Ana Paula Marchi Rosin

Avaliação do perfil clonal, resistência e virulência de isolados de *Enterococci* resistente à vancomicina em pacientes com doenças hematológicas ou submetidos a transplante de medula óssea

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Doença Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Prof.^a Dra. Silvia Figueiredo Costa

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rosin, Ana Paula Marchi

Avaliação do perfil clonal, resistência e virulência de isolados de *Enterococci* resistente à vancomicina em pacientes com doenças hematológicas ou submetidos a transplante de medula óssea / Ana Paula Marchi Rosin. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Silvia Figueiredo Costa.

Descritores: 1.Enterococos resistentes à vancomicina 2.Resistência à doença
3.Virulência 4.Eletroforese em gel de campo pulsado 5.Genoma bacteriano
6.Infecção hospitalar

USP/FM/DBD-374/17

A Deus...

Aos meus pais Antônio e Mariza...

Ao meu esposo Rafael Alzuguir Rosin...

AGRADECIMENTOS

- Agradeço principalmente à Deus, pela minha vida e por me conceder paz nos momentos mais difíceis.
- A minha orientadora Profa. Dra. Silvia Figueiredo Costa por ter me aceitado como aluna, por confiar a mim este projeto e por todos os ensinamentos ao longo da elaboração deste trabalho.
- A Profa. Dra. Anna Sara S. Levin pelas oportunidades oferecidas.
- Aos meus pais por me ensinarem o caminho do bem e por sempre apoiarem minhas escolhas.
- Ao meu esposo Rafael Alzuguir Rosin, meu maior incentivador e meu suporte nos momentos mais difíceis.
- Aos meus sogros Vera e Miguel Rosin, meus cunhados Gustavo, Melissa, Fábio e Andreia e meus sobrinhos Diego e Fabricio por entenderem minha ausência em alguns momentos da elaboração deste projeto.
- A Dra. Inneke Marie van der Heijden por ter me trazido ao laboratório, por todas as palavras de carinho e por toda a amizade.
- A amiga Andreia de Paula Alcaia, pela sua dedicação, competência, por seu carinho, seus conselhos e principalmente por sua amizade.
- Ao Dr. Lauro Vieira Perdigão Neto pelos ensinamentos, por todas as conversas, pelo suporte e principalmente pela grande amizade.
- A Dra. Roberta Cristina Ruedas Martins por todas as conversas, conselhos, ajuda e principalmente pela amizade construída ao longo do tempo.
- A Dra. Gleice Cristina Leite pela amizade, pelo carinho e por estar presente mesmo distante.
- Aos Funcionários e alunos do Laboratório de Bacteriologia LIM54: Camila Rizek, Sânia Santos, Juliana Januário, Gladys Prado, Micheli Medeiros, Patrícia Neves, Débora Nagano, Mariana Graça, Tatiana Orsi, Diego Mongelos, Gaspar Camilo, Ana Maria, Taniela Bes, Victor Lima e Evelyn Sanchez.
- Aos Laboratórios de Micologia (LIM53), Parasitologia (LIM46) e Hepatites (LIM 47) pela amizade e pelo apoio.
- Ao Dr. Carlos Henrique Camargo - Instituto Adolfo Lutz, pelo apoio nas etapas do projeto.

- A Roseli Antônia Santo pela amizade e todo o suporte acadêmico durante o mestrado.
- A Dra. Maura, Sueli e Luiz do Grupo de Controle de Infecção Hospitalar (GCIH).
- Ao Laboratório de Sanidade Suína da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, em especial à Luiza Zanolli Moreno pela ajuda nas etapas de Bioinformática do projeto.

“Os vencedores são aqueles que não economizam na dose de vontade para pôr em prática seus desejos”.

(Autor desconhecido)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Médica – 54 da Divisão de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com auxílio financeiro ao projeto pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e auxílio financeiro ao aluno pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos e periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

LISTA DE QUADROS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ANEXOS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
RESUMO	
ABSTRACT	

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Resistência à Glipopeptídeos – Vancomicina e Teicoplanina	3
1.2 Genes de resistência ao glicopeptídeos Vancomicina e Teicoplanina	4
1.3 Resistência a aminoglicosídeos – Vancomicina e Streptomomicina	5
1.4 Resistência a linezolida	5
1.5 Virulência	6
1.6 Sequenciamento completo de genoma.....	8
2. JUSTIFICATIVA	10
3. OBJETIVOS.....	12
3.1. Objetivos principais.....	13
3.2 Objetivos secundários.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 Local do estudo.....	15
4.2 Cultura de Vigilância de VRE	15
4.3 Desenho do estudo.....	15
4.4 Estudo populacional	16
4.5 Análise estatística	16
4.6 Identificação dos isolados.....	17
4.7 Detecção dos genes de resistência <i>vanA</i> e <i>vanB</i> pela técnica de reação em cadeia da polimerase multiplex.....	17
4.8 Detecção do gene de resistência a linezolida pela técnica de PCR.....	18
4.9 Detecção dos genes de virulência <i>asa1</i> , <i>gelE</i> , <i>cylA</i> , <i>esp</i> e <i>hyl_{efm}</i> pela técnica PCR multiplex	19
4.10 Detecção do perfil clonal pela técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado.....	20
4.11 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos.....	22
4.11.1 Determinação da concentração inibitória mínima pela técnica de diluição em caldo.....	22
4.12 Sequenciamento do genoma bacteriano pelas tecnologias Ion Torrent PGM™ e MiSeq Illumina™.	23
5. RESULTADOS	25
5.1 Dados clínicos e demográficos dos pacientes hematológicos incluídos no estudo.....	26
5.2 Testes laboratoriais.....	28
5.2.1 Concentração Inibitória Mínima – Diluição em caldo.....	28

5.3 Testes genotípicos	29
5.3.1 Detecção dos genes de resistência (<i>vanA</i> e <i>vanB</i>) pela técnica de PCR multiplex	29
5.3.2 Detecção do gene de resistência a linezolida	29
5.3.3 Detecção dos genes de virulência por PCR multiplex	30
5.4 Detecção do perfil clonal por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado	34
5.4.1 Perfis moleculares observados entre os isolados de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i>	34
5.5 Análise do genoma bacteriano dos isolados sequenciados pelas plataformas Ion Torrent e Illumina MiSeq	37
5.5.1 Representação da localização dos STs dos isolados de <i>E. faecium</i>	44
5.5.2 Dendrograma representando as diferenças de SNP entre os isolados sequenciados	45
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÕES	54
8. ANEXOS	57
8.1 Anexo 1: Parecer de aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa (CAPPesq)	58
8.2 Anexo 2: Perfil dos isolados de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> por sequenciamento do genoma total.	59
8.3 Produção Científica	60
8.3.1 Artigos publicados como colaborador	60
8.3.2 Participação em Congressos:	62
9. REFERÊNCIAS	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Iniciadores utilizados para detecção dos genes de resistência.....	18
Quadro 2 – Iniciadores utilizados para detecção do gene de resistência a Linezolida...	18
Quadro 3 – Iniciadores utilizados para detecção dos genes de virulência.....	19
Quadro 4 – Pontos de corte proposto pelo CLSI 2013 para o método de Concentração Inibitória Mínima.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características de 76 pacientes com doenças hematológicas infectados e ou colonizados por VRE.....	27
Tabela 2 – Determinação de CIM50 e CIM90 por microdiluição para os antibióticos testados nos isolados de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> resistente à vancomicina.....	28
Tabela 3 – Detecção do perfil de virulência dos isolados de <i>E. faecium</i> de infecção e colonização.....	31
Tabela 4 - Associação da mortalidade e presença dos genes de virulência entre os 42 pacientes infectados e 34 colonizados por VRE.....	33
Tabela 5 – Genes relacionados a resistência a antimicrobianos entre os isolados de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> sequenciados.....	40
Tabela 5 (conclusão) – Genes relacionados a resistência a antimicrobianos entre os isolados de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> sequenciados.....	41
Tabela 6 – Genes relacionados a virulência observados nos isolados de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> sequenciados.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma de experimentos realizados.....	17
Figura 2 – PCR para detecção do gene de resistência <i>vanA</i> em isolado de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i>	29
Figura 3 – PCR para detecção da resistência a linezolida.....	30
Figura 4 – PCR multiplex dos genes de virulência <i>esp</i> , <i>asa1</i> , <i>gelE</i> , <i>hyl_{efm}</i> em isolados de <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Enterococcus faecalis</i>	31
Figura 5 – Dendrograma representando os 80 isolados de <i>E. faecium</i> identificados por PFGE.....	35
Figura 6 – Dendrograma representando os 06 isolados de <i>E. faecalis</i> identificados por PFGE.....	36
Figura 7 – eBURST representando a localização dos STs dos isolados de <i>E. faecium</i> sequenciados.....	44
Figura 8 – eBURST representando a localização do ST do isolado de <i>E. faecalis</i> sequenciado.....	45
Figura 9 – Dendrograma representando as diferenças de SNP dos isolados sequenciados no estudo.....	46

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Parecer de aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa (CAPPesq).....	57
Anexo 2: Perfil dos isolados de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> por sequenciamento do genoma total.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – American Type Culture Collection

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CMHCA – Caldo Muller Hinton Cápio Ajustado

CVC – Cateter Venoso Central

ICS – Infecção de Corrente Sanguínea

IS – Insertion Sequence

ITU – Infecção Trato Urinário

MLST – Multi Locus Sequence Type

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PFGE – Pulsed-Field Gel Electrophoresis/Eletroforese em Gel de campo Pulsado

PFT – Pulsed Field Type

SENTRY – Antimicrobial Surveillance Program

TCTH – Transplante Célula Tronco Hematopoiética

TMO – Transplante de Medula Óssea

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

VRE – Vancomycin Resistant *Enterococcus*

RESUMO

Rosin APM. *Avaliação do perfil clonal, resistência e virulência de isolados de Enterococci resistente à vancomicina em pacientes com doenças hematológicas ou submetidos a transplante de medula óssea* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução: *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE do inglês Vancomycin Resistant *Enterococcus*) é uma importante causa de infecção relacionada a assistência à saúde com alta morbidade e mortalidade principalmente nos pacientes imunocomprometidos sendo a segunda causa mais comum de infecções hospitalares nessa população de pacientes em alguns centros. O uso prolongado da terapia antimicrobiana com vancomicina e outras drogas, são fatores de risco associados com a disseminação desse patógeno. Além disso, espécies de enterococos podem apresentar fatores de virulência tais como: substância de agregação (*asa1*), gelatinase (*gelE*), citolisina (*cylA*), proteína de superfície enterococo (*esp*) e hidrolase glicosil (*hylefm*). Entretanto, o papel da virulência na colonização e infecção por VRE é controverso.

Objetivos: Avaliar o perfil clonal, virulência e resistência de 86 isolados de VRE (80 *E. faecium* e 06 *E. faecalis*) de infecção e colonização de 76 pacientes com doenças hematológicas e/ou submetidos a transplante de Medula Óssea (TMO) internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) no período de 10 anos (2005-2014). **Material e Métodos:** Foram realizadas concentração inibitória mínima para: vancomicina, teicoplanina, linezolida, gentamicina e estreptomicina em alta concentração (HLAR); Avaliação da clonalidade por eletroforese em campo pulsado (PFGE); Detecção dos mecanismos de resistência (*vanA* e *vanB*) e de virulência (*esp*, *asa1*, *gelE*, *cylA* e *hylefm*) pela técnica de PCR e sequenciamento total do genoma de dezoito isolados selecionados de acordo com a clonalidade. Foi criado um banco de dados no programa Epiinfo (CDC) com variáveis clínicas e demográficas dos pacientes. A proporção de isolados de colonização portadores de genes de virulência foi comparada com os isolados de infecção assim como a proporção de isolados de infecção portadores de genes de virulência que evoluíram para óbito. O valor de $p \leq 0,005$ foi considerado significativo. **Resultados:** Trinta e quatro pacientes eram colonizados e 42 infectados por VRE (28 eram infecção de corrente

sanguínea), 48 pacientes eram transplantados dos quais 32 eram alogênicos. A mortalidade em 14 dias foi de 21,0% e durante a hospitalização de 53,9%. Todos os isolados foram resistentes à vancomicina e 87,3% à teicoplanina. Resistência a gentamicina e estreptomicina em alta concentração (HLAR) foi observada em 08 e 59 isolados respectivamente. Um isolado apresentou resistência a linezolida identificado pela primeira vez na unidade. O gene *vanA* foi detectado em todos os isolados. Quanto aos genes de virulência, 96,5% de isolados foram positivos para o gene *esp* e 69,8% para os genes *gelE* e *asa1*. Isolados de infecção de *E. faecium* carregaram mais genes de virulência: *esp* (100%), *gelE* (80,0%) e *asa1* (75,5%) e o gene *gelE* foi significativamente mais frequente entre isolados de infecção que de colonização ($p=0,008$). Infecções causadas por isolados de *E. faecium* positivos para o gene *asa1* foram significativamente associadas com maior mortalidade ($p < 0,05$). Quinze diferentes Pulsed field type (PFT) foram observados entre os isolados de *E. faecium* e 06 entre os isolados de *E. faecalis*. Dezesete *E. faecium* foram sequenciados e diferentes sequências tipo (ST) foram observadas (ST412, ST478, ST78 e ST896) já descritas em outros estudos no Brasil. O isolado resistente a linezolida apresentou mutação no domínio V do gene 23S rRNA com um perfil alélico diferente, caracterizando um novo ST (ST987) descrito pela primeira vez no Brasil. Todos os ST observados nos isolados de *E. faecium* pertencem ao complexo clonal 17, dos quais dois STs (ST963, ST792) foram descritos pela primeira vez no país. O isolado de *E. faecalis* sequenciado pertencia ao ST9 e ao complexo clonal 9 já descrito por outros autores. **Conclusão:** Nosso estudo observou que *E. faecium* foi predominante em nosso hospital e os ST circulantes pertenciam ao CC17. Os isolados de infecção foram mais virulentos que os isolados de colonização e o gene *gelE* foi significativamente mais frequente nos isolados de infecção. Infecções causadas por isolados de *E. faecium* positivos para o gene *asa1* foram associadas com a alta mortalidade. Este achado pode ser útil para controlar a disseminação de *E. faecium* no ambiente hospitalar e em pacientes hematológicos.

Descritores: Enterococos Resistentes à Vancomicina; Resistência; Virulência; Eletroforese em Gel de Campo Pulsado; Genoma Bacteriano, Infecção Hospitalar.

ABSTRACT

Rosin APM. *Evaluation of clonal profile, resistance and virulence of vancomycin-resistant Enterococci isolates in patients with hematological diseases or submitted to bone marrow transplantation* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Introduction: Vancomycin Resistant Enterococcus (VRE) is a important cause of health care-associated infection with high morbidity and mortality, mainly in immunocompromised patients, being the second most common cause of hospital infections in this population of patients in some centers. Prolonged use of antimicrobial therapy with vancomycin and other drugs are risk factors associated with the spread of this pathogen. In addition, enterococcal species may present virulence factors such as: aggregation substance (*asa1*), gelatinase (*gelE*), cytolysin (*cylA*), enterococcal surface protein (*esp*) and glycosyl hydrolase (*hyl_{efm}*). However, the role of virulence on VRE colonization and infection is controversial. **Objectives:** To evaluate the clonal profile, virulence and resistance of 86 isolates of VRE (80 *E. faecium* and 06 *E. faecalis*) from infection and colonization of 76 patients with hematological diseases and / or submitted to bone marrow transplantation (BMT) at Hospital das Clinics of the Medical School of the University of São Paulo (HC-FMUSP) in the period of 10 years (2005-2014). **Material and Methods:** Minimum inhibitory concentration to vancomycin, teicoplanin, linezolid, gentamicin and streptomycin in high concentration (HLAR) was performed; Clonality of isolates by pulsed field electrophoresis (PFGE) was evaluated; Detection of resistance (*vanA* and *vanB*) and virulence (*esp*, *asa1*, *gelE*, *cylA* and *hyl_{efm}*) genes by PCR technique and whole genome sequencing of eighteen isolates selected based on clonality. **Results:** All isolates were resistant to vancomycin and 87.3% to teicoplanin. Resistance to gentamicin and streptomycin in high concentration (HLAR) was observed in 08 and 59 isolates respectively. One isolate presented resistance to linezolid observed for the first time in the unit. The *vanA* gene was detected in all isolates. Regarding virulence genes, 96.5% of isolates were positive for the *esp* gene and 69.8% for the *gelE* and *asa1* genes. Isolates of *E. faecium* infection carried more virulence genes: *esp* (100%), *gelE* (80.0%) and *asa1* (75.5%) and *gelE* gene was significantly more frequent among infection isolates than colonization ($p = 0.008$). Infections caused by *E. faecium* isolates carrying the *asa1* gene were significantly associated with higher mortality (p

<0.05). Fifteen different Pulsed field type (PFT) were observed among the isolates of *E. faecium* and 06 among *E. faecalis* isolates. Seventeen *E. faecium* were sequenced and the following sequences type (ST) were observed (ST412, ST478, ST78 and ST896) all of them already described in Brazil. The linezolid-resistant isolate showed the 23S gene V-domain mutation with a different allelic profile, characterizing a new ST (ST987) described for the first time in our study. All STs observed in *E. faecium* isolates belong to clonal complex 17. Two other STs (ST963, ST792) were identified for the first time in the country. The *E. faecalis* isolate belong to ST9 and clonal complex 9 already described by other authors in Brazil. **Conclusion:** Our study observed that *E. faecium* was predominant in our hospital and the circulating STs belonged to CC17 a virulent lineage. *E. faecium* infection isolates were more virulent than colonization isolates and harbored significantly more *gelE* gene. It appears that infections caused by *E. faecium* isolates carrying *asa1* gene evolved more frequently to death. This finding may be useful to control the spread of *E. faecium* in the hospital environment and in haematological patients.

Descriptors: Vancomycin-Resistant Enterococci; Resistance; Virulence; Electrophoresis, Gel, Pulsed-Field; Genome, Bacterial, Cross Infection.

1. INTRODUÇÃO

Enterococcus são cocos gram-positivos que geralmente se dispõem em pares e cadeias curtas. Esses microrganismos são residentes naturais do trato gastrointestinal, biliar e, em menor número, da vagina e uretra masculina e vêm se tornando agentes de doenças humanas cada vez mais importantes devido, em grande parte, a sua resistência a diversos agentes antimicrobianos aos quais outros estreptococos são geralmente sensíveis. O gênero constitui a segunda causa mais comum de infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS) do trato urinário e feridas e a terceira causa mais comum de bacteremia hospitalar em casuísticas americanas. *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE do inglês Vancomycin Resistant *Enterococcus*) é uma importante causa de IRAS com alta morbidade e mortalidade principalmente na população de pacientes imunocomprometidos (WORTH et al., 2007; KONEMAN et al., 2008).

Os primeiros casos de infecção por VRE foram descritos no Brasil no ano de 1986, e desde então as infecções por este patógeno tem apresentado aumento significativo principalmente na América do Norte (76%), América Latina (48,4%), Europa (31,5%) e Ásia/Região do Pacífico (14,1%) (SIMMER et al, 2015 e KUO et al, 2014). Na última década as infecções de corrente sanguínea (ICS) causadas por *Enterococcus* sp. tornaram-se mais frequentes. De 1995 a 2002 nos EUA, este patógeno foi o terceiro mais identificado, sendo responsável por 9,4% delas. Infecções por enterococos foram significativamente mais frequentes em pacientes neutropênicos. Já em pacientes de Unidade de Terapia Intensiva (UTI), foi o quarto agente mais comum, responsável por 9,8% das ICS. A mortalidade de pacientes em UTI com ICS por enterococo chega a 43%, sendo semelhante à de bacilos gram-negativos não-fermentadores e *Candida* sp. Em unidades hematológicas dos Estados Unidos, este é responsável por 10,3% das ICS (WISPLINGHOFF et al., 2004). Segundo dados coletados de 2006 a 2008 em 97 hospitais pela Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM), publicados pela Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os enterococci foram responsáveis por 5% deste tipo de infecção causadas por microrganismos resistentes a antibióticos. Um estudo publicado por GALES e colaboradores em 2009, analisou cepas de gram-positivos de hospitais brasileiros participantes do programa *Antimicrobial Surveillance Program* (SENTRY) e observou que enquanto apenas 7,8% (49 isolados) das cepas de *E. faecalis* eram resistentes à vancomicina enquanto que isolados de *E. faecium* correspondiam a 65,7% (67 isolados).

Pacientes imunocomprometidos e neutropênicos têm risco elevado de ICS por VRE. Um estudo avaliou pacientes com neutropenia por mais de sete dias e observou infecção em 38% dos pacientes colonizados por VRE sendo infecção de corrente sanguínea (ICS) a mais comum, compreendendo 26% das infecções. Diversos estudos que avaliaram pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH), demonstrou que a incidência de ICS por VRE variou de 3,6 a 22%, e a mortalidade pode ser de até 85% (WEINSTOCK et al., 2007; BOSSAER et al., 2010; KAMBOJ et al., 2010). Um outro estudo realizado em um hospital de Nova Iorque, EUA, descreveu VRE como o patógeno mais frequente em casos de ICS nos primeiros 30 dias de TCTH, acometendo 53,5% dos pacientes. O estudo também evidenciou que dos 23 pacientes que tiveram infecção por corrente sanguínea 13 (57%) estavam colonizados por VRE na triagem pré-transplante. (KAMBOJ et al., 2010).

A colonização por VRE ocorre predominantemente no trato gastrointestinal, e diversos fatores estão envolvidos na sua ocorrência, dentre eles: pacientes em estado crítico que necessitam de tratamento com múltiplos antimicrobianos ou por longos períodos de tempo, dialíticos, transplantados e hematológicos apresentam risco aumentado de colonização (WARREN et al., 2003; HUMPHREYS, 2004; ZIRAKZADEH E PATEL, 2006).

1.1 Resistência à Glipopeptídeos – Vancomicina e Teicoplanina

Vancomicina e Teicoplanina são antibióticos geralmente usados no tratamento de infecções por Enterococci resistente aos Beta-lactâmicos. A vancomicina foi descoberta em meados da década de 50 e introduzida na prática clínica no ano de 1958 como alternativa para o tratamento de *Staphylococcus aureus* resistente a penicilina. Seu mecanismo de ação está relacionado a inibição dos estágios tardios da síntese da parede celular. Apesar do crescente número de isolados de *Enterococcus* resistente à vancomicina (ERV) nas últimas décadas, este antibiótico ainda é utilizado como alternativa no tratamento de infecções causadas por este patógeno. (MANDELL et al, 2015). Ainda segundo os autores a teicoplanina surgiu em 1978 e tem seu mecanismo de ação muito similar ao descrito para vancomicina inibindo a síntese da parede celular e pode ser uma boa alternativa no tratamento de infecções causadas por *Enterococci*.

O uso indiscriminado desses antibióticos tem sido identificado em diversos estudos como um importante fator de risco para a existência de infecção e colonização por VRE. (TACCONELLI et al., 2008). Outros fatores também contribuem para sua grande disseminação, como o fato de sua transmissão no ambiente hospitalar ocorrer por contato direto. Portanto a transmissão entre pacientes internados está diretamente associada à higienização das mãos dos profissionais da saúde. (KOBAYASHI, et al., 2010).

O VRE tem uma importância crescente para os infectologistas deve a sua morbidade e mortalidade. KOBAYASHI e colaboradores (2010) descrevem que o uso prolongado da terapia antimicrobiana com vancomicina e outras drogas, como β -lactâmicos e fluoroquinolonas, são fatores de risco associados com a disseminação desse patógeno no ambiente hospitalar.

1.2 Genes de resistência ao glicopeptídeos Vancomicina e Teicoplanina

Enterococos resistente à vancomicina foram descritos inicialmente na Europa em meados de 1980. No Brasil, só foram relatados dez anos mais tarde, e os primeiros casos foram identificados no Paraná no ano de 1986 (DALLA COSTA et al, 1998) e São Paulo (CONCEIÇÃO et al., 2011).

Os fenótipos de enterococo associados à resistência aos glicopeptídeos são distinguidos de acordo com o grau de resistência, capacidade de indução de resistência e capacidade de transferência de resistência à vancomicina e teicoplanina, até o momento foram descritos os seguintes genes de resistência: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM*, *vanN*, *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanX*, and *vanZ* (LIU et al., 2011, PALMER et al., 2010; SUTTER et al, 2010, Yang et al, 2015

O genótipo *vanA* se caracteriza pela aquisição de resistência indutível a ambos os glicopeptídeos (Vancomicina e Teicoplanina) mediada pelo transposon *Tn1546* responsável por propagar essa resistência entre os isolados de Enterococos. A heterogeneidade genética de *Tn1546* é devida a presença de sequência de inserção (IS). Essas IS são altamente móveis causando alterações estruturais em alguns elementos do grupo *vanA*. Já o fenótipo *vanB* é caracterizado pela aquisição de resistência indutível a diversas concentrações de vancomicina, mas não para teicoplanina (ZIRAKZADEH E PATEL, 2006, GAGNON et al., 2013).

O gene *vanA*, quando presente, induz à elevados níveis de resistência a glicopeptídeos, apresentando concentrações inibitórias mínimas (CIM) para vancomicina

> 64 µg/mL. Isolados que possuem o gene *vanB* costumam induzir uma resistência mais baixa com CIM para vancomicina de 32 µg/mL e são susceptíveis a teicoplanina, porém, sabe-se atualmente que microrganismos portadores do gene *vanB* podem apresentar CIM que variam de 4 até >1.000 µg/mL, enquanto a susceptibilidade a teicoplanina é conservada conforme relataram Sood e colaboradores em 2008. Os autores ainda descreveram que a resistência adquirida pode ocorrer devido a uma mutação ou pela aquisição de material genético de outros microrganismos. De fato, Pattel et al. (1997) já associavam os genes *vanA* e *vanB* a surtos de *Enterococcus* resistentes à vancomicina relacionando este tipo de resistência adquirida à transferência da resistência para outros gêneros, principalmente *Staphylococcus aureus*, devido a presença dos genes de resistência em elementos móveis do genoma.

1.3 Resistência a aminoglicosídeos – Vancomicina e Estreptomicina

Enterococci em sua maioria são resistentes aos aminoglicosídeos com concentrações inibitórias mínimas (CIM) que variam de 4 a 256 µg/mL. Essa resistência se dá pela presença de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. Entretanto, apesar de altos níveis de resistência aos aminoglicosídeos, os mesmos podem apresentar efeito sinérgico quando combinados outros antimicrobianos como penicilina e vancomicina no tratamento de infecções por este agente. (MANDELL et al, 2015)

1.4 Resistência a linezolida

Uma alternativa encontrada para o tratamento de infecções por VRE é o uso da linezolida. Este antibiótico faz parte da classe das Oxazolidinones e apresenta boa resposta clínica no tratamento de diversos microrganismos gram-positivos. Além disso, é considerado uma opção para o tratamento de infecções por VRE, e tem sido utilizado nos pacientes com neutropenia febril colonizados por agente. (WEIDNER-WELLS, M. A., 2004; MIRANDA, et al., 2010; SCHEETZ et al., 2010).

Nos últimos anos houve um aumento gradativo no uso de linezolida, o que pode estar associado ao aparecimento de isolados de *Enterococci* resistente a esta classe de antimicrobiano. (McLaughlin et al, 2013 e Spiliopoulou et al 2011).

Os isolados resistentes geralmente apresentam mutação nos nucleotídeos G2576T, essas mutações acontecem em sítios alvo dentro de um número variável de cópias no domínio V do 23S rRNA. Os autores sugerem que esses isolados podem ser mais

virulentos que os isolados resistentes somente à vancomicina, e que infecções por essas cepas aumentam em 42% a mortalidade dos pacientes. (KLUPP, et al., 2016).

No Brasil, Almeida e colaboradores (2014) descrevem os primeiros isolados de *Enterococcus* resistente à linezolida em hospital no estado de São Paulo identificados de culturas de sangue e urina de diferentes pacientes. Os autores não avaliaram nenhum outro mecanismo de resistência entre os 8 isolados (6 isolados de *E. faecalis* e 2 isolados de *E. faecium*) no estudo em questão.

1.5 Virulência

Sabe-se hoje que microrganismos do gênero *Enterococcus* possuem diversos mecanismos de virulência e, além disso, a habilidade em adquirir outros genes (RICE et al., 2003; VANKERCKHOVEN et al., 2004; BILLSTRÖN et al., 2008; POETA et al., 2008).

Para que pudessem entender melhor os genes relacionados à virulência em *Enterococcus*, WORTH e colaboradores (2007) estudaram características de virulência em relação à prevalência dos genes: Substância de agregação (*asa1*), gelatinase (*gelE*), citolisina (*cylA*), proteína de superfície do enterococo (*esp*) e hialuronidase (*hyl*) em isolados clínicos. Além disso, os autores avaliaram também a relação entre a presença dos genes e o espectro clínico da doença.

Quanto aos fatores de virulência em questão, a substância de agregação ocasiona um aumento da aderência da bactéria nas células tubulares renais e nas células do endocárdio. Ela é codificada pelo gene *asa1*, presente em plasmídeos. Já a gelatinase, codificada pelo gene *gelE*, é uma endopeptidase celular que hidrolisa colágeno, gelatina e pequenos peptídeos e tem sido observada em estudos de endocardites com modelos animais. Outro fator de virulência relacionado a genes carregados por plasmídeo, a citolisina, consiste em dois componentes: lysin (L) e ativador (A). Porém, neste caso, os genes relacionados podem se encontrar também integrados ao cromossomo bacteriano. Isto porque o *operon* da citolisina possui cinco genes: *cylL1*, *cylL2*, *cylLM*, e *cylLB* que estão envolvidos na expressão do componente L, e *cylA*, necessário para a expressão do componente A (VANKERCKHOVEN et al., 2004).

Outro fator de virulência importante é o gene da proteína de superfície do enterococo codificado pelo gene *esp* que está associado com colonização do trato urinário e formação de biofilme e é descrito em *E. faecalis* e *E. faecium*. A presença de uma

variante do gene *esp* em *E. faecium* também foi associada à disseminação hospitalar de acordo com CHANG e colaboradores em 2009. Shankar e colaboradores demonstraram a presença do gene *esp* em 32,3% das cepas de *E. faecalis* isoladas de ICS e endocardite, enquanto que apenas 3% das cepas isoladas de fezes apresentavam este mesmo gene. Além disso, outros dois estudos relatam surtos por *E. faecium* resistente à vancomicina com alta prevalência do gene *esp* nestas cepas (SHANKAR et al., 1999; WILLEMS et al., 2001; LEAVIS et al., 2003)

No caso de infecções, já foi descrito o gene *esp* em 40% dos *E. faecium* resistentes à vancomicina, e em 57% das sensíveis. Embora este mesmo estudo mostre menor prevalência do gene em amostras de vigilância, tanto nas cepas resistentes à vancomicina (6%), como nas sensíveis (nenhuma cepa contendo gene *esp*), acredita-se que este gene também possa estar associado com colonização do trato urinário (WILLEMS et al., 2001; LEAVIS et al., 2003). Já em pacientes submetidos a transplante de medula óssea é descrita a presença do gene *esp*, tanto em infecções, como em colonização por VRE, sem impacto na mortalidade (SCHMIDT-HIEBER et al., 2007; WORTH et al., 2008).

Outro fator de virulência, a hidrolase glicosil, codificada pelo gene *hyl* em muitos organismos bacterianos, facilita a colonização intestinal. FREITAS e colaboradores (2010) apontam que a proteína *hyl_{efm}* mostra uma equivalência com glucosamidases ou hialuronidases, as quais eram consideradas fatores de virulência em outros gram-positivos, porém, mais recentemente, foi descrita como um glicosídeo hidrolase. O gene *hyl* foi descrito em *E. faecium* resistentes à ampicilina e sensíveis à vancomicina nos Estados Unidos e posteriormente identificado em *E. faecium* resistentes a ampicilina e vancomicina. Este gene também está localizado em plasmídeos que podem carregar outros genes de virulência e genes que conferem resistência a glicopeptídeos (RICE et al, 2002).

Em um estudo retrospectivo conduzido no Hospital das Clinicas de Barcelona na Espanha, López e colaboradores (2013) evidenciaram o aumento de um complexo clonal CC17 de isolados de *E. faecium* associado à presença do gene de virulência *esp* e em alguns casos do gene *hyl*. Os autores sugeriram que o predomínio de um complexo clonal mais virulento estaria associado ao aumento das infecções humanas, disseminação e surtos em ambientes hospitalares em todo o mundo.

Palazzo e colaboradores (2011), descreveram isolados de um surto em um hospital de Campinas que pertenciam ao CC17 até então raro no Brasil. Os autores observaram

que as cepas pertencentes a este complexo clonal exibiam um perfil de virulência característico incluindo o gene *hyl_{efm}* raramente detectado em isolados no Brasil.

1.6 Sequenciamento completo de genoma

Uma análise detalhada da virulência de isolados de VRE pode ser feita com um sequenciamento completo do genoma, através do qual é possível apontar a presença de todos os genes de importância para a bactéria. Outro benefício do sequenciamento completo do genoma é a comparação entre clones relacionados por meio da determinação de Sequências Tipo (ST) realizada através de uma sequência de sete genes que diferem e definem o perfil alélico dos isolados e a árvore de Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP) difere indivíduos através da variação na sequência de DNA (Maiden et al, 1998)

O método de sequenciamento do genoma completo do genoma pela técnica de *Ion Torrent* é uma tecnologia utilizada no Brasil, principalmente no sequenciamento de procariotos, apresenta maior rapidez e precisão que os métodos até então utilizados. A reação se baseia em circuitos integrados com sensores de íons de hidrogênio liberados pela DNA polimerase no processo do sequenciamento e a reação toda ocorre em um *chip*. Para bactérias a metodologia alcançou uma precisão de 99,99% (ROTHBERG et al., 2011). Alguns estudos já utilizaram a tecnologia em bactérias para comparação genômica e caracterização de um surto de *Escherichia coli* e detecção de mutações em genes reguladores de resistência de *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina (MELLMANN ET AL., 2001; HOWDEN ET AL., 2011).

Outra tecnologia disponível usada para sequenciamento completo do genoma bacteriano é a plataforma Illumina. Esta tecnologia apresenta menores custos dos reagentes, melhor cobertura do sequenciamento e número maior de leituras (*reads*). A quantidade de dados de sequenciamento por corrida obtida por esse processo gira em torno de 600Gb. O sequenciador Miseq tem capacidade de gerar de 0,3-15Gb de dados, promovendo resultados com maior rapidez e para aplicação em laboratórios clínicos tem sido a plataforma de escolha. (KULSKI, 2016).

Segundo Lam e colaboradores (2012) a análise do genoma é importante para verificar a relação e a diversidade entre os isolados, revelando diferenças significativas no conteúdo do gene das cepas de *E. faecium* e destacando a frequência e a facilidade com que este microrganismo adquire e perde elementos móveis, e que essa peculiaridade é responsável, em grande parte pelas diferentes propriedades exibidas pelos isolados

clínicos. Em seu estudo, Lam e colaboradores (2012) descreveram o genoma de *E. faecium* (cepa Aus0004) com um único cromossomo circular de 2.955.294 bp (38% de GC) e três plasmídeos circulares: Aus004_p1 (56.520 bp), Aus004_p2 (4.119 bp) e Aus004_p3 (3.847 bp). Nessa cepa em particular, foram observados os genes de virulência *esp* e *acm* (*collagen-binding adhesin*) que estão associados à colonização e a infecção por esse agente. Além disso, os autores descrevem genes que codificam outros fatores de virulência e que foram identificados em *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de sangue, dentre eles, gelatinase, substância de agregação, lipase e hemaglutinina, a cepa de *E. faecium* Aus0004, não apresenta o gene da hyaluronidase (*hyl*).

Outro genoma utilizado como referência na comparação dos isolados é um isolado de *Enterococcus faecium* (AUS0085), descrito por Lam e colaboradores (2013), este isolado apresenta genoma circular de 2,994,661 bp (38.2%), esta cepa apresenta seis plasmídeos circulares: Aus0085_p1 (130.176 pb), Aus0085_p2 (67.314 pb), Aus0085_p3 (31.004 pb), Aus0085_p4 (9.319 pb), Aus0085_p5 (4.072 pb) e Aus0085_p6 (2.189 pb). Os autores observaram nesta cepa a presença de genes relacionados a virulência, dentre eles os genes *esp* e *acm* (*collagen-binding adhesin*), genes estes associados a colonização e aumento da virulência.

Em resumo, *Enterococci* são agentes frequentes das infecções hospitalares, em particular em pacientes hematológicos e TCTH. Além disso, pacientes imunocomprometidos são mais susceptíveis a infecções causadas por VRE tanto pelo tempo de permanência hospitalar como pelo seu sistema imune debilitado. Este fato é ainda mais agravante dado que este patógeno apresenta genes de resistência que dificultam o tratamento do paciente e que podem disseminar por meio de genéticos móveis.

2. JUSTIFICATIVA

VRE é um importante agente de colonização e infecção em particular em pacientes hematológicos e submetidos à TCTH. Poucos estudos, entretanto, avaliaram clonalidade e virulência de cepas colonizantes e cepas isoladas de infecção. Essas informações são importantes para o delineamento de ações voltadas ao controle e prevenção desse agente nesta população de pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos principais

Determinar a linhagem clonal, virulência e resistência de isolados de VRE na unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO) e Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

3.2 Objetivos secundários

Avaliar as características fenotípicas e genotípicas comparando isolados de colonização e infecção de pacientes com doenças hematológicas e/ou submetidos a transplante de medula óssea.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Subprojeto de um principal intitulado “Medidas de Prevenção e Controle de Enterococo Resistente à vancomicina em Unidade Hematológica do HC-FMUSP”, que tem aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa (CAPPesq) sob número 0785/10 (Anexo 1)

4.1 Local do estudo

Os dados foram coletados em um hospital universitário terciário em São Paulo, que possui 2.200 leitos das quais 21 estão localizados na unidade de hematologia. Esta unidade é dividida em dois setores: um para pacientes com doenças onco-hematológicas e outro para pacientes submetidos à TCTH e realiza de dez a doze transplantes entre autólogos e alogênicos por mês. Existe um dispensador de álcool-gel em cada um dos 11 quartos da unidade, e duas pias exclusivas para higienização das mãos na área comum de cada setor. Há apenas um quarto de isolamento com um leito em cada unidade. Os outros quartos possuem dois leitos, e a unidade onco-hematológica possui um quarto com três leitos. Todos os leitos possuem materiais de uso individual, entretanto o banheiro é compartilhado entre os pacientes.

4.2 Cultura de Vigilância de VRE

Desde 2001 existe uma rotina semanal de coleta de swab retal ou coprocultura que são semeados em ágar Mueller-Hinton com 6µg / ml de vancomicina para investigação de colonização por VRE. Esta rotina não se aplica aos pacientes com colonização por VRE já conhecida, que permanecem em precaução de contato até a alta.

4.3 Desenho do estudo

Estudo retrospectivo para avaliação dos dados de colonização e infecção por VRE coletados pela Subcomissão de Controle de Infecção Hospitalar do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HCFMUSP) no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2014. Os isolados de infecção foram obtidos a partir de amostras de sangue total coletado de cateter e de via periférica e os isolados de colonização foram provenientes de culturas de vigilância de *swabs* retais e amostras de fezes. Os pacientes eram classificados como colonizados por VRE se os isolados fossem identificados na cultura de vigilância (*swab* retal ou fezes) ou escarro e infectados com

base nos critérios do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC). (HORAN et al, 2008).

4.4 Estudo populacional

Foram avaliados 72 pacientes internados na Unidade HSCT em 10 anos (2005 a 2014) para obtenção de variáveis clínicas e demográficas, sexo, idade, doença de base, tempo de internação, transplante de medula óssea, tipo de transplante, colonização de VRE antes da infecção e desfecho clínicos.

4.5 Análise estatística

Dados clínicos e demográficos como idade, sexo, tempo de hospitalização, tempo de colonização até infecção, doença de base, mortalidade e desfecho em 14 dias foram avaliados.

Foram calculadas variáveis contínuas como média e desvio padrão e para variáveis categóricas calculamos a frequência. A proporção de genes de virulência em isolados de infecção e colonização foram comparados assim como a proporção de genes de virulência nos isolados de infecção e evolução para óbito. O teste de Fisher foi usado para analisar dos dados (Epiinfo v.7, CDC, Atlanta, EUA) e o valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A Figura 01 descreve o fluxograma de trabalho realizado durante o estudo.

Figura 1: Fluxograma de experimentos realizados.

4.6 Identificação dos isolados

O isolamento e a identificação dos microrganismos foram realizados primeiramente no Laboratório de Microbiologia do Instituto Central do HC-FMUSP, por meio de provas bioquímicas convencionais e por meio do sistema de identificação automatizado Vitek® (Laboratório bioMérieux) e posteriormente confirmadas no laboratório de Investigação Médica (Bacteriologia) LIM54 da FMUSP por meio de kit de identificação API 20 Strep (bioMérieux's API® *identification*).

4.7 Detecção dos genes de resistência *vanA* e *vanB* pela técnica de reação em cadeia da polimerase multiplex

O DNA utilizado em todas as reações em cadeia da polimerase (PCR) tanto para os genes de resistência quanto para os genes de virulência foi obtido a partir de uma cultura bacteriana overnight a 37°C. A extração foi realizada utilizando kit comercial Illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin Kit GE Healthcare – UK.

A partir do DNA extraído, a amplificação dos genes de resistência *vanA* e *vanB* foram verificadas através de uma reação de PCR multiplex, onde para cada reação foi adicionado 1 µL de DNA em 24 µL de mix de PCR contendo 0,15 µM do iniciador *vanA* (tabela 1) e 0,30 µM do iniciador *vanB* (Quadro 1) 1,25 U da enzima Taq polimerase

(Platinum® Taq DNA Polymerase Invitrogen), 200 µM de desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 1,5 mM MgCl₂. As amostras foram submetidas a uma temperatura de 94°C por 10 minutos e 45 ciclos de amplificação compreendendo a desnaturação (94° por 30 segundos), anelamento (50°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 1 minuto) em uma temperatura final de 72°C por 10 minutos (PETRICH et al. 1999).

Quadro 1 – Iniciadores utilizados para detecção dos genes de resistência

Gene	Iniciador	Sequência (5' – 3')	Tamanho do produto da reação	Anelamento (T°C)
<i>vanA</i>	<i>vanA</i> -F <i>vanA</i> -R	GCTGCGATATTCAAAGCTCA CAGTACAATGCGGCCGTTA	545pb	50°C
<i>vanB</i>	<i>vanB</i> -F <i>vanB</i> -R	ATGGGAAGCCGATAGTCTC GTTACGCCAAAGGACGAAC	368pb	50°C

4.8 Detecção do gene de resistência a linezolida pela técnica de PCR

Para detectar a presença do gene de resistência a linezolida duas reações de PCR foram realizadas, onde para cada reação (A e B) foram adicionados 5 µL de DNA extraído usando o kit comercial (KIT illustra™ bactéria genomicPrep Mini Spin Kit GE Helathcare – UK) a partir de uma cultura isolada em 20 µL de mix de PCR contendo 0,2 µM do iniciador 23S (Quadro 2), 1,50 U da enzima Taq polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase Invitrogen), 200 µM de desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 1,5 mM MgCl₂. As amostras foram submetidas a uma temperatura de 94° por 5 minutos em 30 ciclos de amplificação compreendendo a desnaturação (94° por 30 segundos), anelamento (52° por 30 segundos) e extensão (72° por 30 segundos) em uma temperatura final de 72° por 5 minutos. (KRAWCZYK et al, 2003).

Quadro 2 – Iniciadores utilizados para detecção do gene de resistência a linezolida

Gene	Iniciador	Sequência (5' – 3')	Tamanho do produto da reação	Anelamento (T°C)
23S Reação A	23S-F 23SM-R	GGTGGTTCCGCATGG CGTTCTGAACCCAGCTA	197pb	52°C
23S Reação B	23S-F 23SW-R	GGTGGTTCCGCATGG CGTTCTGAACCCAGCTC	197pb	56°C

4.9 Detecção dos genes de virulência *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp* e *hylefm* pela técnica PCR multiplex

Para detectar a presença dos genes de virulência *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp* e *hyl* (Quadro 3) foi utilizada a técnica de PCR multiplex, onde para cada 50 µL de mix de PCR foram utilizados 5 µL de DNA extraído através de kit comercial (KIT illustra™ bactéria genomicPrep Mini Spin Kit GE Helathcare – UK) a partir de uma cultura isolada, 0,1 µM dos iniciadores dos genes *asa1*, *gelE* e *hylefm*, e 0,2 µM dos iniciadores de *esp* e *cylA*, 2,5 U de Taq polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase Invitrogen), 200 µM de desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) e 1,0 mM de MgCl₂. As amostras foram submetidas a uma temperatura inicial de 94°C por 15 minutos e 35 ciclos de amplificação compreendendo a desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (56°C por 1 minuto) e extensão (72°C por 1 minuto) em uma temperatura final 72°C por 10 minutos (VANKERCKHOVEN et al. 2008).

Quadro 3 – Iniciadores utilizados para detecção dos genes de virulência

Gene	Iniciador	Sequência (5' - 3')	Tamanho do produto da Reação	Anelamento (T°C)
<i>asa1</i>	ASA11 ASA12	GCACGCTATTACGAACATATGA TAAGAAAGAACATCACCACGA	375pb	56°C
<i>gelE</i>	GEL 11 GEL 12	TATGACAATGCTTTTGGGAT AGATGCACCCGAAATAATATA	213pb	56°C
<i>cylA</i>	CYT I CYT IIb	ACTCGGGGATTGATAGGC GCTGCTAAAGCTGCGCTT	688pb	56°C
<i>esp</i>	ESP 14F ESP 12R	AGATTTCATCTTTGATTCTTGG AATTGATTCTTTAGCATCTGG	510pb	56°C
<i>hyl</i>	HYL n1 HYL n2	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	276pb	56°C

Um controle positivo foi padronizado, sequenciado e utilizado em todas as reações de PCR para o gene de resistência (*vanA*) e virulência (*esp*, *asa1*, *gelE*, *cylA* e *hyl*). O primer 16S foi utilizado como controle das reações.

4.10 Detecção do perfil clonal pela técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado

Para a verificação do perfil clonal dos isolados foi utilizado o método de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) onde os isolados de *Enterococci* foram semeados em ágar-sangue de carneiro a 5% (AS) e incubados em aerobiose a 35°C por 18 a 24 horas. Posteriormente foram repicados em caldo soja-tripticaséina (TSB) e incubados a 37°C por 24h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm durante 20 minutos e o sedimento foi ressuspensão em 1mL de solução salina estéril e homogeneizados em agitador por 1 minuto. Após esse processo, a suspensão bacteriana foi transferida para microtubos de 2 mL previamente pesados. Essa suspensão foi centrifugada a 13000 rpm durante 30 segundos e o sobrenadante descartado. Esse procedimento foi repetido três vezes. O sedimento foi então pesado e ressuspensão em EDTA (25 mM pH 8,0), para uma concentração final de massa bacteriana de 100 µg/µL. Desta suspensão, 25µl foram transferidos para um tubo de micro centrífuga contendo 225µl de tampão TEN (EDTA 0,5M, pH 7,0; EDTA 0,5M pH 8,0; Trisma base 1M pH 7,0; Trisma base 1M pH 8,0; NaCl; N-lauril sarcosil; Brij 58; Deoxicolato de sódio), adicionado de 250 µl de agarose de baixo ponto de fusão a 2% (Sigma, USA) e 20 µl de solução de lisozima (100 µg/ml) (Sigma USA). Esta suspensão foi, então, transferida para os moldes e permaneceu por 30 minutos a 4°C, para que os blocos solidificassem. Após esta etapa, os blocos foram transferidos para uma placa de cultura de células de 24 poços, contendo 2 mL de tampão EC (EDTA 0,5M, pH 7,0; EDTA 0,5M pH 8,0; Trisma base 1M pH 7,0; Trisma base 1M pH 8,0; NaCl; N-lauril sarcosil; Brij 58; Deoxicolato de sódio) em cada poço e incubadas a 37°C por um período de cinco horas, sob agitação suave. Após a incubação, os blocos foram lavados com 2,5mL de tampão CHEF-TE para Gram-positivo (EDTA 0,5M pH 7,0; EDTA 0,5M pH 8,0; Trisma base 1M pH 7,0; Trisma base 1M pH 8,0), e a seguir incubados com 1 mL de tampão ES (EDTA 625 nM pH 9,3; N-lauril sarcosil 5%) adicionado de 50µL de solução de proteinase K (20mg/ml) (Invitrogen USA) e incubados de 8h a 16h à temperatura de 50°C. Os blocos foram lavados com 2,5mL de tampão CHEF TE para Gram-positivos (EDTA 0,5M pH 7,0; EDTA 0,5M pH 8,0; Trisma base 1M pH 7,0; Trisma base 1M pH 8,0) com quatro lavagens com incubações de uma hora cada, e armazenados nesta solução até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese (PFALLER, 1993).

A digestão do DNA cromossômico foi realizada com a enzima de restrição FastDigest® *SmaI* (CCC↓GGG) (Thermo Fisher Scientific), que reconhece e cliva sequências de nucleotídeos que aparecem poucas vezes ao longo do DNA de *Enterococci* (12 a 20 sítios de restrição). Para o tratamento com enzimas de restrição, um bloco de agarose de cada amostra foi transferido para uma placa de cultura de células de 96 poços contendo 200 µL de tampão DNS (Trisma base 1M pH 8,0; Cloreto de Magnésio 1M). A seguir, o mesmo tampão foi retirado e novamente foram adicionados 200 µl do mesmo, o bloco foi incubado a temperatura ambiente durante uma hora. Este processo foi repetido quatro vezes. Após este período, o tampão DNS (Trisma base 1M pH 8,0; Cloreto de Magnésio 1M) foi substituído por 100 µL de uma solução contendo tampão FastDigest® 1x e 1µL da enzima FastDigest® *SmaI* e, em seguida, incubados por 5 minutos a 37°C.

A eletroforese em campo pulsado foi realizada em gel de agarose a 1% (sigma, USA) em TBE 0,5x (90mM Tris, 90mM ácido bórico, 2mM EDTA [Amersham Pharmacia Biotech, USA]) (SAMBROOK et al., 1989), no equipamento CHEF DRII System (BIO-RAD, USA) com intervalos de tempo de pulso de 5 a 60 segundos por 22 horas, ângulo de 120°, temperatura de 14°C e voltagem de 6,0 volts/cm (PFALLER, 1993).

A seguir, os géis foram corados com solução aquosa contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio (Sigma, USA) e fotografados sob luz ultravioleta. Foi utilizado como padrão de peso molecular Lambda DNA ladder PFG (New England Biolabs, Inc., USA).

Os perfis eletroforéticos gerados foram agrupados utilizando-se o software de bioinformática Bionumerics versão 7.1 (Applied Maths). Fragmentos de DNA foram manualmente verificados e normalizados usando o peso Lambda Marker presente em cada gel. Uma tolerância de 1,5% e otimização de 0,5% foram utilizadas para a comparação de diferentes géis conforme sugerido por Mulvey et al. (2001). O agrupamento de clusters foi realizado e gerado um dendrograma pelo método de Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) e coeficiente Dice de similaridade.

Para definir os *Pulsed Field Type* (PFT) e subtipos encontrados, três níveis de cut off foram seguidos: isolados com similaridade <80% foram considerados diferentes PFT. Os subtipos foram definidos a partir daqueles PFT com coeficiente Dice entre 80-95%. Isolados com similaridade >95% foram considerados idênticos (Faria et al., 2008).

4.11 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

4.11.1 Determinação da concentração inibitória mínima pela técnica de diluição em caldo

Foi realizada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando os seguintes antimicrobianos: vancomicina, teicoplanina, linezolida, gentamicina e estreptomicina para todos os isolados.

As concentrações testadas abrangeram os cortes de 0,25 µg/mL a 256 µg/mL. A solução inicial de 256 µg/mL foi obtida a partir da solução estoque de concentração igual a 10.000 µg/mL. Sempre sendo realizadas diluições do antimicrobiano com o diluente adequado para cada antimicrobiano conforme *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI) 2013. As CIM foram realizadas em microplaca de 96 poços, com meio de cultura Caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado (CMHCA) e incubados conforme preconizados pelo CLSI 2013.

Em todos os poços da coluna 1 foram adicionados 100 µL da diluição a 256 µg/mL do antibiótico testado. Com uma pipeta, foi realizada a diluição seriada do antimicrobiano, pipetando 50 µL do primeiro poço da linha A (A1) para o segundo poço da linha A (A2). Posteriormente, foi realizada a homogeneização com a pipeta e em seguida foram pipetados 50 µL do poço A2 para o A3. Seguiu-se o mesmo procedimento até o poço A11, tendo este um volume final de 100 µL, o qual foi designado como controle de esterilidade (não foram acrescentadas células bacterianas neste poço, com a finalidade de verificar a possível ocorrência de contaminação durante a diluição do antimicrobiano). O último poço de cada linha (A₁₂-H₁₂) foi utilizado como controle de crescimento bacteriano, ou seja, aos 50 µL de meio de cultura CMHCA, foram adicionados mais 50 µL da suspensão bacteriana (diluída 1:100).

A partir de uma placa com crescimento bacteriano de 18 a 24 horas, foi preparada uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL), concentração determinada por espectrofotometria, com densidade óptica de 0,08 a 0,1 em comprimento de onda de 625 nm. Esta suspensão foi diluída 1:100 em solução fisiológica ($\sim 1,5 \times 10^6$ UFC/mL).

Na microplaca foram adicionados 50 µL da suspensão bacteriana diluída nos poços 1 a 10 e no poço 12 de todas as colunas (de A a H). Após o preparo das diluições, a inoculação foi realizada num intervalo máximo de 30 minutos, após isso, as placas

foram incubadas de acordo com as recomendações propostas pelo CLSI (2013). A leitura foi realizada em local iluminado, com auxílio de um espelho para leitura de microplacas. A CIM foi determinada de acordo com a observação macroscópica de crescimento bacteriano nos poços da microplaca por dois pesquisadores e por espectrofotometria utilizando um comprimento de onda de 625 nm.

As leituras do CIMs foram comparadas com os pontos de corte propostos pelo CLSI (2013) e foram reportados como sensível, intermediário ou resistente (Quadro 4).

Quadro 4: Pontos de corte proposto pelo CLSI 2013 para identificação pelo método de Concentração inibitória mínima.

Antimicrobianos	Ponto de corte	Interpretação
Vancomicina	≥ 32 ug/mL	Resistente
Teicoplanina	≥ 32 ug/mL	Resistente
Linezolida	≥ 8 ug/mL	Resistente
Gentamicina (HLAR)	Qualquer Crescimento	Resistente
Estreptomicina (HLAR)	Qualquer Crescimento	Resistente

HLAR: High-Level Aminoglycoside Resistance

4.12 Sequenciamento do genoma bacteriano pelas tecnologias Ion Torrent PGM™ e MiSeq Illumina™.

Dezoito isolados foram submetidos ao sequenciamento do genoma completo. O principal critério de seleção foi um isolado de cada cluster previamente detectado por PFGE, porém, outros critérios foram considerados, tais como: perfil de virulência de acordo com a PCR e um isolado de infecção e colonização dos principais clusters.

Nove isolados foram sequenciados pela tecnologia *Ion Torrent* Personal Genome Machine™ - Life Technologies seguindo a metodologia descrita por ROTHBERG e colaboradores (2011) utilizando Kit comercial para preparação das bibliotecas. A plataforma de sequenciamento Ion Torrent faz parte do sistema de multiusuários da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP). Os dados gerados foram analisados com o auxílio dos softwares CLC Main Workbench 7.5 (CLC Bio, Denmark), Artemis 16.0.0 -

Genome Browser and Annotation Tool (Sanger Institute, UK) e RNAmmer 1.2 Server (Lagesen et al, 2007).

Os outros nove isolados foram sequenciados pela tecnologia MiSeq Illumina. As bibliotecas foram preparadas utilizando kit comercial Nextera XT Illumina de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade das bibliotecas geradas foi avaliada em sistema Tape Station (Agilent). Segmentos pareados de leitura (*paired end reads*) com mais de 500 pares de bases foram processados na plataforma de sequenciamento MiSeq IlluminaTM (corrida com cartucho 2 x 150 pb) do Laboratório de Investigação Médica 15 da rede Premium de multiusuários da USP, locado na Faculdade de Medicina da USP.

Os arquivos gerados foram avaliados pelos programas FastQC v. 0.11.3 e Trimmomatic v. 0.33. A montagem do genoma de novo foi realizada utilizando o programa VelvetOptimiser v. 2.2.5. Os contigs formados foram ordenados pelo Abacas v.1.3.1 usando a cepa referência *Enterococcus faecium* AUS0085, cujo genoma está disponível no site do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

O genoma dos 18 isolados foram anotados com o programa Prokka v. 1.11. (Galens et al. 2011). Os genes de resistência, virulência e Multi Locus Sequence Type (MLST) foram analisados utilizando as bases de dados do site <http://cge.cbs.dtu.dk>: ResFinder, VirulenceFinder e MLSTFinder (KLEINHEINZ et al, 2012) e posteriormente confirmados pela base de dados blast2seq (BLAST2seq - National Center for Biotechnology Information).

As sequências tipo (ST) e a árvore de Single Nucleotide Polymorphism (SNP) foram avaliados utilizando o software de bioinformática Bionumerics v7.6 (Applied Maths NV, Saint-Martens-Latem, Belgium).

5. RESULTADOS

5.1 Dados clínicos e demográficos dos pacientes hematológicos incluídos no estudo.

Um total de oitenta e seis isolados (86) isolados de VRE identificados de oitenta e sete (76) pacientes atendidos na Unidade de transplante de Medula Óssea e Hematologia do Hospital das Clínicas da FMUSP no período do estudo foram avaliados. Das amostras dos 76 pacientes utilizadas neste estudo 42 (55,3%) eram de Infecção e 34 (44,7%) de colonização, a idade dos pacientes variou de 1 a 74 anos com tempo médio de hospitalização de 37,5 dias. Quarenta (52,6%) pacientes com infecção tiveram colonização prévia e o tempo médio de colonização até a infecção foi de 16,9 dias. A principal doença de base foi Leucemia presente em 32 (42,1%) pacientes. Cinquenta e seis (73,6%) pacientes foram submetidos a transplantes e o transplante alogênico foi realizado em 32 (42,1%) pacientes. Quarenta e um (53,9%) pacientes evoluíram a óbito durante a internação e 16 (21,0%) em até 14 dias após detecção da infecção. Outras características clínicas e demográficas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Características de 76 pacientes com doenças hematológicas infectados e ou colonizados por VRE.

Características	Pacientes (n=76)
Sexo Masculino	42 (55,3%)
Idade (anos)	
Média	45,6 (1-74 anos)
Desvio padrão	19,0
Tempo médio hospitalização (dias)	37,5 (4-134 dias)
Colonização	34 (44,7%)
Infecção	42 (55,2%)
Colonização até infecção (pacientes)	03 (3,94%)
Transplante de medula	56 (73,7%)
Transplante alogênico	32 (57,1%)
Infecção	20 (62,5%)
Colonização	12 (37,5%)
Transplante autólogo	16 (28,6%)
Infecção	02 (12,5%)
Colonização	14 (87,5%)
Doença de Base	
Leucemia Mielóide Aguda	21 (27.6%)
Leucemia Linfóide Aguda	09 (11.8%)
Leucemia Aguda	01 (1.3%)
Leucemia Mielóide Crônica	02 (2.6%)
Linfoma	01(1.3%)
Linfoma de Hodgkin	04 (5.3%)
Linfoma não Hodgkin	07 (9.2%)
Linfoma Linfoblástico B	01 (1.3%)
Anemia Aplásica Grave	07 (0.2%)
Óbito	
Óbito Infecção	29 (38,1%)
Óbito Colonização	12 (15,8%)
Óbito em 14 dias	16 (21,0%)
Óbito geral durante a internação	41 (53,9%)

5.2 Testes laboratoriais

Foram avaliados 86 isolados VRE: 80 *Enterococcus faecium* dos quais 45 (56%) eram de infecção (sangue) e 35 (44%) de colonização (fezes e *swab* retal) e 06 isolados de *Enterococcus faecalis*, dos quais 4 (66%) são de infecção (sangue) e 02 (34%) de colonização (fezes e *swab* retal).

5.2.1 Concentração Inibitória Mínima – Diluição em caldo

A resistência à vancomicina foi confirmada em todos os 86 isolados, com valores de CIM acima de ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$.

Para a teicoplanina, seis (7,0%) isolados apresentaram sensibilidade (8 $\mu\text{g/mL}$), oito (9,3%) isolados apresentaram resistência intermediária (16 $\mu\text{g/mL}$) e 72 (83,7%) isolados foram resistentes (19 isolados com CIM de 32 $\mu\text{g/mL}$, 50 com CIM de 64 $\mu\text{g/mL}$ e 3 com CIM de 128 $\mu\text{g/mL}$).

A resistência a gentamicina e estreptomicina em alta concentração (HLAR) esteve presente em 8 (9,3%) com CIM >500 $\mu\text{g/mL}$ e 59 (68,6%) com CIM > 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Somente 01 (1,2%) isolado apresentou resistência à linezolida com CIM ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$. Os valores para CIM 50 e 90 de todos antibióticos testados estão demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2: Determinação de CIM50 e CIM90 por microdiluição para os antibióticos testados nos isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* resistente à vancomicina.

Antibióticos	Intervalo	<i>E. faecium</i>		<i>E. faecalis</i>	
		<i>N=80</i>		<i>N=06</i>	
		MIC50*	MIC90*	MIC50*	MIC90*
Vancomicina	$\leq 4 - \geq 32$	≥ 32	≥ 32	≥ 32	≥ 32
Teicoplanina	$\leq 8 - \geq 32$	64	64	64	64
Gentamicina (HLAR)	$\leq 500 - >500$	<500	<500	1000	1000
Estreptomicina (HLAR)	$\leq 500 - >1000$	2000	2000	<2000	2000
Linezolida	$\leq 1 - \geq 8$	1	2	1	1

HLAR – High-Level Aminoglycoside Resistant *Valores de CIM são expressos em $\mu\text{g/mL}$

5.3 Testes genotípicos

5.3.1 Detecção dos genes de resistência (*vanA* e *vanB*) pela técnica de PCR multiplex

Todos os isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* foram positivos para o gene *vanA* (100%). O gene de resistência *vanA* foi depositado no DDBJ/EMBL/GenBank sob o número de acesso: JN089770. Nenhum isolado apresentou positividade para o gene *vanB*.

PM: Peso molecular 100bp (InVitrogen, USA); Colunas: 1 Controle positivo; 2 a 9 isolados positivos para o gene *vanA*. Colunas 10 e 11: controles negativos

Figura 2 – PCR para detecção do gene de resistência *vanA* em isolados de *E. faecium* e *E. faecalis*

5.3.2 Detecção do gene de resistência a linezolida

A resistência a linezolida identificada pela metodologia de diluição em caldo em um isolado obtido de amostra clínica de sangue periférico, foi confirmada através da técnica de PCR. A confirmação se deu a partir da amplificação do gene nas duas reações como pode ser visualizado na Figura 3.

PM: Peso molecular 100bp (InVitrogen, USA); Reação A - Colunas: 1 Controle negativo; 2 e 3 isolados positivos para o gene resistência a linezolida; 4 e 5 isolados negativos; 6 e 7 controles negativo e água. Reação B – Colunas: 1 Controle negativo; 2 e 3 isolados positivos para o gene resistência a linezolida; 4 e 5 isolados negativos; 6 e 7 controles negativo e água.

Figura 3 – PCR para detecção da resistência à Linezolida

5.3.3 Detecção dos genes de virulência por PCR multiplex

A análise do perfil de virulência foi realizada em todos os isolados e os genes de virulência avaliados foram depositados no DDBJ/EMBL/GenBank sob o número de acesso: KY654067 (*esp*), KY654068 (*asa1*), KY654071 (*gelE*), KY654069 (*cylA*), KY654070 (*hyl_{efm}*).

Entre os 45 isolados de *E. faecium* de infecção, todos (100%) apresentaram positividade para o gene *esp*, para o gene *asa1* a positividade foi observada em 34 (73,3%), já para o gene *gelE*, 36 (80,0%) apresentaram positividade. Nenhum isolado apresentou positividade para os genes *cylA* e *hyl_{efm}*.

Os trinta e cinco isolados de *E. faecium* de colonização, 34 (97,1%) apresentaram positividade para o gene *esp*, já para o gene *asa1* a positividade foi observada em 21 (60,0%) isolados, a presença do gene *gelE* foi observada em 18 (51,4%), nenhum isolado de colonização apresentou positividade para o gene *cylA* e somente 01 (2,85%) isolado foi positivo para o gene *hyl_{efm}*.

Os resultados obtidos evidenciam que os isolados de *E. faecium* de infecção apresentaram um perfil de virulência diferente quando comparados com os isolados de colonização (Tabela 3).

Tabela 3: Detecção do perfil de virulência dos isolados de *Enterococcus faecium* de infecção e colonização.

Genes de virulência PCR	VRE Infecção N=45 (%)	VRE Colonização N=35 (%)	<i>p</i>
<i>esp</i>	45 (100)	34 (97,1)	0,44
<i>asa1</i>	34 (75,5)	21 (60,0)	0,15
<i>gelE</i>	36 (80,0)	18 (51,4)	0,008
<i>cylA</i>	0	0	N/A
<i>hyl_{efm}</i>	0	1 (2,8)	N/A

Legenda: *esp*: proteína superfície enterococcus; *asa1*: Substância de agregação; *gelE*: Gelatinase; *cylA*: Citolisina; *hyl_{efm}*: Hyaluronidase; N/A: Não avaliado

Entre os 04 isolados de *E. faecalis* de infecção, todos (100%) apresentaram positividade para os genes *esp*, *asa1* e *gelE*. Nenhum isolado apresentou positividade para os genes *hyl_{efm}* e *cylA*

Os 02 isolados de *E. faecalis* de colonização apresentaram positividade para o gene *gelE* e somente um isolado foi positivo para o gene *asa1*. Nenhum isolado apresentou positividade para os genes *esp*, *hyl_{efm}* e *cylA*

Colunas: 1, 2, 3 e 4: controles positivos para *esp*, *hyl_{efm}*, *asa1* e *gelE*.. Colunas 5 a 8 isolados positivos. Coluna 09: controle negativo. Coluna 11: PM: Peso molecular 100bp (InVitrogen, USA);

Figura 4 – PCR multiplex dos genes de virulência *esp*, *asa1*, *gelE* e *hyl_{efm}* em isolados de VRE.

Foi realizada associação entre a presença de genes de virulência e a mortalidade entre os pacientes com infecção e colonização por VRE. (Tabela 4).

Tabela 4: Associação da mortalidade e presença dos genes de virulência entre os 42 pacientes infectados e 34 colonizados por VRE.

			Genes de virulência														
			<i>esp</i>			<i>asa1</i>			<i>gelE</i>			<i>cylA</i>			<i>hly_{efm}</i>		
	Pacientes	Pacientes	Sobreviveram	óbito	<i>p</i>	Sobreviveram	óbito	<i>p</i>	Sobreviveram	óbito	<i>p</i>	Sobreviveram	óbito	<i>p</i>	Sobreviveram	óbito	<i>p</i>
	Sobreviveram	óbito															
	N=35	N=41															
Isolados																	
infecção	n=29	n=13	29(100)	13(100)	1.000	26(89.6)	7(53.8)	0.015	25(86.2)	9(69.2)	0.226	0	0	N/A*	0	0	N/A*
(n=42)																	
Isolados																	
colonização	n=22	n=12	20(90.9)	10(83.3)	0.601	8(36.4)	4(33.3)	1.000	6(27.3)	3(25.0)	1.000	0	0	N/A*	0	1(4.5)	N/A*
(n=34)																	

*N/A = Não avaliado

5.4 Detecção do perfil clonal por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado

Foi realizada Eletroforese em campo pulsado de todos os isolados de *E. faecium* (n=80), sendo 45 de infecção e 35 de colonização e dos 6 isolados de *E. faecalis* sendo 04 isolados de infecção e 02 isolados de colonização. O dendrograma gerado identificou 15 diferentes *PFT* entre os isolados de *E. faecium* e 6 entre os isolados de *E. faecalis*.

5.4.1 Perfis moleculares observados entre os isolados de *E. faecium* e *E. faecalis*.

No dendrograma representado na Figura 5 pode-se observar a distribuição dos isolados de *E. faecium* de infecção e colonização, de acordo com os genes de virulência, *PFT*, sitio de isolamento, data de isolamento, CIM para linezolida, gentamicina (HLAR) e estreptomicina (HLAR).

Na análise dos perfis moleculares de *E. faecium*, um perfil predominante (*cluster A*) com 16 isolados foi observado, sendo 13 isolados de infecção (02 isolados de 2006, 06 isolados em 2007 e 04 isolados de 2008) e 03 de colonização (02 isolados em 2008 e 01 isolado em 2014). Todos apresentaram positividade para o gene *esp* e o gene *asa1* esteve presente em 05 isolados. Para o gene *gelE*, 07 isolados foram positivos. Nenhum isolado apresentou deste cluster apresentou positividade para os genes *cylA* e *hyl_{efm}*. (Tabela 5)

Um segundo cluster com 15 isolados (*cluster B*) foi observado onde 14 eram de infecção e somente um isolado de colonização. Todos os isolados foram positivos para os genes *esp* e *gelE*. Um isolado pertencente a este cluster foi negativo para o gene *asa1*.

Um clusters com 08 isolados (*Cluster C*), 03 de infecção e 05 de colonização e todos foram positivos para os genes *esp*. Entre os isolados de infecção, o gene *gelE* e *asa1* esteve presente em 02 isolados. Já entre os isolados de colonização a presença do gene *gelE* foi observada em 03 isolados, enquanto que o gene *asa1* foi observado em 04 isolados.

Um outro *cluster* com 6 isolados (*cluster D*) todos de infecção e todos do ano de 2006 apresentaram positividade para os genes *esp*, *asa1* e *gelE*.

Foi identificado 13 isolados com perfis diferentes não pertencentes a nenhum *cluster*, sendo 20 de infecção e 26 de colonização. Dos isolados de infecção, todos foram positivos para o gene *esp*, 16 isolados foram positivos para o gene *asa1* e 15 isolados para o gene *gelE*. Entre os isolados de colonização, 24 apresentaram positividade para o gene *esp*. Dez isolados foram positivos para o gene *asa1* e 7 isolados foram positivos para o gene *gelE*. Um isolado apresentou positividade para o gene *hyl_{efm}*. Nenhum dos isolados tanto de infecção como de colonização apresentaram positividade para o gene *cyl*.

Na análise do dendrograma foi observado também outros nove *clusters* menores (06 isolados de infecção e 18 isolados de colonização).

Dos 06 isolados de *E. faecalis*, 04 de infecção e 02 de colonização, cinco diferentes PFT foram observados.

Figura 6: Dendrograma representando os 06 isolados de *E. faecalis* identificados por PFGE.

Foi realizada a comparação dos perfis moleculares e genes de virulência dos isolados de *E. faecalis* de infecção e observou-se que não houve diferença entre os perfis e os genes. Todos os isolados apresentaram positividade para os genes *esp*, *asa1*, *gelE*. E nenhum isolado foi positivo para os genes *cylA* e *hylefm*. Apesar de quatro isolados (02 isolados de *E. faecium* e 02 isolados de *E. faecalis*) não apresentarem positividade para o gene *esp*, a casuística é muito pequena para associar e atribuir a mortalidade para esse gene.

5.5 Análise do genoma bacteriano dos isolados sequenciados pelas plataformas Ion Torrent e Illumina MiSeq

Dezessete isolados de *E. faecium* sendo 04 de infecção e 13 de colonização e 01 isolado de *E. faecalis* de infecção foram submetidos a sequenciamento durante o estudo. Todos os isolados de *E. faecium* pertencem ao grupo 1 do complexo clonal 17. O isolado de *E. faecalis* pertence ao complexo clonal 9. Verificou-se na análise dos dados gerados pelas duas metodologias que não houve diferenças significativas entre os isolados. Mostrando assim que amostras sequenciadas por diferentes metodologias se diferem no processo de preparo das amostras e na quantidade de dados gerados pelo sequenciamento.

Nosso estudo evidenciou um isolado com resistência a linezolida (amostra 1558). A resistência a linezolida foi caracterizada pela presença da mutação (G2576T) na subunidade do gene 23S do rRNA a partir do mapeamento das *reads* e presença do SNP. Durante a análise do MLST deste isolado foi observado um perfil diferente no alelo PstS, caracterizando assim um novo ST (987).

Os dados estatísticos obtidos no sequenciamento tais como complexo clonal (CC), MLST, tamanho do genoma, N50 e conteúdo GC estão evidenciados no Anexo 2.

O genoma completo dos isolados sequenciados foram depositados no DDBJ/EMBL/GenBank e podem ser consultados através dos números de acesso: MVGM000000000 (554), MVGK000000000 (563), MVGN000000000 (714), MVGL000000000 (716), MVGO000000000 (1546), MVGP000000000 (1547), LBCV010000000 (1558), MVGJ000000000 (1759), MVGE000000000 (918), MVGD000000000 (1530), MVGF000000000 (1586), MVGG000000000 (1590), MVGH000000000 (4247), MVGI000000000 (4275), MXAS000000000 (559), MXAT000000000 (695), MXAU000000000 (699) e MVGQ000000000 (690).

A análise da presença de genes relacionados a resistência a classes de antibióticos como: aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, sulfonamidas, macrolídeos, lincosamidas e streptogramina, tetraciclina, trimetopim e glicopeptídeos foi realizada pela ferramenta Resfinder a partir dos dados obtidos no sequenciamento dos isolados de *E. faecium* e *E. faecalis*. A presença dos genes foi confirmada pela ferramenta Blast2Seq. As informações relacionadas a resistência estão evidenciadas na Tabela 5.

Tabela 5: Genes relacionados a resistência a antimicrobianos entre os isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* sequenciados.

Amostra / Sitio Isolamento	Isolado	Análise do Sequenciamento Total do Genoma								
		Aminoglicosídeos	β-lactamicos	Sulfonamidas	Macrolídeos, Lincosamidas e Estreptograminas	Tetraciclina	Trimethoprim	Glicopeptídeos	ST	PFGE
699 Sangue	<i>E. faecium</i>	<i>ant(6)-Ia, aph(3')-III</i>	-	-	<i>msr(C), lnu(B)</i>	-	-	<i>vanZ-A, vanR-A, vanA-A, vanS-A, vanH-A, vanX-A, vanY-A</i>	412	A4
1759 Fezes	<i>E. faecium</i>	<i>ant(6)-Ia, aph(3')-III,</i>	-	-	<i>msr(C), erm(B)</i>	<i>tet(L)</i>	-	<i>vanZ-A, vanR-A, vanA-A, vanS-A, vanH-A, vanX-A, vanY-A</i>	896	A6
554 Sangue	<i>E. faecium</i>	<i>aac(6')-aph(2''), aadA1</i>	<i>bla_{OXA-65}, bla_{TEM-1A}, bla_{OXA-23}</i>	<i>sul2</i>	<i>msr(C), msr(D), lnu(B), mef(A)</i>	<i>tet(M),</i>	<i>dfrA1</i>	<i>vanZ-A, vanR-A, vanA-A, vanS-A, vanH-A, vanX-A, vanY-A</i>	412	B5
559 Fezes	<i>E. faecium</i>	<i>ant(6)-Ia, aph(3')-III</i>	-	-	<i>msr(C), erm(B)</i>	-	-	<i>vanZ-A, vanR-A, vanA-A, vanS-A, vanH-A, vanX-A, vanY-A</i>	412	B2
563 Fezes	<i>E. faecium</i>	<i>ant(6)-Ia, aac(6')- aph(2''), aph(3')-III, aadA1, aac(6')-II, aph(3')-VIa</i>	-	-	<i>msr(C), msr(E), erm(B), mph(E)</i>	-	-	<i>vanZ-A, vanR-A, vanA-A, vanS-A, vanH-A, vanX-A, vanY-A</i>	412	C1
1558 Sangue	<i>E. faecium</i>	<i>aac(6')-aph(2''), aph(3')-III,</i>	-	-	<i>lsa(A), erm(B)</i>	-	-	<i>vanZ-A, vanR-A, vanA-A, vanS-A, vanH-A, vanX-A, vanY-A</i>	987	C1
716 Fezes	<i>E. faecium</i>	<i>ant(6)-Ia, aph(3')-III, aac(6')-II</i>	-	-	<i>msr(C), erm(B)</i>	-	-	<i>vanZ-A, vanR-A, vanA-A, vanS-A, vanH-A, vanX-A, vanY-A</i>	478	C1
1547 Swab retal	<i>E. faecium</i>	<i>ant(6)-Ia, aph(3')-III, aac(6')-II</i>	-	-	<i>msr(C), erm(B), lnu(B)</i>	-	-	<i>vanZ-A, vanR-A, vanA-A, vanS-A, vanH-A, vanX-A, vanY-A</i>	478	C4
695 Sangue	<i>E. faecium</i>	<i>ant(6)-Ia, aph(3')-III</i>	-	-	<i>msr(C), erm(B), lnu(B)</i>	-	-	<i>vanZ-A, vanR-A, vanA-A, vanS-A, vanH-A, vanX-A, vanY-A</i>	478	D1
1530 Swab retal	<i>E. faecium</i>	<i>ant(6)-Ia, aph(3')-III,</i>	-	-	<i>msr(C), erm(B)</i>	<i>tet(M), tet(L)</i>	-	<i>vanZ-A, vanR-A, vanA-A, vanS-A, vanH-A, vanX-A, vanY-A</i>	896	G1
918 Fezes	<i>E. faecium</i>	<i>ant(6)-Ia, aph(3')-III,</i>	-	-	<i>msr(C), erm(B)</i>	<i>tet(L)</i>	-	<i>vanZ-A, vanR-A, vanA-A, vanS-A, vanH-A, vanX-A, vanY-A</i>	896	H2
1586 Fezes	<i>E. faecium</i>	<i>ant(6)-Ia, aph(3')-III,</i>	-	-	<i>msr(C), erm(B)</i>	<i>tet(M), tet(L)</i>	-	<i>vanZ-A, vanR-A, vanA-A, vanS-A, vanH-A, vanX-A, vanY-A</i>	896	I2
1546 Swab retal	<i>E. faecium</i>	<i>aac(6')-aph(2''),</i>	-	-	<i>lsa(A), erm(B)</i>	<i>tet(M),</i>	-	<i>vanZ-A, vanR-A, vanA-A, vanS-A, vanH-A, vanX-A, vanY-A</i>	896	J1
1590 Fezes	<i>E. faecium</i>	<i>ant(6)-Ia, aph(3')-III,</i>	-	-	<i>msr(C), erm(B)</i>	-	-	<i>vanZ-A, vanR-A, vanA-A, vanS-A, vanH-A, vanX-A, vanY-A</i>	963	L

Continua

Tabela 5: Genes relacionados a resistência a antimicrobianos entre os isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* sequenciados. **(Conclusão)**

Amostra / Sitio Isolamento	Isolado	Análise do Sequenciamento Total do Genoma								ST	PFGE
		Aminoglicosídeos	β-lactamicos	Sulfonamidas	Macrolídeos, Lincosamidas e Streptograminas	Tetraciclina	Trimethoprim	Glicopeptídeos			
4247 Fezes	<i>E. faecium</i>	<i>ant(6)-Ia, aph(3')-III,</i>	-	-	<i>msr(C), erm(B)</i>	<i>tet(M), tet(L)</i>	-	<i>vanZ-A, vanR-A, vanA-A, vanS-A, vanH-A, vanX-A, vanY-A</i>	896	Q2	
4275 Fezes	<i>E. faecium</i>	<i>ant(6)-Ia, aph(3')-III,</i>	-	-	<i>msr(C), erm(B)</i>	<i>tet(M), tet(L)</i>	<i>dfrG</i>	<i>vanZ-A, vanR-A, vanA-A, vanS-A, vanH-A, vanX-A, vanY-A</i>	792	S1	
714 Fezes	<i>E. faecium</i>	<i>ant(6)-Ia, aac(6')- aph(2''), aph(3')-III, aac(6')-II</i>	-	-	<i>msr(C), erm(B), lnu(B)</i>	-	-	<i>vanZ-A, vanR-A, vanA-A, vanS-A, vanH-A, vanX-A, vanY-A</i>	78	W	
690 Sangue	<i>E. faecalis</i>	<i>aac(6')-aph(2'')</i>	-	-	<i>msr(C), lsa(A), erm(B)</i>	-	-	<i>vanZ-A, vanR-A, vanA-A, vanS-A, vanH-A, vanX-A, vanY-A</i>	9	3	

Legenda: *aac(6')-aph(2'')* - Gentamicin resistance protein; *aac(6')-II* - Aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase; *aadA1* - Streptomycin 3'-adenylyltransferase; *ant(6)-Ia* - Methyltransferase activity protein; *aph(3')-III* - Aminoglycoside 3'-phosphotransferase; *aph(3')-VIa* - 3'-aminoglycoside phosphotransferase type VI; *bla_{OXA-23}* - OXA-23 beta lactamase; *bla_{OXA-65}* - OXA-65 beta-lactamase; *bla_{TEM-1A}* - Beta-lactamase; *dfrA1* - Dihydrofolate reductase type I; *dfrG* - Dihydrofolate reductase; *erm(B)* - erythromycin resistance; *erm(B)*- Erythromycin resistance methylase B; *lnu(B)* - Lincosamide nucleotidyltransferase; *lnu(B)* - Lincosamide nucleotidyltransferase; *lsa(A)* -lincosamide, macrolide, streptogramin_b efflux pump resistance; *mef(A)* - Macrolide-efflux protein; *mph(E)* - Macrolide 2'-phosphotransferase; *msr(C)* – Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B efflux pump; *msr(E)* - Macrolide efflux protein; *sul2* - Dihydropteroate synthase; *tet(L)* - Tetracycline resistance protein; *tet(M)* - Tetracycline resistance protein; *vanA-A* - Vancomycin/teicoplanin A-type resistance protein; *vanH-A* - D-specific alpha-keto acid dehydrogenase; *vanR-A* - Vancomycin response regulator; *vanS-A* - Sensor histidine kinase; *vanX-A* - D-alanyl-D-alanine dipeptidase; *vanY-A* - D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase; *vanZ-A* - Teicoplanin resistance protein;

Para a pesquisa de genes de virulência, foi utilizada a ferramenta Virulencefinder a partir dos dados do sequenciamento. Os genes observados e suas respectivas funções estão evidenciados na Tabela 6. A presença dos genes foi confirmada pela ferramenta Blast2Seq e pode-se observar a prevalência dos genes *esp*, *acm* e *efaAfm*. Esses genes estão fortemente relacionados com o processo de aderência e formação de biofilme em isolado de *E. faecium* e *E. faecalis*.

Tabela 6: Genes relacionados a virulência observados nos isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* sequenciados

Análise do Sequenciamento Total do Genoma												
Amostra	Isolado	Sítio de Isolamento	Aderência	Biofilme	Conjugação	Spreading Factor	Colonização Intestinal	Ferormônio	Lise Macrófago	Exoenzima	ST	PFGE
699	<i>E. faecium</i>	Blood	<i>esp,acm,efaAfm,asa1</i>	-	-	-	<i>gelE</i>	-	-	-	412	A4
1759	<i>E. faecium</i>	Feces	<i>esp, acm, efaAfm</i>	-	-	-	-	-	-	-	896	A6
554	<i>E. faecium</i>	Blood	<i>esp,ace,efaAfs ebpC, agg,asa1</i>	-	<i>Cad</i>	<i>hylA</i>	<i>gelE</i>	-	-	<i>ElrA</i>	412	B5
559	<i>E. faecium</i>	Feces	<i>esp,acm,efaAfm,asa1</i>	-	-	-	<i>gelE</i>	-	-	-	412	B2
563	<i>E. faecium</i>	Feces	<i>esp, acm,asa1</i>	-	-	-	-	-	-	-	412	C1
1558	<i>E. faecium</i>	Blood	<i>esp, acm,</i>	-	-	-	-	-	-	-	987	C1
716	<i>E. faecium</i>	Feces	<i>esp, acm</i>	-	-	-	-	-	-	-	478	C1
1547	<i>E. faecium</i>	Rectal swab	<i>esp,acm,efaAfm,asa1</i>	-	-	-	<i>gelE</i>	-	-	-	478	C4
695	<i>E. faecium</i>	Blood	<i>esp,acm,efaAfm,asa1</i>	-	-	-	-	-	-	-	478	D1
1530	<i>E. faecium</i>	Rectal swab	<i>esp, acm, efaAfm</i>	-	-	-	-	-	-	-	896	G1
918	<i>E. faecium</i>	Feces	<i>esp,acm,efaAfm,asa1</i>	-	-	-	-	-	-	-	896	H2
1586	<i>E. faecium</i>	Feces	<i>esp,acm,efaAfm,asa1</i>	-	-	-	<i>gelE</i>	-	-	-	896	I2
1546	<i>E. faecium</i>	Rectal swab	<i>esp,acm,efaAfm,asa1</i>	-	-	-	<i>gelE</i>	-	-	-	896	J1
1590	<i>E. faecium</i>	Feces	<i>esp,acm,efaAfm,asa1</i>	-	-	<i>hylEfm</i>	-	-	-	-	963	L
4247	<i>E. faecium</i>	Feces	<i>esp, acm, efaAfm</i>	-	-	-	<i>gelE</i>	-	-	-	896	Q2
4275	<i>E. faecium</i>	Feces	<i>esp, acm, efaAfm</i>	-	-	-	-	-	-	-	792	S1
714	<i>E. faecium</i>	Feces	<i>esp, acm</i>	-	-	-	-	-	-	-	78	W
690	<i>E. faecalis</i>	Blood	<i>esp, acm, efaAfs, ebpA, ebpB, ebpC, agg,asa1</i>	<i>fsrB, StrA</i>	<i>Cad</i>	<i>hylA</i>	<i>gelE</i>	<i>cOB1, camE</i>	<i>ElrA</i>	<i>gelE</i>	9	3

Legenda: *Sape: Sangue Periférico ** ST: Sequencia tipo; ace - Collagen adhesin;acm - Collagen-binding protein; agg – aggregation substance; camE – sex pheromone cAM373; cOB1 - bacterial sex pheromone, ebpA, ebpB, ebpC – Biofilm-associated pili; efaAfm - Cell wall adhesins; efaAfs - Cell wall adhesins expressed; ElrA - enterococcal leucine-rich protein A; esp - Enterococcal surface protein; fsrB - Putative AgrB-like protein; *gelE* - Gelatinase; *hylA* - Hyaluronate lyase; *hylEfm* – Hialuronidase; PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis; ST - Sequene type ; strA - Aminoglycoside 3'-phosphotransferase; *asa1* - aggregation substance

5.5.1 Representação da localização dos STs dos isolados de *E. faecium*

O algoritmo do eBURST identifica grupos com complexos clonais (CC) relacionados no banco de dados da sequência multilocus. A Figura 7 do eBURST representa a localização dos ST 412, 78, 896, 987, 478, 963 e 792 dos isolados de *E. faecium* sequenciados no estudo.

Figura 7: eBURST representando a localização dos ST dos isolados sequenciados.

Quatro isolados não foram relacionados a nenhum *cluster* (1558, 714, 4275 e 1590). Um isolamento de infecção e três isolados de colonização com diferentes ST (987, 78, 792 e 963), respectivamente. Três destes isolados (714, 1558, 4275) apresentaram apenas um gene de virulência (*esp*), com exceção do isolado 1590, que possui um perfil de virulência diferente dos outros isolados. Outras informações estão descritas na Figura 9.

Legenda: *Referência *Enterococcus faecium* AUS0085 **SNP: Single nucleotide polymorphisms *** Sequence type **** Pulsed Field Type

Figura 9: Dendrograma representando as diferenças de SNP dos 17 isolados sequenciados.

6. DISCUSSÃO

Enterococcus faecium foi predominante no presente estudo. O primeiro caso de VRE descrito no Brasil foi um isolado de *E. faecium* identificado em uma paciente com anemia aplásica em Curitiba no ano de 1996 (Dalla Costa et al 2008). A partir de então vários serviços instituíram cultura de vigilância de pacientes de alto risco como medida de controle e prevenção da disseminação desse agente. Os primeiros estudos brasileiros mostravam predomínio de colonização e infecção por *E. faecalis* que foi posteriormente substituído por *E. faecium* (Palazzo et al 2011; Pereira et al 2010).

Segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) do Estado de São Paulo, no ano de 2016, 342 hospitais com UTIs notificaram infecção primária de corrente sanguínea laboratorialmente comprovada (IPCSLC), e do total de 5.733 agentes infecciosos, 37% das infecções foram causadas por microrganismos gram positivos. Deste total, 1% foram causadas por *Enterococcus* spp., *E. faecalis* 3% e *E. faecium* 2% das infecções. Não existe dados nacionais de infecção relacionadas assistência à saúde em pacientes hematológicos e transplantados, o que impossibilitou a comparação dos nossos dados com outras casuísticas brasileiras.

Nosso estudo observou que 53,9% dos pacientes evoluíram para óbito durante a internação, dado semelhante ao publicado por outros estudos que demonstraram alta mortalidade em pacientes com doenças hematológicas internados em unidades de transplante de medula óssea infectados por VRE (KRULL et al, 2016 e HEFAZI, et al, 2016). A principal doença de base encontrada na nossa casuística foi leucemia e a média do tempo de internação foi de 37,5 dias. Alguns autores atribuem a elevada mortalidade das infecções por VRE nos pacientes hematológicos devido à gravidade do paciente. Poucos estudos, entretanto, avaliaram o papel da virulência na evolução clínica de pacientes hematológicos e transplantados de medula óssea colonizados e com infecção por VRE (Worth et al 2008). A nossa casuística é a primeira que avalia virulência e resistência de VRE em pacientes hematológicos e HSCT no Brasil utilizando o sequenciamento completo do genoma.

A determinação da concentração inibitória mínima dos isolados de *E. faecium* deste estudo demonstrou alta resistência para vancomicina com CIM $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ (CIM50 $32 \mu\text{g/mL}$). Já a resistência à teicoplanina foi observada em 85 isolados (CIMs que variaram de 32 a $128 \mu\text{g/mL}$), enquanto que seis isolados apresentaram sensibilidade e oito apresentaram resistência intermediária à teicoplanina (MIC de 8 e $16 \mu\text{g/mL}$). Esses resultados são semelhantes aos descritos por SUN e colaboradores no ano de 2012 que evidenciaram a presença do gene *vanA* em alguns isolados sensíveis a teicoplanina. Com relação à determinação da resistência a

gentamicina e estreptomicina (HLAR), nossos resultados mostraram que os isolados apresentaram maior resistência à estreptomicina do que para gentamicina. A nossa casuística diverge de um estudo Chinês publicado por Wanxiang Li e colaboradores em 2015, que observaram maior resistência à gentamicina do que para estreptomicina entre todos os 160 isolados de VRE utilizados no estudo. Com o intuito de confirmar a resistência à vancomicina foi realizada a PCR dos genes *vanA* e *van B*. O gene *vanA* foi identificado em todos os isolados. Atualmente no Brasil, o gene *vanA* predomina entre isolados de VRE (Palazzo et al 2011; Pereira et al 2010).

Um isolado de *E. faecium* de sangue apresentou resistência à linezolida com CIM 8 mg/mL. A mutação nos nucleotídeos G2576T do domínio V do 23S rRNA característica para este tipo de resistência foi observada e este isolado foi positivo somente para o gene *esp* (PRADO et al, 2016). Nosso estudo diverge de um estudo publicado por KRULL e colaboradores em 2016 que avaliou 20 isolados obtidos na unidade de transplante de medula óssea e hematologia e todos apresentaram resistência a linezolida com MIC ≥ 16 mg/mL e positivos para o gene *esp*. Outro estudo publicado em 2013 avaliou a sensibilidade à linezolida em 27 isolados de VRE e detectou a resistência à linezolida relacionado à mutação G2576T em 2,9% de isolados de *E. faecalis* (Jones et al 2013).

A avaliação dos genes codificadores dos principais fatores de virulência de VRE, como *esp*, *asa1*, *gelE*, *cylA* e *hyl* foi realizada no presente estudo com intuito de caracterizar a virulência dos clones encontrados e comparar a presença de genes de virulência entre isolados de colonização e infecção. O gene *gelE* foi observado em 67,5% dos isolados de *E. faecium* do presente estudo. A frequência desse gene foi significativamente maior entre os isolados de infecção demonstrando uma possível vantagem adaptativa dos isolados de infecção em relação aos isolados de colonização. Esses dados são semelhantes aos publicados por Sharifi et al (2012) e Sun et al (2012).

O gene da proteína de superfície do enterococo codificado pelo gene *esp* é um importante gene de virulência identificando em surtos de isolados de VRE que causam infecção (Worth et al 2008, Lopez et al. 2013). Um estudo realizado por Kang e colaboradores (2014) com 73 isolados de *E. faecium* de diferentes sítios de infecção e colonização observou que apenas 5 isolados não apresentavam positividade para o gene *esp*, assim como o nosso estudo que evidenciou apenas quatro isolados negativos para o gene *esp* (02 *E. faecalis* e 02 *E. faecium*).

Outro fator de virulência frequentemente descrito em isolados de VRE é a substância de agregação, codificada pelo gene *asa1*. O presente estudo identificou a presença desse gene em

75,5% dos isolados de *E. faecium* de infecção. Entre os isolados de colonização 60,0% apresentaram positividade para este gene. No nosso estudo, todos os isolados foram negativos para o gene da citolisina (*cylA*) resultado similar a outro estudo brasileiro publicado por Camargo e colaboradores (2008) que avaliaram 24 isolados de VRE e evidenciaram a presença do gene da citolisina (*cylA*) em apenas um isolado de *E. faecium* que também apresentava o gene da gelatinase (*gelE*).

Na nossa casuística foi observada a positividade para o gene da hialuronidase (*hyl*), em apenas 01 isolado de *E. faecium* de colonização, dado similar a outros estudos que observaram a baixa prevalência desse gene em isolados de VRE de infecção (Worth 2008; Lopez et al 2013).

A análise da associação da mortalidade entre os pacientes infectados e colonizados por VRE com os genes de virulência deste estudo evidenciou que os isolados de infecção carregam mais genes de virulência do que os isolados de colonização e que o gene *gelE* responsável pela hidrólise do colágeno foi significativamente mais frequente entre os isolados de infecção ($p < 0,05$). A avaliação da proporção de genes de virulência em isolados de infecção por VRE que evoluíram para óbito, evidenciou que o gene *asa1* está significativamente associado com o aumento da mortalidade ($p < 0,05$). Este gene como já descrito é responsável pela adesão desse microorganismo. Esses achados reforçam a hipótese que cepas mais virulentas seriam mais aptas a causar infecção, entretanto, não podemos inferir com segurança qual o papel da virulência no prognóstico do paciente.

A análise dos perfis moleculares de *E. faecium* identificou a presença de um cluster predominante com 16 isolados. Isolados deste cluster predominante foram identificados durante todo o período do estudo (2005 a 2014). Este cluster circulou na unidade colonizando e causando infecções com maior número de casos nos anos de 2006, 2008 e 2014. A presença de diferentes perfis de virulência entre os isolados deste cluster pressupõe que esse é um cluster que apresenta uma vantagem evolutiva e de adaptação em relação aos outros clusters identificados na nossa casuística. Outro achado interessante foi a presença dos genes *asa1* e *gelE* em isolados pertencentes ao clone predominante. Esses genes são descritos em plasmídeos, portanto, pode ocorrer a perda deste plasmídeo, o que justificaria a diferença de perfil de virulência encontrada no mesmo clone (RICE et al 2002; Arias et al 2012).

A comparação dos fatores de virulência e os perfis clonais dos isolados de colonização e infecção evidenciou que entre os isolados de *E. faecium* de colonização, apenas 01 isolado pertencia ao cluster predominante e apresentou positividade somente para os genes *esp*. Os demais isolados de colonização estavam distribuídos em clusters diferentes e apresentaram os

mesmos genes de virulência, *esp*, *asa1* e *gelE*. Foi observado um cluster com 07 isolados de colonização que foram positivos somente para o gene *esp*.

Os resultados da presente casuística são diferentes dos descritos por um estudo conduzido na Austrália por Worth e colaboradores (2008) que avaliaram a virulência e a clonalidade de isolados de VRE em pacientes hematológicos. Os autores avaliaram 41 pacientes, 14 infectados e 27 colonizados com *E. faecium* resistente à vancomicina (*vanB* positivos), pertencentes a 3 clones, e encontraram positividade do gene *esp* em 22 dos 27 isolados (87%). Somente um isolado foi positivo para o gene *hyl*, e nenhum isolado positivo para os genes *asa1*, *gelE* e *cylA*. O perfil de virulência e de resistência encontrado no presente estudo pode ser decorrente de características geográficas e locais. Todos os nossos isolados, foram *vanA* positivos, o clone predominante continha mais genes de virulência que os clones do estudo australiano.

Nosso estudo evidenciou a presença de diferentes ST já descritos em outros estudos no Brasil: ST78, ST478, ST412, ST896 e ST987, entre os isolados de *E. faecium* e todos pertencentes ao complexo clonal 17. (SILVA et al, 2012, PRADO et al, 2016, SACRAMENTO et al, 2017). Silva e colaboradores (2012) em um estudo com 53 isolados de *E. faecium* obtidos de dois Hospitais na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, descreveram a presença dos ST 78, 412 e 478 pertencentes ao CC17. Os autores demonstraram que três isolados apresentaram o ST78 e que houve predomínio do ST412 entre isolados de VRE. Estudos conduzidos em vários países como Taiwan, Itália, Alemanha e Paraguai também identificaram a presença do ST78 em pacientes hospitalizados (Klare et al 2005, Klan et al 2010; Hsieh et al 2010; Fallico et al 2011). Dois STs observados (ST963, ST792) foram identificados em isolados de *E. faecium* de fezes nos anos de 2013 e 2014 respectivamente. Esses STs, até o momento, não foram descritos em outros estudos no Brasil. O ST963 apresentou perfil de virulência (*asa1* e *hyl_{efm}*) diferente quando comparado ao ST792 que só apresentava o gene *esp*.

O complexo clonal 17 como já mencionado está disseminado pelo mundo foi descrito em vários surtos hospitalares e caracterizado por alguns autores como mais virulento, isso porque cepas pertencentes a este CC possuem características particulares como a aquisição de resistência à ampicilina e quinolonas, variedade de genes de resistência e virulência e uma ilha de patogenicidade onde se localizam genes importantes responsáveis pela persistência do microrganismo no ambiente hospitalar. (FREITAS et al 2010; CATTOIR et al 2013, HEIKENS et al 2008, LAM et al 2012).

O sequenciamento do genoma dos isolados de *E. faecium* demonstrou pouca diversidade entre os genes de resistência aos aminoglicosídeos, sulfametoaxol-trimetropim, macrolídeos,

clindamicina e genes produtores de beta-lactamases, ao contrário do que foi sugerido por McLaughlin et al (2013) e Spiliopoulou et al (2011). Entretanto, com relação a virulência, observou-se que os isolados de colonização apresentam os genes (*acm*, *esp* e *efaAfm*) presente nos isolados de infecção, incluindo o isolado resistente à linezolida. Somente um isolado de infecção (554) apresentou genes não observados nos outros isolados (*ElrA*, *ebpC*, *efaAfs*, *cad*, *ace*, *hlyA*, *agg*). Os genes de virulência identificados nos isolados de sangue estão associados à adesão, invasão, e formação de biofilme (TOP et al 2008, ARIAS et al 2012; Cattoir et al 2013).

A análise de SNP dos 17 isolados sequenciados mostrou a presença de dois clusters bem definidos. O primeiro cluster com sete isolados pertencentes aos ST412 e ST478, foi observado que somente dois isolados (563 e 716) um de cada ST apresentavam diferenças no perfil de virulência. O segundo *cluster* com seis isolados e todos pertencentes ao ST896, foi observado que dois isolados (1546 e 1586) tinham perfis de virulência diferentes. Por outro lado, três isolados (714, 1558 e 4275) não relacionados a nenhum *cluster* e diferentes entre si, apresentam o mesmo perfil de virulência, positivos somente para o gene *esp*. A baixa proporção de genes de virulência desses isolados pode explicar a dificuldade de disseminação dos mesmos. Um último isolado (1590), não relacionado a nenhum *cluster* possui um gene diferente quando comparado aos demais isolados sequenciados no estudo. Dois isolados do mesmo paciente, um resistente (1558) e outro sensível (1547) a linezolida, apesar de estarem agrupados no mesmo *cluster* no PFGE, não estão relacionados na análise dos SNP e apresentam perfil de virulência diferente.

O número de isolados de *E. faecalis* foi pequeno na nossa casuística, não houve a presença de um *cluster* e somente dois isolados apresentaram diferentes genes de virulência quando comparados aos *E. faecalis* e *E. faecium*. A análise do MLST do isolado sequenciado mostrou que esse isolado pertence ao ST9 e ao CC9. Este complexo está disseminado pelo mundo e foi descrito no Brasil por Conceição e colaboradores (2014) que avaliaram 317 isolados de *E. faecalis* no período de 2006 a 2010. Os autores concluíram que isolados pertencentes a este complexo são caracterizados por apresentarem mutação no gene *pbp4* (N573E) que confere resistência a penicilina. Nosso isolado, como descrito anteriormente pertence a este complexo e possui a mutação descrita pelos autores.

Este estudo tem várias limitações, como a falta de isolados de 2010 e 2011 devido a problemas com o armazenamento e a logística para realizar o sequenciamento do genoma de um maior número de isolados, bem como a inadequação da avaliação sobre a expressão de

genes de virulência. Assim, não podemos inferir o papel real da virulência no prognóstico dos pacientes.

7. CONCLUSÕES

Enterococcus faecium predominou na nossa casuística, e todos os isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* foram positivos para o gene *vanA*.

O gene *esp* foi bastante frequente nos isolados do estudo. Alguns isolados, entretanto, apresentaram positividade para genes responsáveis pela hidrólise de colágeno (*gelE*) e colonização intestinal (*hyl_{efm}*).

Os isolados de infecção do presente estudo apresentaram perfis de virulência diferentes quando comparados com os isolados de colonização.

O gene *gelE* foi significativamente mais frequente entre isolados de infecção que de colonização e infecções causadas por isolados de VRE positivos para o gene *asa1* foram significativamente associadas com evolução para óbito.

Um clone predominante foi identificado entre os isolados de *E. faecium* durante todo período do estudo. Esse clone contém vários genes de virulência associados com adesão, invasão e formação de biofilme.

Outros clones de *E. faecium* pertencem a diferentes STs incluindo três STs descritos pela primeira vez no país foram observados demonstrando assim a diversidade desse microrganismo na unidade de hematologia e transplante de medula óssea no período do estudo.

Um isolado de *E. faecium* resistente à linezolida foi identificado pela primeira vez na unidade de transplante de medula óssea do HC-FMUSP e pertence a um ST897 descrito pela primeira vez no Brasil.

O número de isolados de *E. faecalis* foi pequeno na nossa casuística, não houve um cluster predominante e não houve diferença no perfil de virulência quando comparados com os isolados de *E. faecium*.

A variabilidade genética e a virulência de isolados de VRE podem justificar a dificuldade de controlar este microrganismo no ambiente hospitalar principalmente em populações

imunocomprometidas, com doenças hematológicas graves ou submetidos a transplante de medula óssea.

São Paulo, 10 de agosto de 2015.

Parecer apresentado a Comissão de Ética e Pesquisa do Depto de Moléstias Infecciosas e Parasitárias em 10.08.15.

Título: “Clonalidade e Virulência de Isolados de VRE em Pacientes Hematológicos”

Pesquisadora Responsável: Silvia Figueiredo Costa

Pesquisadora Executante: Ana Paula Marchi

Finalidade Acadêmica: Mestrado.

O estudo intitulado: “Clonalidade e Virulência de Isolados de VRE em Pacientes Hematológicos” será a tese de mestrado da aluna Ana Paula Marchi orientada pela Professora Dra Silvia Figueiredo Costa. Trata-se de um subprojeto de um principal intitulado “Medidas de Prevenção e Controle de Enterococo Resistente a Vancomicina em Unidade Hematológica do HC-FMUSP”, que tem aprovação da CAPPesq sob n 0785/10, e auxílio financeiro da FAPESP, sob n 2012/08910-3-2.

Francisco Oscar de Siqueira França
Relator

8.2 Anexo 2: Perfil dos isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* por sequenciamento do genoma total.

Amostra	MLST	Isolado	Sítio isolamento	Genoma (pb)	Conteúdo GC (%)	N50 (pb)
554	ST 412	<i>E. faecium</i>	Sangue	3,013,299	37,67	26,655
563	ST 412	<i>E. faecium</i>	Fezes	2,636,259	38,40	24,803
714	ST 78	<i>E. faecium</i>	Fezes	2,829,514	41,60	8,148
716	ST 478	<i>E. faecium</i>	Fezes	2,647,209	37,80	15,268
1546	ST 896	<i>E. faecium</i>	Swab retal	2,614,510	37,60	17,842
1547	ST 478	<i>E. faecium</i>	Swab retal	2,686,027	38,50	19,295
1558	ST 987	<i>E. faecium</i>	Sangue	2,708,704	37,65	13,556
1759	ST 896	<i>E. faecium</i>	Fezes	3,334,451	38,00	26,184
918	ST 896	<i>E. faecium</i>	Fezes	2,818,907	38,18	7,275
1530	ST 896	<i>E. faecium</i>	Swab retal	2,857,311	37,94	12,375
1586	ST 896	<i>E. faecium</i>	Fezes	2,900,527	37,96	12,662
1590	ST 963	<i>E. faecium</i>	Fezes	2,801,499	37,90	18,283
4247	ST 896	<i>E. faecium</i>	Fezes	2,874,750	37,99	14,326
4275	ST 792	<i>E. faecium</i>	Fezes	2,959,348	37,78	7,540
559	ST412	<i>E. faeciumn</i>	Fezes	2,891,563	38,02	93,28
695	ST478	<i>E. faecium</i>	Sangue	2,979,531	37,77	22,929
699	ST412	<i>E. faecium</i>	Sangue	2,578,287	38,33	70,97
690	ST 09	<i>E. faecalis</i>	Sangue	3,267,907	37,00	31,856

1) MLST: Multi Locus Sequence type 2) pb: Pares de bases

8.3 Produção Científica

8.3.1 Artigos publicados como colaborador

Journal of Global Antimicrobial Resistance 6 (2016) 27–31

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Global Antimicrobial Resistance

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jgar

ELSEVIER

Short Communication

Virulence and resistance pattern of a novel sequence type of linezolid-resistant *Enterococcus faecium* identified by whole-genome sequencing

Gladys Villas Boas do Prado^a, Ana Paula Marchi^b, Luisa Zanolli Moreno^c, Camila Rizek^b, Ulisses Amigo^a, Andrea Micke Moreno^c, Flavia Rossi^a, Thais Guimaraes^a, Anna Sara Levin^{a,b}, Silvia F. Costa^{a,b,*}

^a Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil
^b Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil
^c Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 October 2015
Received in revised form 31 January 2016
Accepted 2 February 2016
Available online 28 March 2016

Keywords:
VRE
Linezolid resistance
HSCT
MLST
Novel ST

ABSTRACT

Empirical use of linezolid has been advocated in neutropenic febrile patients colonised by vancomycin-resistant enterococci (VRE) because of the risk of bloodstream infection (BSI). This study aimed to genetically describe a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREfm) BSI isolate resistant to linezolid (VRLRE) in a patient previously colonised by VREfm and to determine the incidence of colonisation and infection by VREfm in a bone marrow transplant unit over a 10-year period. Data for VREfm colonisation and infection were evaluated. PCR for the *vanA* and *vanB* genes, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and microdilution antimicrobial susceptibility testing (vancomycin, teicoplanin, linezolid and aminoglycosides) were performed. Three isolates, including the VRLRE, were selected for whole-genome sequencing by Ion TorrentTM, with *E. faecium* CP006620-Aus0085 used as a reference. Eighty-seven VREfm were analysed; all were linezolid-susceptible and harboured *vanA*, except for one blood isolate from a febrile neutropenic patient colonised by VREfm who received linezolid for 12 days and developed a BSI by VRLRE (linezolid MIC ≥ 8 μ g/mL). Linezolid resistance was associated with a G2576T mutation in the 23S rRNA gene. PFGE analysis demonstrated that the 87 isolates belonged to four major clusters; however, the VRLRE presented only 50% similarity. Three sequence types (STs) were identified: ST412 (the predominant clone, which was more virulent compared with the other isolates); ST478 (linezolid-susceptible VREfm); and a novel ST named ST987 (VRLRE). SNP analysis showed a higher similarity between linezolid-susceptible VREfm and the predominant clone compared with VRLRE. VRLRE presented a G2576T mutation and belonged to a novel ST (ST987).

© 2016 International Society for Chemotherapy of Infection and Cancer. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Vancomycin-resistant enterococci (VRE) have spread worldwide and have gained attention in haematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients owing to their high rates of morbidity and mortality [1,2]. Gastrointestinal colonisation with VRE is postulated to precede VRE infection, with mucositis as a risk factor [1]. Thus, empirical use of linezolid has been advocated in neutropenic febrile patients colonised by VRE. Linezolid-resistant VRE isolates are rare; however, they have been identified in patients who have received linezolid therapy [2].

This aim of this study was to report a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREfm) bloodstream infection (BSI) isolate resistant to linezolid (VRLRE) in a HSCT patient previously colonised by VREfm and to genetically describe these isolates as well as the incidence of colonisation and infection by VREfm in a bone marrow transplant (BMT) unit over a 10-year period.

2. Materials and methods

From 2004 to 2014, all VREfm isolates from blood cultures of patients hospitalised in the BMT unit of Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, a 23-bed unit in São Paulo, Brazil, were

* Corresponding author at: Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
Tel.: +55 11 983 839 277.
E-mail address: costasilviaf@ig.com.br (S.F. Costa).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2016.02.002>
2213-7165/© 2016 International Society for Chemotherapy of Infection and Cancer. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Chlorhexidine bathing for the prevention of colonization and infection with multidrug-resistant microorganisms in a hematopoietic stem cell transplantation unit over a 9-year period

Impact on chlorhexidine susceptibility

Elisa Teixeira Mendes, MD^{a,*}, Otavio T. Ranzani, MD^b, Ana Paula Marchi, BS^c, Mariama Tomaz da Silva, MS^d, José Ulysses Amigo Filho, MD^d, Tânia Alves, NSG^d, Thais Guimarães, PhD^e, Anna S. Levin, PhD^e, Sílvia Figueiredo Costa, PhD^f

Abstract

Health care associated infections (HAIs) are currently among the major challenges to the care of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) patients. The objective of the present study was to evaluate the impact of 2% chlorhexidine (CHG) bathing on the incidence of colonization and infection with vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE), multidrug-resistant (MDR) gram-negative pathogens, and to evaluate their CHG minimum inhibitory concentration (MIC) after the intervention.

A quasi-experimental study with duration of 9 years was conducted. VRE colonization and infection, HAI rates, and MDR gram-negative infection were evaluated by interrupted time series analysis. The antibacterial susceptibility profile and mechanism of resistance to CHG were analyzed in both periods by the agar dilution method in the presence or absence of the efflux pump inhibitor carbonyl cyanide-m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) and presence of efflux pumps (*qacA*, *qacE*, *qacF*, *qacH*, *qacJ*, *qacK*, *qacL*, *qacM*, *qacN*, *qacO*, *qacP*, *qacQ*, *qacR*, *qacS*, *qacT*, *qacU*, *qacV*, *qacW*, *qacX*, *qacY*, *qacZ*, *qacAA*, *qacAB*, *qacAC*) by polymerase chain reaction (PCR).

The VRE colonization and infection rates were significantly reduced in the postintervention period ($P=0.001$). However, gram-negative MDR rates in the unit increased in the last years of the study. The CHG MICs for VRE increased during the period of exposure to the antiseptic. A higher MIC at baseline period was observed in MDR gram-negative strains. The emergence of a monoclonal *Pseudomonas aeruginosa* clone was observed in the second period.

Concluding, CHG bathing was efficient regarding VRE colonization and infection, whereas no similar results were found with MDR gram-negative bacteria.

Abbreviations: BMT = bone marrow transplant, BSIs = blood stream infections, CCCP = carbonyl cyanide-m-chlorophenyl hydrazone, CHG = Chlorhexidine, HAIs = health care associated infections, HSCT = hematological stem cell transplant, MDR = multidrug-resistant, VRE = vancomycin-resistant *Enterococcus*.

Keywords: chlorhexidine bath, hospital infection, hematopoietic stem cell transplantation infection, multidrug-resistant bacteria, transplant infection

1. Introduction

Health care associated infections (HAIs) are currently among the major challenges to the quality of hematopoietic stem cell

transplantation (HSCT) patient care.^[1] Multidrug-resistant (MDR) bacteria, such as vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE),^[2] and carbapenem-resistant gram-negative bacteria,^[3] constitute the leading etiologic agents of bloodstream infections (BSIs) in some bone marrow transplantation (BMT) health centers.^[4,5]

Due to these conditions, daily bathing with 2% chlorhexidine (CHG) has been proposed to reduce the colonizing bacterial burden in critically ill patients^[6,7] and, thus, reduce the rates of infection and cross-transmission. CHG bath impact has been evaluated, particularly in intensive care units (ICUs).^[8–10] Notably, some studies report reduced colonization with MDR microorganisms and a general reduction of bacteremia, mainly due to coagulase-negative staphylococci (CNS).^[8,9]

To date, clinical prospective studies that evaluate the real-life impact of prolonged CHG use on the development of bacterial resistance to antiseptics are lacking, and studies approaching HSCT population, especially non-ICU patients, remain scarce in the literature.^[9,11,12]

A major concern about the introduction of CHG bath has been the potential increase in selection pressures. Indeed, cases of CHG minimum inhibitory concentration (MIC) increase have been reported mainly for *Staphylococcus aureus*^[13] and *Enterococci*

Editor: Duane R. Hopenhart.

The authors report no conflicts of interest.

^aDepartment of Infectious Diseases, ^bPulmonary Division, Heart Institute, Hospital das Clínicas, University of São Paulo, ^cLaboratory of Bacteriology, Department of Infectious Diseases, ^dHSCT Department, Hospital das Clínicas, ^eDepartment of Infectious Diseases of Hospital das Clínicas, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

*Correspondence: Elisa Teixeira Mendes, Department of Infectious Diseases of Hospital das Clínicas, University of São Paulo, Dr. Eneas Carvalho de Aguiar 470, São Paulo 02461-011, Brazil (e-mail: elisatmendes@gmail.com).

Copyright © 2016 the Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution-ShareAlike License 4.0, which allows others to remix, tweak, and build upon the work, even for commercial purposes, as long as the author is credited and the new creations are licensed under the identical terms.

Medicine (2016) 95:46(e5271)

Received: 27 June 2016 / Received in final form: 21 September 2016 /

Accepted: 7 October 2016

http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000005271

8.3.2 Participação em Congressos:

1 - Abstract apresentado no **24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID 2014). 10 May 2014 - 13 May 2014 – Barcelona**

Título: Clonality and Virulence of Isolates of VRE in Stem Cell Transplant Patients

Autores: Ana Paula Marchi, Inneke Marie van der Heidjen, Elisa T. Mendes, André Doi, Camila Fonseca Rizek, Anna Sara S. Levin, Silvia Figueiredo Costa

2 - Abstract apresentado no **“54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy September 5 -9, 2014 | Washington, USA”**.

Título: Whole genome sequencing of Linezolid-resistant VRE isolated of blood stream infection in Hematopoietic and stem cell transplantation (HSCT) patient.

Autores: Gladys Villas Boas do Prado, Elisa Mendes, Ana Paula Marchi, Camila Rizek, Flávia Rossi, Anna Sara S. Levin, Thais Guimaraes, Ulysses Amigo, Silvia Figueiredo Costa

3 - Slide section apresentado no **54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy September 5 -9, 2014 | Washington, DC, USA**.

Título: Whole genome sequencing of VRE isolated from bloodstream infection and colonization in Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) patients.

Autores: Ana Paula Marchi, Camila Fonseca Rizek, Flávia Rossi, Ulysses Amigo, Anna Sara S. Levin, Silvia Figueiredo Costa

9. REFERÊNCIAS

1. Almeida LM, Araujo MRE, Iwasaki MF, Sacramento AG, Rocha D, Silva LP, Pavez M, Brito AC, Ito LCS, Gales AC, Lincopan N, Sampaio JLM, Mamizuka EM. Linezolid Resistance in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolates in a Brazilian Hospital. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, 58:5, 2993-2993, 2014
2. Arias CA, Murray BE. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* ; 10(4):266-78, 2012
3. Balletto E, Mikulska M. Bacterial infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2015, 7(1)
4. Billström H, Lund B, Sullivan A, Nord CA. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*., *Int J Antimicrob Agents*; 32(5):374-377, 2008.
5. Bossaer JB, Hall PD, Garrett-Mayer E. Incidence of vancomycin-resistant enterococci (VRE) infection in high-risk febrile neutropenic patients colonized with VRE. *Support Care Cancer*; 19(2):231-237, 2010.
6. Camargo ILCB, Zanella RC, Gilmore MS, Darini ALC. Virulence factors in Vancomycin-Resistant and Vancomycin-Susceptible *Enterococcus faecalis* from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39:273-278, 2008.
7. Cattoir V, Leclercq R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *J Antimicrob Chemother*; 68 (4):731-42, 2013.
8. Chang CM, Wang LR, Lee HC, Lee NY, Wu CJ, Ko WC. Characterisation of vancomycin-resistant enterococci from hospitalized patients at a tertiary centre over a seven-year period. *Journal of Hospital Infection*; 74:377-384, 2010.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth-first Information Supplement, CLSI document M100-S21, Wayne, Pennsylvania, 2013.

10. Conceição N, Oliveira CCHB, Silva PR, Ávila BGM, Oliveira AG. Trends in antimicrobial resistance among isolates of enterococci in a Brazilian tertiary hospital: a 4-year study. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; 44(2):177-81, 2011.
11. Conceição N, Silva EPS, Darini ALC, Silva AP, Oliveira AG. Penicilin-resistant, ampicilin-susceptible *Enterococcus faecalis* of hospital origin: *pbp4* gene polymorphism and genetic diversity. *Infection, Genetic and Evolution*: (28) 289-295, 2014.
12. Correa AAF, Pignatari ACC, Silveira M, Mingone RCC, Oliveira VGS, Fortaleza CMCB. Small hospitals matter: insights from the emergence and spread of vancomycin-resistant enterococci in 2 public hospitals in inner Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 82: 227–233, 2015.
13. Dalla-Costa LM, Souza DC, Martins LT, Zanella RC, Brandilone MC, Bokermann S, Sader HS, Souza HA. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: First Case in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 1998; 2(3):160-163
14. D´Azevedo PA, Santiago KALS, Furtado GH, Xavier DB, Pignatari ACC, Almeida RT. Rapid detection of Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) in rectal samples from patients admitted to intensive care units. *Braz J Infect Dis*. 2009; 13(4):289-293
15. Do Prado GV, Marchi AP, Moreno LZ, Rizek C, Amigo U, Moreno AM, Rossi F, Guimaraes T, Levin AS, Costa SF. Virulence and resistance pattern of a novel sequence type of linezolid-resistant *Enterococcus faecium* identified by whole-genome sequencing. *J Glob Antimicrob Resist*. 2016 Sep; 6:27-31
16. Facklan RR, Sahm DF, Teixeira LM. *Enterococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC And Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington: ASM PRESS; p. 297-305; 1999.

17. Fallico L, Boldrin C, Grossato A, Franchin E, De Canale E, Tommasini T, Parisi SG, Mangarelli R, Palú G. Molecular epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates from an Italian hospital. *Infection*. 2011;39(2):127-33.
18. Faria NA, Carrico JA, Oliveira DC, Ramirez M, De Lencastre H. Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*. 46(1):136-44. 2008
19. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol*. Mar;186(5):1518-30. 2004
20. Freitas AR, Tedim AP, Novais C, Garbajosa PR, Werner G, Gomez JAL, Cantón R, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Global Spread of the hylEfm Colonization-Virulence Gene in Megaplasms of the *Enterococcus faecium* CC17 Polyclonal Subcluster. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 56(6):2660-2665, 2010.
21. Gagnon S, Lévesque S, Lefebvre B, Bourgault AM, Labbé AC, Roger M. *vanA*-containing *Enterococcus faecium* susceptible to vancomycin and teicoplanin because of major nucleotide deletion in Tn1546. *J Antimicrob Chemother*, 66: 2758-2762, 2011.
22. Gales AC, Sader HS, Ribeiro J, Zozzoli C, Barth A, Pignatari AC. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2005-2008). *Braz J Infect Dis*, 13(2):90-98, 2009.
23. Heikens E, Schaik WV, Leavis HL, Bontem MJM, Willems RJL. Identification of a Novel Genomic Island Specific to Hospital-Acquired Clonal Complex 17 *Enterococcus faecium* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 7094–7097, 2008.
24. Hsieh YC, Lee WS, Ou TY, Hsueh PR. Clonal spread of CC17 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with multilocus sequence type 78 (ST78) and a novel ST444 in Taiwan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29(1):25-30.

25. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control*. 2008 Jun;36(5):309-32.
26. Howden BP, Mcevoy CR, Allen DL, Chua K, Gao W, Harrison PF, Bell J, Coombs, G, Bennett-Wood V, Porter JL, Robins-Browne R, Davies JK, Seemann T, Stinear TP. Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component regulator WalKR. *PLoS Pathog*, 7(11):e1002359, 2011
27. Humphereys H. Implications of colonization of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in renal dialysis patients. Learning to live with it? *Journal of Hospital Infection [S.I.]*, 58(1):28-33, 2004.
28. Jones RN, Guzman-Blanco M, Gales AC, Gallegos B, Castro AL, Martino MD, Veja S, Zurita J, Cepparulo M, Castanheira M. Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). *Braz J Infect Dis*. 17(6):672-81. 2013.
29. Kamboj M, Chung D, Seo SK, Pamer EG, Sepkowitz KA, Jakubowski AA, Papanicolaou G. The Changing Epidemiology of Vancomycin-Resistance Enterococcus (VRE) Bacteremia in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant (HSCT) Recipients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation [S.I.]*, 16(11):1576-1581, 2010.
30. Kang M, Xie Y, He C, Chen ZX, Guo L, Yang Q, Liu JY, Du Y, Ou QS, Wang LL. Molecular characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from a tertiary care hospital in Chengdu, China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 33:933-939, 2014.
31. Khan MA, Northwood JB, Loor RG, Tholen AT, Riera E, Falcón M, Paraguayan Antimicrobial Network, van Belkum A, van Westreenen M, Hays JP. High prevalence

- of ST-78 infection-associated vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from hospitals in Asunción, Paraguay. Clin Microbiol Infect. 16(6):624-7, 2010.
32. Khan SA, Nawaz MS, Khan AA, Hopper SL, Jones RA, Cerniglia CE. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. from poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. Molecular and Cellular Probes; 19:27-34; 2005.
33. Klare I, Konstabel C, Muller-Bertling S, Werner G, Strommenger B, Kettlitz C, Borgmann S, Schulte B, Jonas D, Serr A, Fahr AM, Eigner U, Witte W. Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 24(12):815-25.2005
34. Kleinheinz KA, Joensen KG, Larsen MV. Applying the ResFinder and VirulenceFinder web-services for easy identification of acquired antibiotic resistance and *E. coli* virulence genes in bacteriophage and prophage nucleotide sequences. Bacteriophage 4, e27943; January – December 2014.
35. Klibi N, Said LB, Jouini A, Slama KB, López M, Sallem RB, Boudabous A, Torres C. Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in enterococci from meat in Tunisia. Meat Science, 93, 675-680, 2013
36. Klupp EM, Both A, Belmar Campos C, Büttner H, König C, Christopeit M, Christner M, Aepfelbacher M, Rohde H. Tedizolid susceptibility in linezolid- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016.
37. Kobayashi CCBA, Sadoyama G, Vieira JDG, Pimenta FC. Resistência antimicrobiana associada em isolados clínicos de *Enterococcus* spp. Revista Brasileira de Medicina Tropical; 44(3):344-348, 2011.

38. Krawczyk B, Samet A, Bronk M, Hellmann A, Kur J. Emerging Linezolid-Resistant, Vancomycin Resistant *Enterococcus faecium* from a Patient of Haematological Unit in Poland. Polish Journal of Microbiology, Vol. 53, n° 3, 193-196, 2004
39. Kuo A-J, Su L-H, Shu, J-C Wang, J-H. National Surveillance on Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* in Taiwan: Emergence and Widespread of ST414 and a Tn1546-Like Element with Simultaneous Insertion of IS1251-like and IS1678. PLoS ONE 9(12), 2014.
40. Kulski JK. Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. Next Generation Sequencing - Advances, Applications and 29 Challenges, p. 3–60, 2016.
41. Krull M, Klare I, Ross B, Trenchel R, Beelen DW, Todt D, Steinmann E, Buer J, Rath P-M, Steinmann J. Emergence of linezolid- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a department for hematologic stem cell transplantation. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 5:31, 2016.
42. Lam MMC, Seerman T, Bulach DM, Gladman SL, Chen H, Haring V, Moore RJ, Ballard S, Grayson ML, Johnson PDR, Howden BP, Stinear TP. Comparative Analysis of the First Complete *Enterococcus faecium* Genome. Journal of Bacteriology, p. 2334-2341, 2012.
43. Lam MMC, Seerman T, Bulach DM, Gladman SL, Chen H, Haring V, Moore RJ, Ballard S, Grayson ML, Johnson PDR, Howden BP, Stinear TP. Comparative analysis of the complete genome and epidemic hospital sequence type 203 clone of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. BMC Genomics, 2013., 14:595
44. Lagesen K, Hallin PF, Rødland E, Stærfeldt HH, Rognes T, Ussery DW. RNAmmer: consistent annotation of rRNA genes in genomic sequences Nucleic Acids Res. 2007 Apr 22.

45. Liu Y, Cao B, Gu L, Wang H. Molecular Characterization of Vancomycin-Resistant Enterococci in a Chinese Hospital Between 2003 and 2009. *Microbial Drug Resistance*, 17(3):449-55, 2011
46. López M, Álvarez-Martinez MJ, Marco F, Torres C. *Enterococcus faecium* resistente a glucopéptidos. Análisis del genótipo de resistência, virulência y líneas genéticas. *Enferm. Infecc. Microbiol Clin.*, 31(1): 10-14, 2013.
47. Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Cagant DA, Feavers IM, Achtman M and Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 3140-3145, 1998.
48. Lam MM, Seemann T, Bulach DM, Gladman SL, Chen H, Haring V, Moore RJ, Ballard S, Grayson ML, Johnson PD, Howden BP, Stinear TP.. Comparative Analysis of the First Complete *Enterococcus faecium* Genome. *Journal of Bacteriology* p. 2334–2341, 2012.
49. McLaughlin M, Malczynski M, Qi C, Barajas G, Radetski J, Zembower T, Scheetz M. Virulence of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* According to Linezolid Resistance and Clinical Outbreak Status. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Agosto 2013. Vol. 57, Numero 8 p. 3923-3927
50. Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, Prior K, Szczepanowski R, Ji Y, Zhang W, McLaughlin SF, Henkhaus JK, Leopold B, Bielaszewska M, Prager R, Brzoska PM, Moore RL, Guenther S, Rothberg JM, Karch H. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One*. 6(7): e22751, 2011;
51. Miranda BG, Lisboa LF, Vieira MB, Dulley FL, Fonseca GG, Guimarães T, Shikanai-Yasuda MA, Costa SF. Preemptive use of linezolid in hematological and HSTC patients colonized by VRE, 2010.

52. Mulvey MR, Chui L, Ismail J. et al (2001) Canadian Committee for Standardization of Molecular Methods. Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 39(10):3481-3485.
53. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS and Pfaller MA. *Microbiologia Médica*. Trad. Patrícia J. Vouex. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 172; 1998.
54. Ntokou E, Stathopoulos C, Kristo I, Dimitroulia E, Labrou M, Vasdeski A, Makris D, Zakynthinos E, Tsakris A, Pournaras S. Intensive care unit dissemination of multiple clones of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother*, 67:1819-1823, 2012
55. Palazzo IC, Pitondo-Silva A, Levy CE, Da Costa Darini AL. Changes in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing outbreaks in Brazil. *J. Hosp. Infect.* 79 (1): 70-4, 2011.
56. Palmet KL, Kos VN, Gilmore MS. Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, Science Direct; 13:632-639; 2010.
57. Prereira GH, Müller PR, Zanella RC, De Jesus Castro Lima M. Torchio DS, Levin AS. Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital: the lack of effect of measures directed mainly by surveillance cultures and differences in response between *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Am J Infect Control*. 38(5):406-9, 2010.
58. Patel R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Cockerill FR. Multiplex PCR Detection of vanA, vanB, vanC-1, and vanC-2/3 Genes in Enterococci. *Jounal of Clinical Microbiology*; 35(3):703-707, 1997.
59. Petrich A, Luinstra K, Page B, Callery S, Stevens D, Gafni A, Groves D, Chernesky M, Mahony JB. Effect of routine use of a multiplex PCR for detection of vanA- and

- vanB- mediated enterococcal resistance on accuracy, costs and earlier reporting. *Diagnostic Microbiology and Infection Disease*; 41:215-220; 2001.
60. Petrich AK, Luinstra KE, Groves D, Chernesky MA, Mahony JB. Direct detection of vanA and vanB genes in clinical specimens for rapid identification of vancomycin resistant enterococci (VRE) using multiplex PCR. *Molecular and Cellular Probes*; 13:275-281, 1999.
 61. Poeta P, Igrejas G, Costa D, Satgo R, Rodrigues J, Torres C. Virulence factors and bacteriocins in faecal enterococci of wild boars. *Journal of Basic Microbiology*; 48:385-392; 2008.
 62. Rice LB, Carias L, Rudin S, Vael C, Goossens H, Konstabel C, Klare I, Nallapareddy SR, Huang W, Murray BE. A Potential Virulence Gene hylEfm, Predominates in *Enterococcus faecium* of Clinical Origin. *The Journal of Infectious Diseases*; 187:508-512, 2003.
 63. Rolf S, Kaas Pimlapas Leekitcharoenphon, Frank M. Aarestrup, Ole Lund. Solving the Problem of Comparison Whole Bacterial Genomes across Different Sequencing Platforms. *PLoS One* 2014; 9(8): e104984
 64. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, Leamon JH, Johnson K, Milgrew MJ, Edwards M, Hoon J, Simons JF, Marran D, Myers JW, Davidson JF, Branting A, Nobile JR, Puc BP, Light D, Clark TA, Huber M, Branciforte JT, Stoner IB, Cawley SE, Lyons M, Fu Y, Homer N, Sedova M, Miao X, Reed B, Sabina J, Feierstein E, Schorn M, Alanjary M, Dimalanta E, Dressman D, Kasinskas R, Sokolsky T, Fidanza JA, Namsaraev E, McKernan KJ, Williams A, Roth GT, Bustillo J. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*; 475(7356):348-52; 2011.
 65. Sacramento Ag, Zanella RC Esposito F, Costa EAS, Almeida LM, Pires C, Brito AC, Mamizuka EM, Cerdeira LT, Lincopan N. Changed epidemiology during intra and interhospital spread of high-risk clones of vanA-containing *Enterococcus* in Brazilian hospitals. *Diagn Microb Infect Dis* 2017;88:348-351.

66. Scheetz MH, Knechtel SA, Postelnick MJ, Malczynski M, Qi C. Differences in Clinical Outcomes in Patients with Vancomycin-Resistant Enterococci According to Linezolid Susceptibility. *Pharmacotherapy*; 30(12):1221-1228; 2010.
67. Schmidt-Hieber M, Blau IW, Schwartz S, Uharek L, Weist K, Eckmanns T, Jonas D, Rüden H, Thiel E, Brandt C. Intensified Strategies to Control Vancomycin-Resistant Enterococci in Immunocompromised Patients. *International Journal of Hematology [S.I.]*; 86(2):158-162, 2007.
68. Schulte B. Emergence of increasing linezolid-resistance in enterococci in a post-outbreak situation with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Epidemiol Infect* 2008; 136: 1131–3
69. Seemann T. *Prokka: rapid prokaryotic genome annotation*. *Bioinformatics*. 2014 Jul 15;30(14):2068-9. PMID:24642063
70. 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 [S.I.]*; 67(1):193-200, 1999.
71. Sharifi Y, Hasani A, Ghotaslou R, Mojtaba V, Hasani A, Aghazadeh M, Milani M. Survey of Virulence Determinants among Vancomycin Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Clinical Specimens Hospitalized Patients of North west of Iran. *The open Microbiology Journal*, 6, 34-39, 2012.
72. Silva LPP, Pitombo-Silva A, Martinez R, Darin, AL da C. Genetic features and molecular epidemiology of *Enterococcus faecium* isolated in two university hospitals in Brasil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 74, 267-271, 2012.
73. Simner PJ, Adam H, Baxter M, Mccracken M, Golding G, Karlowsky JA, Nichol K, Lagacé-Wiens P, Gilmour MW. Epidemiology of Vancomycin-Resistant Enterococci

- (VRE) in Canadian Hospitals: CANWARD 2007-2013. Antimicrob. Agents Chemother. Abril, 2015.
74. Song JY, Cheong HJ, Seo YB, Kim IK, Jung YH, Noh JY, Choi WS, Kim WJ. Clinical and Microbiological Characteristics of Vancomycin-Resistant Enterococci with the VanD Phenotype and *vanA* Genotype. Jpn. J. Infect. Dis., 66, 1-5, 2013.
 75. Sood S, Mmalhotra M, Kapil BK, Das & Arti. Enterococcal infection & antimicrobial resistance. Indian J Med Res.; 128:111-121; 2008.
 76. Spiliopoulou I, Damani A, Chini V, Loukia Z, Kolonitsiou F, Anastassiou ED, Petinaki E. Linezolid-Resistant Enterococci in Greece: Epidemiological Characteristics. Chemotherapy, 57:181-185, 2011.
 77. Spratt BG, Hanage WP, Li B, Aanensen DM and Feil EJ. Displaying the relatedness among isolates of bacterial species -- the eBURST approach. FEMS Microbiol Lett. Dec 15;241(2):129-34. 2004
 78. Sun H, Wang H, Xu Y, Jones RN, Castello AJ, Liu Y, Li G, Chen M, Mendes RE. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus spp.* clinical isolates recovered from hospitalized patients among several medical institutions in China. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 74, 399-403, 2012.
 79. Tschudin Sutter S, Frei R, Dangel M, Gratwohl A, Bonten M, Widmer AF. Not all Patients with Vancomycin-Resistant Enterococci Need to be Isolated. Clinical Infectious Diseases, 56(6):678-683; 2010.
 80. Tacconelli E, Cataldo MA. Vancomycin-resistant enterococci (VRE): transmission and control. International Journal of Antimicrobial Agents; 31:99-106, 2008.
 81. Top J, Willems R, Bonten M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. FEMS Immunol Med Microbiol. 52(3):297-308.2008

82. Tavadze M, Rybicki L, Mossad S, Avery R, Yurch M, Pohlman B, Duong H, Dean R, Hill B, Andresen S, Hanna R, Majhail N, Copelan E, Bolwell B, Kalaycio M, Sobecks R. Risk factors for vancomycin-resistant enterococcus bacteremia and its influence on survival after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 49, 1310–1316, 2014.

83. Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, Jabes D, Goossens H. . Developed of a Multiplex PCR for the Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp* and *hyl* Genes in Enterococci an Survey for Virulence Determinats among European Isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(10):4473-4479, 2004.

84. Vankerckhoven V, Huys G, Vancanneyt M, Snauwaert C, Swings J, Klare I, Witte W, Van Autgaerden T, Chapelle S, Lammens C, Goossens H.. Genotypic Diversity, Antimicrobial Resistance, and Virulence Factors of Human and Probiotic Cultures Constituting Two Intraspecific Groups of *Enterococcus faecium* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*.; 74(14):4247-4255; 2008.

85. Wanxiang Li, Jing Li, Quhao Wei, Qingfeng Hu, Xiaowei Lin, Mengquan Chen, Renji Ye And Huoyang Lv. Characterization of Aminoglycoside Resistance and Virulence Genes among *Enterococcus* spp. Isolated from a Hospital in China. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, (12) 3014-3025, 2015.

86. Warren DK, Kollef MH, Seiler SM, Fridkin SK, Fraser VJ. The epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization in a medical intensive care unit. *Infect Hosp Epidemiol [S.I.]*, 24(4):416-20, 1998

87. Weidner-Wells MA, Werblood HM, Goldschmidt R, Bush K, Foleno BD, Hilliard JJ, Melton J, Wira E, Macielag MJ. The synthesis and antimicrobial evaluation of a new series of isoxazolinyl oxazolidinones; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14:369-372, 2004.

88. Weinstock DM, Conlon M, Iovino C, Aubrey T, Gudiol C, Riedel E, Young JW, Kiehn TE, Zuccotti G. Colonization, Bloodstream Infection, and Mortality Caused by Vancomycin-Resistant Enterococcus Early after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [S.I.], 13(5):615-621, 2007.
89. Williams PM. Techniques for root cause analysis. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* [S.I.], 14(2):154-157, 2001.
90. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
91. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24.179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* [S.I.], 39(3):309-317, 2004.
92. Woodford N, Soltani M, Hardy K. Frequency of esp in Enterococcus faecium isolates. *The Lancet* [S.I.], 358(9281):853-855, 2001.
93. Worth LJ, Slavin MA, Vankerckhoven V, Goossens H, Grabsch EA, Thursky KA. Virulence determinants in Vancomycin-resistant Enterococcus faecium vanB: clonal distribution, prevalence and significance of esp and hyl in Australian patients with hematological disorders. *Journal of Hospital Infection*. 68:137-144, 2008.
94. Yang JX, Li T, Ning YZ, Shao D, Liu J, Wang S, Liang G. Molecular characterization of resistance, virulence and clonality in vancomycin-resistant Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis: A hospital-based study in Beijing, China. *Infection, Genetics and Evolution* 33, 253–260, 2015.
95. Zirakzadeh A. and Patel R. Vancomycin-resistant enterococci: colonization, infection, detection, and treatment. *Mayo Clin Proc* [S.I.], 81(4):529-536, 2006.