCG  
 CGAGGTCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCC  
 GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCCTGTACACACCCGCCG  
 CACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTT

### *E. faecalis* 21 (38)

GTGCTTTAAAGCTTACAATAATGCAAGTCGACGCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCCTCAATTGGAAAG  
 AGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGG  
 TGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCCGGTGTGCTGATGG  
 ATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTG  
 AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT  
 TCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAACCTCT  
 GTTGTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACGTAACGTCCTGACGGTATCTAACCAGAAAAGCCACGGC

TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCG  
 AGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGG  
 AGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAA  
 CACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG  
 ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTG  
 CTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACG  
 GGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC  
 ATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCTTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTTCGT  
 CAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCAT  
 TAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG  
 CCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGGAGGTCATG  
 CAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAAATCGCTA  
 GTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGA  
 GAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGATT  
 GGGGTGAAGTCGTATCAAGGAAGTCAGCCC

#### *E. faecalis* 71 (41)

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCA  
 ATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGGATAACACTT  
 GGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGT  
 CGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATA  
 GCCGACCTGAGAGGGTGCATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
 AGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCG  
 TAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAA  
 AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGG

#### *E. faecalis* 31Z (44)

GGAGTGGGGTCTATAATGCAGTCGACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAAGAGGAG  
 TGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTA  
 ATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTTCGCTGATGGATGGA  
 CCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGG  
 GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGC  
 AATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGT  
 TAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACT  
 ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC  
 AGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACT  
 TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAAACACCAG  
 TGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA  
 TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGCTGCAG  
 CAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  
 CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTT  
 TGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCTTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTTCGTGAGCTC  
 GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTG  
 GGCACCTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT  
 ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGGAGGTCATGCAAAATC  
 TCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAAATCGCTAGTAATC  
 GCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTT  
 GTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGAGCCAGCCGCTAAGTGATGATTG

#### *E. faecalis* 37Z (50)

GCCCTTACCATTCTATAATGCAGTCGACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAAGAGGA  
 GTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCT  
 AATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTTCGCTGATGGATGG  
 ACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAG  
 GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGG  
 CAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTG  
 TTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAAC  
 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCG

CAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGAC  
 TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCA  
 GTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG  
 ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCA  
 GCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATGACGGGGGC  
 CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCT  
 TTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCT  
 CGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTT  
 GGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCT  
 TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCATGCAAAT  
 CTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAAT  
 CGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTT  
 TGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGATTGGGGG  
 AAGTCGCAAGAGAGCAACTA

### *E. faecalis* 221 (53)

TAACACATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAAGAGGAGTGGCGGAC  
 GGGTGTAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCA  
 TAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCTGCTGATGGATGGACCGCGGT  
 GCATTAGCTAGTTGGTGTAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG  
 CCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACG  
 AAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAG  
 AACAAGGACGTTAGTAAGTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA  
 GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAAGCGAGCGCAGGCGGTT  
 TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGC  
 AGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAA  
 GCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTG  
 GTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGC  
 ATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATGACGGGGGCCGCACAA  
 GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCCTTGACATCCTTTGACCAC  
 TCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTG  
 GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTC  
 TAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT  
 GGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCATGCAAATCTCTTAAA  
 GCTTCTCTCAGTTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC  
 AGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT

### *E. faecalis* 28 (54)

GGAGTGGGGTCTATAATGCAGTCGACGCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAAGAGGAG  
 TGGCGGACGGGTGTAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTA  
 ATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCTGCTGATGGATGGA  
 CCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGTAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGG  
 GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGC  
 AATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGT  
 TAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAAGTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCCAGAAAAGCCACGGCTAACT  
 ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAAGCGAGCGC  
 AGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACT  
 TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAG  
 TGGCGAAGCGGCTCTCTGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA  
 TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAG  
 CAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATGACGGGGGCC  
 CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCCTTGACATCCTT  
 TGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTC  
 GTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTG  
 GGCCTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT  
 ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCATGCAAATC  
 TCTTAAAGCTTCTCTCAGTTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATC  
 GCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTT  
 GTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGTGATGATTG

*E. faecalis* 35 (55)

GACCCTTGCGGGTCTATACATGCAAGTCGACGCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAAGA  
 GGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGGATAAACTTGGAAACAGGT  
 GCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGA  
 TGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGA  
 GAGGGTGCATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT  
 CGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTG  
 TTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAAGCCACGGCT  
 AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAAGCGA  
 GCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAAACCTGGGA  
 GACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACA  
 CCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT  
 TAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTCAGTGCT  
 GCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG  
 GGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACCGGAAGAACCCTACCAGGCTTGCAT  
 CCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC  
 GCTCGTGTGTCGATGAGTGTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTA  
 GTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC  
 CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCATGCA  
 AATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGT  
 AATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCAGGCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGA  
 GTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGATTGG  
 GGTGAAGTCGAACAAGGATGCGTAGGC

*E. faecalis* 3 (57)

CAGGACGAACGCTGGCGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCACT  
 CAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGGATAACAC  
 TTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGT  
 GTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCA  
 TAGCCGACCT3GAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
 GTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGAT  
 CGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAG  
 AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTG  
 GCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAT  
 TGGAAAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA  
 TATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGCCTGGGG  
 AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTTTCCG  
 CCCTTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAA  
 GGAATTGACGGGGGCGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACCGGAAGAACCCTTACC  
 AGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAAGTGACAGGTGGTGC  
 TGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGATGAGTGTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGT  
 TGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA  
 AATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCG  
 CGAGGTCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCC  
 GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCAGGCTTGTACACACCGCCC  
 GTCACACCACGAGAGTTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTG  
 GGATAGATGATTGGGGTGAATC

*E. faecalis* 4 (58)

TCAGACGAACGCGGGCGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCACTC  
 AATTGGAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGGATAAACTT  
 GGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTG  
 CGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATA  
 GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT

AGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCG  
 TAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAA  
 AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGG  
 CGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTG  
 GAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA  
 TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAAGCGTGGGGAG  
 CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCC  
 CTTAGTGTGTCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGAGACCCCTGGTTGG

### *E. faecalis* 51Z (59)

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTGAACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCA  
 CTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGGATAAC  
 ACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTTCGG  
 GTGTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATG  
 CATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  
 CAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGG  
 ATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACC  
 AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTAT  
 TGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTC  
 ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA  
 TATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAAGCGTGG  
 GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTTC  
 CGCCCTTCAGTGTGTCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCACAAGGTTGAAACTCA  
 AAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCCTTA  
 CCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAAGTGACAGGTGGTG  
 CATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTA  
 GTTGCCATCATTAGTTGGGCACCTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT  
 CAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGAC  
 CGCGAGGTCAATGCAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAG  
 CCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC  
 GTCACACCACGAGAGTTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTG  
 GGATAGATGATTGGG

### *E. faecalis* 161L2 (65)

CCACCTCGGGGGATAGTAGCCTGTAATGCAGTGAACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTG  
 GAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAA  
 ACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTTCGGGTGTCGCT  
 GATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCG  
 ACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG  
 AATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAA  
 ACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCC  
 ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTA  
 AAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAA  
 CTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGG  
 AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCTA

### *E. faecalis* 20I (67)

TCAGACGAACCGGGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTGAACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACTC  
 AATTGGAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGGATAACACTT  
 GGAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTTCGGGTGT  
 CGTGTAGTGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATA  
 GCCGACTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
 AGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCG  
 TAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAA  
 AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGG  
 CGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTG  
 GAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA  
 TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCTA

CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCC  
CTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGAGACCCTGGTTGG

*E. faecalis* 16 (87)

GTGCTTTAAAGCTTACAATAATGCAAGTCGACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAG  
AGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGG  
TGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGG  
ATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTG  
AGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT  
TCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCT  
GTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACCTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGC  
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCG  
AGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACCTGGG  
AGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAA  
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG  
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTG  
CTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACG  
GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGCTTTGAC  
ATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTTCGT  
CAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT  
TAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG  
CCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCATG  
CAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTA  
GTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGA  
GAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGATT  
GGGGTGAAGTCGTATCAAGGAAGTCAGCCC

*E. faecalis* 112L1 (91)

TAAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAG  
AAGAGGAGAGTGGAAATTTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAG  
GCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG  
TAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCAAACGCA  
TTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAG  
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCCTTTGACCACT  
CTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTTCGTGACGCTCGTGTTCGTG  
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCT  
AGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG  
GGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCATGCAAATCTCTTAAAG  
CTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA  
GCACGCCGCGGTGAATACGTTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAACACC  
CGAAGTCGGTGAGGTAACCTTT

*E. faecalis* 22 (97)

GGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA  
TATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAAGCGTGGGG  
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCG  
CCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAA  
GGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACC  
AGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCA  
TGTTGTTCGTGACGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGT  
TGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTTAGCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA  
AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGCTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCC  
CGAGGTATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCC  
GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT  
CACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTT

*E. faecalis* 178 (100)

GCCCTTACCATTCTATAATGCAGTCGACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGA  
 GTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGAAACAGGTGCT  
 AATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGG  
 ACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAG  
 GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCG  
 CAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAACTCTGTTG  
 TTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC  
 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCG  
 CAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGAC  
 TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCA  
 GTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAG  
 ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTCAGTGTGCA  
 GCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGC  
 CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCT  
 TTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTCAGCT  
 CGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTT  
 GGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCT  
 TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTGCATGCAAT  
 CTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAAT  
 CGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTT  
 TGTAACACCCGAAGTCCGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGATTTGGGG  
 AAGTCGCAAGAGAGCAACTA

*E. faecalis* 29Z (104)

GCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA  
 ACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGG  
 CATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGG  
 TAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC  
 GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGC  
 CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTG  
 AACGTCCTCCTGACGTTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG  
 GTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG  
 CCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTC  
 ATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAC  
 TGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT  
 GAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGA  
 GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAA  
 TTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCT  
 TCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTGAGTCTGTCGTCGTCGATGTTGGGTTAAGTCCC  
 CAACGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGTTGACAA  
 ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT  
 GGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTGCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGGATTGC  
 AGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATC

*E. faecalis* 34Z (107)

GGCCCGTGCGGCGTGCCTAATAATGCAAGTCGACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAA  
 AGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGAAACA  
 GGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGAT  
 GGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACC  
 TGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT  
 CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACCGCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAACT  
 CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGACGCTGCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACG  
 GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAG  
 CGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTG  
 GGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGA  
 ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAACAG  
 GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTCAGT

GCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAC  
 GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGA  
 CATCCTTTGACCCTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCG  
 TCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCTTATTGTTAGTTGCCATCAT  
 TTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT  
 GCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCAT  
 GCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCTGCATGAAGCCGGAATCGCT  
 AGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCAG  
 AGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGAT  
 TGGGGGAAGTCGTAACAATGATGCCAAATA

### *E. faecalis* 35Z (108)

TGAGGGCGCATGCTATAACATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCCTCAATTGGAAAGA  
 GGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACACTTGGAAACAGGT  
 GCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGA  
 TGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGA  
 GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT  
 CGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTG  
 TTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCT  
 AACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGA  
 GCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGA  
 GACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACA  
 CCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT  
 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCT  
 GCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG  
 GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT  
 CCTTTGACCCTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCA  
 GCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTA  
 GTTGGGCACTCTAGCGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC  
 CTTTATGACCTTAGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCCGAGGTCATGCA  
 AATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGT  
 AATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA  
 GTTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGATTGG  
 GGTGAAGTCGTAACAAGAGCGAGCC

### *E. faecalis* 36Z (119)

TAGGTTAGGCTGCTATAATGCAGTCGACGCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCCTCAATTGGAAAGAGGA  
 GTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACACTTGGAAACAGGTGCT  
 AATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGG  
 ACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAG  
 GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGG  
 CAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTG  
 TTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAAC  
 TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCG  
 CAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGAC  
 TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCA  
 GTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG  
 ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCA  
 GCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC  
 CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCT  
 TTGACCCTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCT  
 CGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCT  
 GGGCACTCTAGCGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCT  
 TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCCGAGGTCATGCAAAAT  
 CTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAAT  
 CGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTT  
 GTAAACCCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGATTGGGGT  
 GAAGTCGTACTTGTGCTCAGC

*E. faecalis* 67L (122)

CGCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCCTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG  
 TAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCAT  
 GGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTTCGGGTGTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGA  
 GGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGCATCGGCCACACTGGGACTGAGAC  
 ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAAC  
 GCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAAC  
 TGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT  
 AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA  
 AGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAAT  
 CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTA  
 ACTGACCGTGAAGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC  
 ATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGG  
 GAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTT  
 AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCC  
 CTTCCGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCC  
 CGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGAC  
 AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA  
 ATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTGCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATT  
 GCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATAC  
 GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAAC  
 C

*E. faecalis* 14L1 (123)

TCATGCAGCTCTATCTGCAGTCGACGCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCCTCAATTGGAAAGAGGAGTG  
 GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAAT  
 ACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTTCGGGTGTGCTGATGGATGGACC  
 CGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGT  
 GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAA  
 TGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTA  
 GAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACGAACGTCACCGTACCGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTAC  
 GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG  
 GCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAGACTTG  
 AGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTG  
 GCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGGCTCGAAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATA  
 CCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGCTGCAGCA  
 AACGCATTAAGCACTCCGCCGTTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG  
 CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTG  
 ACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTGAGTCTGT  
 GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGG  
 CACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTAT  
 GACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTGCATGCAAACTC  
 TTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGC  
 GGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGT  
 AACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGATGGGTGAAGT  
 CTAGACATTGTG

*E. faecalis* 106 (1)

GGAGTGGGGGTCTATAATGCAGTCGACGCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCCTCAATTGGAAAGAGGAG  
 TGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTA  
 ATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTTCGGGTGTGCTGATGGATGGA  
 CCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAG  
 GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGC  
 AATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGT  
 TAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACGAACGTCACCGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACT  
 ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC  
 AGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAGACT  
 TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAG

TGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA  
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAG  
CAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTT  
TGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC  
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTG  
GGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT  
ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCCGCGAGGTTCATGCAAATC  
TCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATC  
GCGGATCAGCACGCCCGGTTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTCACACCAGAGATTT  
GTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGAGCCAGCCGCTAAGTGATGATTG

### *E. faecalis* 25L2 (10)

TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA  
CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAA  
GTCTGACCGAGCAACGCCCGGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAAC  
AAGGACGTTAGTAACCTGAACGTCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA  
GCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCT  
TAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAA  
GAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG  
GCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAG  
TCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTA  
AGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG  
TGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTA  
GAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGA  
TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGC  
GAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC  
TACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCCGCGAGGTTCATGCAAATCTCTTAAAGCTT  
CTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA  
CGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCC

### *E. faecalis* 24E (28)

GGGGGCGGCTCTATAATGCAGTCGACGCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCACCTCAATTGGAAAAGAGGAG  
TGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTA  
ATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGA  
CCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGG  
GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGC  
AATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCCGGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGT  
TAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACCTGAACGTCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT  
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC  
AGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAGACT  
TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAG  
TGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA  
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAG  
CAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTT  
TGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC  
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTG  
GGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT  
ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCCGCGAGGTTCATGCAAATC  
TCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATC  
GCGGATCAGCACGCCCGGTTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTCACACCAGAGATTT  
GTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGAGCCAGCCGCTAAGGTGGAATTTGT

*E. faecalis* 44Z (36)

GGGGGCGGCGTCTATAATGCAGTCGACGCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAAGAGGAG  
 TGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGGATAAACTTGGAAACAGGTGCTA  
 ATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCCGGGTGTCGCTGATGGATGGA  
 CCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGG  
 GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGC  
 AATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAACTCTGTTGT  
 TAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACT  
 ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC  
 AGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACT  
 TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAG  
 TGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATFAGA  
 TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTCAGTGTGCAG  
 CAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  
 CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTT  
 TGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCCGGGACAAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTTCGTCAGCTC  
 GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTG  
 GGCCTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT  
 ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGGAGGTGCATGCAAATC  
 TCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATC  
 GCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTT  
 GTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGAATTTGT

*E. faecalis* 31L (46)

TGCAAGTCGAACGCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAAGGAGTGCGGACGGGTGAGT  
 AACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGGATAAACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTT  
 TATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGC  
 TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG  
 GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTG  
 ACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGA  
 CGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC  
 GGTAAACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGT  
 CTGATGTGAAAGCCCCCGCTCACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAG  
 AGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGCCGAAGGCGGCT

*E. faecalis* 28I (48)

GGGGGCGGCGTCTATAATGCAGTCGACGCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAAGAGGAG  
 TGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGGATAAACTTGGAAACAGGTGCTA  
 ATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCCGGGTGTCGCTGATGGATGGA  
 CCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGG  
 GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGC  
 AATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAACTCTGTTGT  
 TAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACT  
 ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC  
 AGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACT  
 TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAG  
 TGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATFAGA  
 TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTCAGTGTGCAG  
 CAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  
 CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTT  
 TGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCCGGGACAAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTTCGTCAGCTC  
 GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTG  
 GCACTCTAGCAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT  
 ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGGAGGTGCATGCAAATC  
 TCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATC  
 GCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTT  
 GTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGAATTTGT

*E. faecalis* 94 (49)

GGCCCGTGC GCGCTGCCTAATAATGCAAGTCGACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGC ACTCAATTGGAA  
 AGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACA  
 GGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGAT  
 GGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACC  
 TGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT  
 CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACT  
 CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAAGCCAG  
 GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTTGGGCGTAAAG  
 CGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTTGGAAACTG  
 GGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGA  
 ACACAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAACAG  
 GATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGT  
 GCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAC  
 GGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGA  
 CATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCG  
 TCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATTTGTTAGTTGCCATCAT  
 TTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT  
 GCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCAT  
 GCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCT  
 AGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCAG  
 AGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGAT  
 TGGGGGAAGTCGTAACAATGATGCCAAATA

*E. faecalis* 271 (68)

AGTGCTTGC ACTCATTGGAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGG  
 GGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGC  
 GCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG  
 CCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG  
 GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAG  
 GTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGT  
 ATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTCCGAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC  
 GGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGG  
 GGAGGGTCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAA  
 TGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGA  
 AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGG  
 AGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTT  
 GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAA  
 GAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAAGTGAC  
 AGGTGGTGCATGGTTGTGCTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT  
 TATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAAACCGAGGAAGGTGGG  
 GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGT  
 CGCTAGACCGCGAGGTGCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCT  
 GCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCG

*E. faecalis* 11 (79)

CAGTCGACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGC ACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAAC  
 ACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTAT  
 GCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAG  
 TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA  
 CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACC  
 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGT  
 TAGTAACGTGAACCTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT  
 AATACTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTG  
 ATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG  
 TGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTG  
 GTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC  
 GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGT

*E. faecalis* 152 (92)

GATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAG  
 AGTGGAAATTTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCT  
 CTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCAC  
 GCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCAC  
 TCCGCTGGGGAGTACGACCCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG  
 CATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGAT  
 AGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTG  
 GGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACCTCTAGCGAGAC  
 TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAC  
 ACGTGTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCCGAGGTCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTC  
 AGTTCCGATTGCGAGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCG  
 CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCCGCTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCG  
 GTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCC

*E. faecalis* 18 (93)

GACCCTTGCGGGTCTATACATGCAAGTCGACGCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAAGA  
 GGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGGATAAACTTGGAAACAGGT  
 GCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGA  
 TGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGA  
 GAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT  
 CGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTG  
 TTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACAGAAAAGCCACGGCT  
 AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGA  
 GCGCAGGCGGTTTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGA  
 GACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACA  
 CCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT  
 TAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCT  
 GCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG  
 GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACAT  
 CCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCA  
 GCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTA  
 GTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC  
 CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCCGAGGTCATGCA  
 AATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGACAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGT  
 AATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCCGCTCACACCACGAGA  
 GTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGATTGG  
 GGTGAAGTCGAACAAGGATGCGTAGGC

*E. faecalis* 94 (103)

GACCCTTGCGGGTCTATACATGCAAGTCGACGCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAAGA  
 GGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGGATAAACTTGGAAACAGGT  
 GCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGA  
 TGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGA  
 GAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT  
 CGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTG  
 TTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACAGAAAAGCCACGGCT  
 AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGA  
 GCGCAGGCGGTTTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGA  
 GACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACA  
 CCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT  
 TAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCT  
 GCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG  
 GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACAT  
 CCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCA  
 GCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTA  
 GTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC  
 CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCCGAGGTCATGCA

AATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGT  
 AATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGA  
 GTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGATTGG  
 GGTGAAGTCGAACAAGGATGCGTAGGC

### *E. faecalis* 24 (125)

GAGCCTTCCGGGCAGCTATAATGCAAGTCGACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAAG  
 AGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAAACAGG  
 TGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTGCTGATGG  
 ATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCGCGATGCATAGCCGACCTG  
 AGAGGGTGTATCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT  
 TCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAACTTCT  
 GTTGTAGAGAGACCATGGACGTTAGTAACCTGAACGTCCTTGGACGGTATTCTAACCCAGAAAAGCCACGG  
 CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCCGGATTTATTGGGCGTAAAA  
 GCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGGAA  
 ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGG  
 AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAAGCGTGGGGAGCAA  
 ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTT  
 CAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT  
 TGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGAAGAACCTTACCAGGTC  
 TTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTT  
 GTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTGCCA  
 TCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA  
 TCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCCGCGAGG  
 TCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAAT  
 CGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACAC  
 CACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGA  
 TGATTGGGGTGAAGTCGAACAAGATGCCAACTT

### *E. faecium*

#### *E. faecium* 17I (2)

AGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTCTTTTTCC  
 ACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATC  
 AGAAGGGGATAACACTTGGAAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGA  
 AAGGCGCTTTCGGGTGTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC  
 CAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTC  
 CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGA  
 AGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACCTGTTTCATCCCTTG  
 ACGGTATCTAACCCAGAAAAGCCAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT  
 TGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCA  
 ACCGGGGAGGGTCATTGGAAAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGG  
 TGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGG  
 CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGT  
 GTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCA  
 AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAAC  
 GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTCGGGGGCAA  
 GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCA  
 ACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG  
 GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAA  
 CGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGGATTGCAGGCTGCAACTC  
 GCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG  
 TACACACCGCCCGTACACCACGAAGAGTATTG

*E. faecium* 32Z (11)

CTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTA  
 ACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAACCGCATGG  
 TTTTGATTTGAAAGGCGCTTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGG  
 TAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACAC  
 GGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGAGCAACGC  
 CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTG  
 TTCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG  
 GTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG  
 CCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCC  
 CATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAA  
 CTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA  
 TGAGTGTARKTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGG  
 GAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT  
 AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCC  
 CTTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC  
 CGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGAC  
 AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA  
 ATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATT  
 GCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATAC  
 GTTCCCAGGCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAAC  
 CTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGAT

*E. faecium* 14I (20)

TCCATTGGTAGCCGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGT  
 AACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG  
 ATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGG  
 GGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT  
 TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCC  
 CCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTC  
 CCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGA  
 CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC  
 AATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGAT  
 TGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATA  
 CGTTCACCGGCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAA  
 CCTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGATTGGGGT

*E. faecium* 71L (30)

CAGTCGACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC  
 ACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAA  
 ACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAG  
 TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACATTGGGA  
 CTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACC  
 GAGCAACGCCGCGTGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGA  
 GAGTAACGTTCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT  
 AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG  
 ATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG  
 TGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTG  
 GTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCC  
 GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGT

*E. faecium* 50 (33)

GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAACACTTGAAACAGGTG  
 CTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGAT  
 GGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAG  
 AGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC  
 GGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGT  
 TGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAAGCCACGGCTA  
 ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAG  
 CGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAG  
 ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACAC  
 CAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATT  
 AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGGCTG  
 CAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG  
 GCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGCTTTGACATC  
 CTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG  
 CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTCAG  
 TTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC  
 CTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTTCGCGAGGCTAAGCTA  
 ATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTA  
 ATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGACACACCGCCGTCACACCAGGAG  
 TTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACC

*E. faecium* 4I RA (47)

GCCCATCAGAAGGGGATAAACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTT  
 GATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC  
 GGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC  
 CAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCG  
 TGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAATAAGGATGAGAGTAACTGTTCA  
 TCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG  
 CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC  
 CGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGT  
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGAC  
 GCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACCCGTAAACGATGAGT  
 GCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTAC  
 GACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCG  
 AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTTGACACTCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTCGG  
 GGGCAAAGTGCAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAA  
 CGAGCGCAACCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTCAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAAC  
 GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGG  
 AAGTACAACGAGTTGCGAAGTTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGG  
 CTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCC  
 CGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTT  
 TGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGAT

*E. faecium* 5I (51)

GCCCATCAGAAGGGGATAAACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTT  
 GATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC  
 GGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC  
 CAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCG  
 TGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAATAAGGATGAGAGTAACTGTTCA  
 TCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG  
 CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC  
 CGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGT  
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGAC  
 GCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACCCGTAAACGATGAGT  
 GCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTAC  
 GACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCG  
 AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTTGACACTCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTCGG

GGGCAAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA  
 CGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACC  
 GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGG  
 AAGTACAACGAGTTGCGAAGTTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTTCGGATTGCAGG  
 CTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGGTGAATACGTTCC  
 CGGGCCTTGTACACACCCGCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTT  
 TGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGAT

*E. faecium* 105 (71)

CCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCA  
 GAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAA  
 AGGCGCTTTCGGGTGTCTGCTGATGGATGGACCCCGGTCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC  
 AAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCC  
 TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCCGGTGAGTGAA  
 GAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGA  
 CGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT  
 GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAA  
 CCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGT  
 GAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGC  
 TCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG  
 TTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAA  
 GGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG  
 CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAG  
 TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAA  
 CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG  
 TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAAC  
 GAGTTGCGAAGTTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTTCGGATTGCAGGCTGCAACTC  
 GCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTTGAATACGTTCCCAGGCTTG  
 TACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTG

*E. faecium* 14 (81)

CCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCA  
 GAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAA  
 AGGCGCTTTCGGGTGTCTGCTGATGGATGGACCCCGGTCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC  
 AAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCC  
 TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCCGGTGAGTGAA  
 GAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGA  
 CGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT  
 GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAA  
 CCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGT  
 GAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGC  
 TCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG  
 TTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAA  
 GGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG  
 CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAG  
 TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAA  
 CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG  
 TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAAC  
 GAGTTGCGAAGTTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTTCGGATTGCAGGCTGCAACTC  
 GCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTTGAATACGTTCCCAGGCTTG  
 TACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTC

*E. faecium* 13 (86)

CAGGCGGGGGGGTGCATACACATGCGTGTGCGAACGCTTCTTTTTCCCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAA  
 AGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAACA  
 GGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGAT  
 GGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACC  
 TGAGAGGGTGCATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT  
 CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACT  
 CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAAGCCAG  
 GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTTGGGCGTAAAG  
 CGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCTGGGGAGGGTCATTTGAAAC  
 TGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAG  
 GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC  
 AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCA  
 GTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTG  
 ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTT  
 GACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGT  
 CGTCAGCCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAT  
 CATTGAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT  
 CATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGC  
 TAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATC  
 GCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACC  
 ACGAGAGTTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGAAGAGT

*E. faecium* 30Z (105)

ATGCAAGTCGAACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGA  
 GTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAA  
 TCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTA  
 GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGCATCGGCCACAT  
 TGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTC  
 TGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAG  
 GATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC  
 GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAA  
 GCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAG  
 GAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCT  
 CTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCC  
 ACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGC  
 ACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG  
 AGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAG  
 ATAGAGCTTCCCCTTCGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGT  
 TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTGAGTTGGGCACTCTAGCAAG  
 ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTAC  
 ACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTC  
 TCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGC  
 CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCAGAGAGTTTTGTAACACCCGAAGT  
 CGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATG

*E. faecium* 40Z (112)

GCAGTCGACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAA  
 CACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAA  
 AACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA  
 GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGCATCGGCCACATTTGG  
 ACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGAC  
 CGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATG  
 AGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG  
 TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCT  
 GATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGA  
 GTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCT  
 GGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGC

CGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC  
 CGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCA  
 TGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAG  
 AGCTTCCCCTTCGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGG  
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTG  
 CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC  
 GTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAG  
 TTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCG  
 GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGT  
 GAGGTAACCTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGATAGAA

*E. faecium* 45Z- (118)

GAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTTGGGACTGAG  
 ACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCA  
 ACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTA  
 ACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC  
 GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAAGTCTGATGTG  
 AAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAA  
 TTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTG  
 TAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAA  
 CGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTG  
 GGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT  
 TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTC  
 CCCTTCGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGT  
 CCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTG  
 ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA  
 CAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGA  
 TT

*E. faecium* 25F (3)

GTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAA  
 TCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTA  
 GCTAGTTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAT  
 TGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTC  
 TGACCGAGCAACGCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAG  
 GATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC  
 GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAA  
 GTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAG  
 GAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCT  
 CTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCC  
 ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGC  
 ACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGG  
 AGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAG  
 ATAGAGCTTCCCCTTCGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTTCGTGAGCTCGTGTGAGATGT  
 TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAG  
 ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTAC  
 ACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTC  
 TCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGC  
 CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGT  
 CGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGG

*E. faecium* 13I (4)

CAGTCGACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC  
 ACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAA  
 ACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAG  
 TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGA  
 CTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACC  
 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGA  
 GAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT  
 AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTG  
 ATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG  
 TGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTG  
 GTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCC  
 GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGT

*E. faecium* 6I (5)

GAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAG  
 ACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGAGCA  
 ACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTA  
 ACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC  
 GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTG  
 AAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAA  
 TTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTG  
 TAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAA  
 CGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTG  
 GGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT  
 TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTC  
 CCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGT  
 CCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTG  
 ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA  
 CAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGA  
 TT

*E. faecium* 112L2 (7)

GCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTT  
 GATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC  
 GGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC  
 CAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCG  
 TGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAATAAGGATGAGAGTAACTGTTCA  
 TCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGG  
 CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC  
 CGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGT  
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGAC  
 GCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT  
 GCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTAC  
 GACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCG  
 AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACACTCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGG  
 GGGCAAAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAA  
 CGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACC  
 GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGG  
 AAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTTCGGATTGCAGG  
 CTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCC  
 CGGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTT  
 TGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGAT

*E. faecium* 38Z (8)

ATACATGCAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGCGGAACGGG  
 TGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAA  
 CAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGTGA  
 TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA  
 CATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAA  
 GTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAAC  
 AAGGATGAGAGTAACCTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA  
 GCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCT  
 TAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAA  
 GAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG  
 GCTCTCTGTTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTGT  
 TCCACGCCGTAACCATGAGTGTGTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTA  
 AGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGACAAGCGG  
 TGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTA  
 GAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGA  
 TGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTCAGTTGGGCACTCTAGC  
 AAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC  
 TACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTT  
 CTCTCAGTTCCGATTGACAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA  
 CGCCGCGGTGAATACGTTCCCAGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGTAAACCCGA  
 AGTCCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAA

*E. faecium* 49Z (9)

GGGATAATACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGC  
 GCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG  
 CCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACG  
 GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAG  
 GTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGT  
 ATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC  
 GGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGG  
 GGAGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAGAAGAGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAA  
 TGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGGGGCGAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGA  
 AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTGG  
 AGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTT  
 GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAA  
 GAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGCAAAGTGAC  
 AGGTGGTGCATGGTTGTGCTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT  
 TATTGTTAGTTGCCATCATTCAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG  
 GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGT  
 TGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACT

*E. faecium* 24I (12)

TGCAGTCGAACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGCGGAACGGGTGAGT  
 AACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATC  
 AAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGC  
 TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTG  
 GGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTG  
 ACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGA  
 TGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC  
 GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGT  
 CTGATGTGAAAGCCCTCCGGCTCAACCGGGGAGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGG  
 AGAGTGGAAATCCATGTTGAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGCTC  
 TCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCA  
 CGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCA  
 CTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACGCGGTGGA  
 GCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGA  
 TAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTT

GGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTCAGTTGGGCACTCTAGCAAGA  
 CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA  
 CACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCT  
 CAGTTCCGATTGTCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCC  
 GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAAGTC  
 GGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCG

*E. faecium* 42Z (14)

ACGGCCTCCTTTTTTCCCGGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG  
 GGTAACTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAACCGC  
 ATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGT  
 GAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAG  
 ACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCA  
 ACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTA  
 ACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC  
 GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTG  
 AAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAA  
 TTCCATGTGTAGCGGTGAATTGCCGTAGATAAA

*E. faecium* 26 (16)

TTGAGGGCGGCGTGCTATAACATGCAAGTCGAACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGAAAAA  
 GAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAG  
 GTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCCGGGTGTCGCTGATG  
 GATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGAGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCT  
 GAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC  
 TTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACCGCGGTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTC  
 TGTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGG  
 CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGC  
 GAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGG  
 GAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAA  
 CACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGGAGCAAACAG  
 GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGT  
 GCTGCAGTAAACGATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCCGCAAGGTTGAAACTCAAGGAATTGACG  
 GGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGTTAATTCGAAGCAACCGGAGACCTTACCAGTCTGAACATCC  
 TTTGACACTCTAGAGATAGAGGCTTCCCTTCCGGGGCAAAGTGACAGTGTGCATGTGCGTCAGCTCATGT  
 CCTGAATGTTGGGTTTAGTCCGCA

*E. faecium* 17 (17)

GTCGACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACAC  
 GTGGGTAACCTGCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAAC  
 CGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTT  
 GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACT  
 GAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGA  
 GCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGA  
 GTAACCTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  
 TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGAT  
 GTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTG  
 GAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGT  
 CTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT  
 AAACGATGAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTT

*E. faecium* 50Z (21)

GCGTGCTAATACATGCAAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTG  
 GCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCATCAGAAGGGGATAAACTTGAAACAGGTGCTAAT  
 ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACC  
 CGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGT  
 GATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAA  
 TGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTA  
 GAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTAC  
 GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG  
 GCGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTT  
 GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGT  
 GGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT  
 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGTCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGC  
 TAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  
 GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTT  
 GACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTCAGCTCG  
 TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTGAGTTGG  
 GCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTA  
 TGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCT  
 CTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCG  
 CGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTG  
 TAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGA

*E. faecium* 50ZE (22)

AAGCCCTCCTTTTTCCCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGG  
 TAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCAT  
 GGTTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGA  
 GGTAAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGCATCGGCCACATTGGGACTGAGAC  
 ACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAAC  
 GCCGCGTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAAC  
 TGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT  
 AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAA  
 AGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAAT  
 CCATGTGTAGCGGTGATGGG

*E. faecium* 33ZL (23)

ACGCTTCTTTTTCCCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGT  
 AACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATG  
 GTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGA  
 GTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGCATCGGCCACATTGGGACTGAGACA  
 CGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACG  
 CCGCGTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAAC  
 GTTCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA  
 GGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAA  
 GCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTC  
 CATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAA  
 CTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA  
 TGAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGG  
 AGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTA  
 ATTCGAAGCAACGCAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCC  
 TTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC  
 GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTGAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACA  
 AACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAA  
 TGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTG  
 CAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAGCCGCGGTGAATACG  
 TTCGCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACC  
 TTT

*E. faecium* 33ZE (25)

TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCAAACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTT  
 GCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAAAAAGGGGAT  
 AACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAAGCGCTTT  
 CGGGTGTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACG  
 ATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGCATCGGCCACATTGGGACTGAAACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGG  
 CAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACAAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAAAAGGTTTT  
 CGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTA  
 ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATT  
 TATTGGGCGTAAAGCGAGCGCCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAACCCCCGGCTCAACCCGGGGA  
 GGGTCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGC  
 GTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTAACTGACGCTGAGGCTA  
 GAAAGTGCAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCA  
 TGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACAC  
 CGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGTCCGTTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCTAA  
 GGTGGGATAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCA

*E. faecium* 24RA (29)

TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCAAACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTT  
 GCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAAAAAGGGGAT  
 AACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAAGCGCTTT  
 CGGGTGTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACG  
 ATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGCATCGGCCACATTGGGACTGAAACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGG  
 CAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACAAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAAAAGGTTTT  
 CGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTA  
 ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATT  
 TATTGGGCGTAAAGCGAGCGCCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAACCCCCGGCTCAACCCGGGGA  
 GGGTCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGC  
 GTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTAACTGACGCTGAGGCTA  
 GAAAGTGCAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCA  
 TGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACAC  
 CGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGTCCGTTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCTAA  
 GGTGGGATAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCA

*E. faecium* 14L1RA (32)

GCCCATCAAAATGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTT  
 GATTTGAAAGGCGCTTTTCGGGTGTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC  
 GGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGCATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC  
 CAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCG  
 TGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTCA  
 TCCCTTGACCGTATCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGTTGG  
 CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC  
 CGGCTCAACCCGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGT  
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTAACTGAC  
 GCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT  
 GCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTAC

GACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCG  
 AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGG  
 GGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAAC  
 GAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTGAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCG  
 GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGA  
 AGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGC  
 TGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGGTTGTAATCGCGGATAAGCA

*E. faecium* 44Z TE (35)

GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATCAGAAGGGGATAAACTTGGAAACAGGTG  
 CTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGTGATGGAT  
 GGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAG  
 AGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC  
 GGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGT  
 TGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAAGCCACGGCTA  
 ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAG  
 CGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAG  
 ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACAC  
 CAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATT  
 AGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTG  
 CAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG  
 GCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATC  
 CTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAG  
 CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCGCAACGAGCGCAACCTTATTGTTAGTTGCCATCATTGAG  
 TTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCC  
 CTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTTCGCGAGGCTAAGCTA  
 ATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTA  
 ATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTCACACCACGAGAG  
 TTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACC

*E. faecium* 31L (39)

CACCACGAACGTATATACTGCAGTCGACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGGCTCCACCGGAAAAAGAA  
 GAGTAGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTAGCCATCAGAAGGGGATAAACTTGGAAACAGG  
 TGCTAATACCGTATAACAATCAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGTGATGG  
 ATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTG  
 AGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT  
 TCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCT  
 GTTGTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAAGCCACGGC  
 TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCG  
 AGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGG  
 AGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAA  
 CACCAGTGGCGAAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAAACAG  
 GATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTTCAG  
 TGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA  
 CGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTG  
 ACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTC  
 GTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCTTATTGTTAGTTGCCATCA  
 TTCAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCA  
 TGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTTCGCGAGGCTA  
 AGTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGC  
 TAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTCACACCAC  
 GAGAGTTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGTAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGATAGATGA  
 TGGGGGAAGTCGAGAAGAGTAGAAAGC

*E. faecium* 4I (40)

CCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCA  
 GAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAA  
 AGGCGCTTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC  
 AAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCC  
 TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAA  
 GAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGA  
 CGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT  
 GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAA  
 CCGGGGAGGGTCAATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGT  
 GAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGC  
 TCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTG  
 TTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCCAA  
 GGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACG  
 CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAG  
 TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA  
 CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTGAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAG  
 TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAAC  
 GAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTC  
 GCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCGGGGCCTTG  
 TACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTG

*E. faecium* 10I (43)

CAGTCGACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC  
 ACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAA  
 ACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAG  
 TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGA  
 CTGAGACACGGCCCAAACCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACC  
 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGA  
 GAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT  
 AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTG  
 ATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG  
 TGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTG  
 GTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC  
 GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGT

*E. faecium* 71 (45)

TTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTG  
 CAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGA  
 AGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCT  
 GGTAGTACACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACG  
 CATTAAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA  
 AGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCA  
 CTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGCG  
 TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTGAGTTGGGCACT  
 CTAGCAAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACC  
 TGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAA  
 AGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGAT  
 CAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCAGGCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTTGTAACA  
 CCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTT

*E. faecium* 25I (60)

GAGGAAATGCGTGTGCTAATACATGCAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAA  
 AGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAACA  
 GGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGAT  
 GGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACC  
 TGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT  
 CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAACT  
 CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAAGCCAG  
 GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTTGGGCGTAAAG  
 CGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTTGAAACTG  
 GGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGA  
 ACACACTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGCGCAACACG  
 GATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGT  
 GCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAC  
 GGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGA  
 CATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCG  
 TCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCTTATTTGTTAGTTGCCATCAT  
 TCAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT  
 GCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAA  
 GCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCT  
 AGTAATCGCGGATCAGCACGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAG  
 AGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGATAGATCTTTT

*E. faecium* 55 (63)

TGCAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGT  
 AACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATC  
 GAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGC  
 TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTG  
 GGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTG  
 ACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGA  
 TGAGAGTAACTGTTTACCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC  
 GGTAAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAA  
 GTATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTTGAAACTGGGAGACTTGAGTCAGAAGAGGA  
 GAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCT  
 CTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCAC  
 GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCAC  
 TCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAG  
 CATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGCTTGCATCCTTTGACCACTCTAGAGAT  
 AGAGCTTCCCCTTCGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTG  
 GGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTCAGTTGGGCACTCTAGCAAGAC  
 TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAC  
 ACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTC  
 AGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCG  
 CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCG  
 GTGAGGTAACCTTTGGAG

*E. faecium* 43Z (64)

CACCACGAACGTCATATACTGCAGTCGACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGGCTCCACCGGAAAAAGAA  
 GAGTAGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTAGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGG  
 TGCTAATACCGTATAACAATCAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGG  
 ATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTG  
 AGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT  
 TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACCGCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAACTCT  
 GTTGTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAAGCCACGGC  
 TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGCG  
 AGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTTGAAACTGGG  
 AGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAA  
 CACCAGTGGCGAAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG

GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTTCAG  
 TGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA  
 CGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTG  
 ACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTC  
 GTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCA  
 TTCAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCA  
 TGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTA  
 AGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGC  
 TAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCAC  
 GAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGTAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGATAGATGA  
 TGGGGGAAGTCGAGAAGAGTAGAAAGC

### *E. faecium* 2 (69)

AGTCGACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGCGCAACGGGTGAGTAACA  
 CGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAA  
 CCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGT  
 TGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGAC  
 TGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCG  
 AGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAG  
 AGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTA  
 ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGA  
 TGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT  
 GGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGG  
 TCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG  
 TAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTT

### *E. faecium* 5 (70)

GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAACTTGGAAACAGGTG  
 CTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGAT  
 GGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAG  
 AGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC  
 GGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGT  
 TGTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTA  
 ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAG  
 CGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAG  
 ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACAC  
 CAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT  
 AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTG  
 CAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG  
 GCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATC  
 CTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAG  
 CTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTCAG  
 TTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC  
 CTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTA  
 ATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTA  
 ATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAG  
 TTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACC

### *E. faecium* 51 (72)

CCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCA  
 GAAGGGGATAAACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAA  
 AGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC  
 AAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACCGCCCAAACCTCC  
 TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACCGCCGCTGAGTGAA  
 GAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGA  
 CGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT  
 GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAA  
 CCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGT

GAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGC  
 TCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG  
 TTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCCGAA  
 GGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG  
 CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAG  
 TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA  
 CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG  
 TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAAC  
 GAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTC  
 GCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTTGAATACGTTCCCAGGCTTG  
 TACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTG

### *E. faecium* 6 (73)

CCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCTACGG  
 GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGAGCAACGCCCGGTGAGTGAAGAAGG  
 TTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTA  
 TCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG  
 GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGG  
 GAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAAT  
 GCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAA  
 AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGA  
 GGGTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCCGCAAGGTTG  
 AAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGAAG  
 AACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACA  
 GGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTT  
 ATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG  
 ATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTT  
 GCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTG  
 CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTTGAATACGTTCCCAGGCTTGATACAC  
 ACCCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCCGTGAGGTAACCTTTTGAACCCCGCCGCT  
 AAAGT

### *E. faecium* 7 (74)

CCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCATCA  
 GAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATAACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTTGATTTGAA  
 AGGCGCTTTTCGGGTGTCTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC  
 AAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCC  
 TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGAGCAACGCCCGGTGAGTGAA  
 GAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGA  
 CGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT  
 GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAA  
 CCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGT  
 GAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGC  
 TCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG  
 TTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCCGAA  
 GGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG  
 CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAG  
 TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA  
 CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG  
 TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAAC  
 GAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTC  
 GCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTTGAATACGTTCCCAGGCTTG  
 TACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTG

### *E. faecium* 101 (76)

CAGTCGACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC  
 ACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAA  
 ACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAG  
 TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGA  
 CTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACC  
 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGA  
 GAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT  
 AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTG  
 ATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG  
 TGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTG  
 GTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCC  
 GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGT

*E. faecium* 15 (80)

CCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGG  
 GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGG  
 TTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTA  
 TCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG  
 GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGG  
 GAGGGTCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAAT  
 GCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAA  
 AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGA  
 GGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG  
 AAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAG  
 AACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTCGGGGGCAAAGTGACA  
 GGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTT  
 ATTGTTAGTTGCCATCATTACAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG  
 ATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTT  
 GCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTG  
 CATGAAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAAC  
 ACCGCCGTACACCACGAGAGTTTTGTAACACCCGAAGTCCGGTGAGGTAACCTTTTGAACCCCGCCGCT  
 AAAGT

*E. faecium* 52 (82)

ATACATGCAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGG  
 TGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAAA  
 CAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCA  
 TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA  
 CATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAA  
 GTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAAC  
 AAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA  
 GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCT  
 TAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAA  
 GAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG  
 GCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAG  
 TCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTA  
 AGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGG  
 TGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTA  
 GAGATAGAGTCTCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTTGTCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGA  
 TGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATTGTTAGTTGCCATCATTGAGTGGGCACTCTAGC  
 AAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC  
 TACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTT  
 CTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA  
 CGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTTGTAACACCCGA  
 AGTCCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAA

*E. faecium* 69 (83)

GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAACACTTGAAAACAGGTG  
 CTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGAT  
 GGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAG  
 AGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC  
 GGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGT  
 TGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACCTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAAGCCACGGCTA  
 ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGCGAG  
 CGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTTGAAAACCTGGGAG  
 ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACAC  
 CAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATT  
 AGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTG  
 CAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG  
 GCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATC  
 CTTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAG  
 CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCTTATTTGTTAGTTGCCATCATTCAG  
 TTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC  
 CTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTTCGCGAGGCTAAGCTA  
 ATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTA  
 ATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCAGGAG  
 TTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACC

*E. faecium* 132 (84)

GAGGAAATGCGTGTGCTAATACATGCAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGAAAA  
 AGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAACACTTGAAAACA  
 GGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGAT  
 GGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACC  
 TGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT  
 CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACT  
 CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACCTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAAGCCAG  
 GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTTGGGCGTAAAG  
 CGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTTGAAAACCTG  
 GGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGA  
 ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG  
 GATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGT  
 GCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAC  
 GGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGA  
 CATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCG  
 TCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCTTATTTGTTAGTTGCCATCAT  
 TCAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT  
 GCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTTCGCGAGGCTAA  
 GCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCT  
 AGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCAG  
 AGAGTTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGATAGATCTTTTT

*E. faecium* 25L1 (88)

TCCACCGCAGCTTGCTCCACCGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCC  
 ATCAGAAGGGGATAAACACTTGAAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATT  
 TGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT  
 CACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAA  
 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAG  
 TGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACCTGTTTCATCCC  
 TTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG  
 CGTTGTCGGATTTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCCGG  
 CTTAACCGGGGAGGGTCATTTGAAAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTA  
 GCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCT  
 GAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCT  
 AAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGTCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGAC

CGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG  
 CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGG  
 CAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAG  
 CGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAAACGGGAG  
 GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGT  
 ACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGC  
 AACTCGCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTGAATACGTTCCC  
 CCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAG

### *E. faecium* 20 (90)

GCGTGCTAATACATGCAAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTG  
 GCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATCAGAAGGGGATAACACTTGAAACAGGTGCTAAT  
 ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACC  
 CGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGT  
 GATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAA  
 TGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTA  
 GAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTAC  
 GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG  
 GCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTT  
 GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGT  
 GCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGAT  
 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTCTGCAGC  
 TAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCC  
 GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTT  
 GACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCG  
 TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGG  
 GCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTA  
 TGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCT  
 CTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCG  
 CGGATCAGCACGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTT  
 TAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGA

### *E. faecium* 83 (98)

CAACCTTTCCTTTTTTCCACCGGAGCCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACAC  
 GTGGGTAACCTGCCATCAGAAGGGGATAACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAAC  
 CGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTT  
 GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACATTGGGACT  
 GAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGA  
 GCAACGCCGCGTGAAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGA  
 GTAACCTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  
 TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGAT  
 GTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTG  
 GAATTCATGTGTAGCGGTGATGTGGGGAAAAATATA

### *E. faecium* 31Z (106)

GAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACATTGGGACTGAG  
 ACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGAGCA  
 ACGCCGCGTGAAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTA  
 ACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC  
 GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTG  
 AAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAA  
 TTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTG  
 TAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTA  
 CGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCTG  
 GGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT  
 TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTC  
 CCCTTCGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGATGATGTTGGGTTAAGT  
 CCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTG

ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA  
CAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGA  
TT

*E. faecium* 41Z (113)

CCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCA  
GAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCCGCATGGTFTTGTATTTGAA  
AGGCGCTTTTCGGGTGTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC  
AAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGTGCGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCC  
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAA  
GAAGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCAATCCCTTGA  
CGGTATCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT  
GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAA  
CCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGT  
GAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGTGAGGC  
TCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG  
TTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAA  
GGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACG  
CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGCAAAG  
TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA  
CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTGAGTTGGGCCTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG  
TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAAC  
GAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTC  
GCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCCGGCCCTTG  
TACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGTC

*E. faecium* 120L (117)

TCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACAC  
GTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAAC  
CGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTTCGGGTGTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTT  
GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGTGCGCCACATTTGGGACT  
GAGACACGGCCCAAACCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGA  
GCAACCGCCGCGTGAAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGA  
GTAACTGTTTCAATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  
TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGAT  
GTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTG  
GAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGT  
CTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT  
AAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGC  
CTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGT  
GGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGC  
TTCCCCTTCGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTA  
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTGAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCG  
GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG  
CTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTC  
GGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTG  
AATACGTTCCCCGGCCCTTGATACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGAAG

*E. faecium* 111L (120)

CCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCA  
GAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCCGCATGGTFTTGTATTTGAA  
AGGCGCTTTTCGGGTGTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC  
AAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGTGCGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCC  
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAA  
GAAGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCAATCCCTTGA  
CGGTATCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT  
GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAA  
CCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGT

GAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGC  
 TCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG  
 TTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCCGCAA  
 GGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG  
 CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAG  
 TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA  
 CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG  
 TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAAC  
 GAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTC  
 GCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCAGGCTTG  
 TACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTC

*E. faecium* 47Z (121)

CCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCATCA  
 GAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAA  
 AGGCGCTTTCCGGGTGTCTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC  
 AAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGCATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCC  
 TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAA  
 GAAGGTTTTCCGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTATCCCTTGA  
 CGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT  
 GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAA  
 CCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGT  
 GAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGC  
 TCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG  
 TTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCCGCAA  
 GGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG  
 CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAG  
 TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA  
 CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG  
 TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAAC  
 GAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTC  
 GCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCAGGCTTG  
 TACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAG