UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Epidemiologia molecular e genética da resistência à vancomicina
em enterococos isolados de pacientes de dois hospitais de
Ribeirão Preto**

Leila Priscilla Pinheiro da Silva

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Epidemiologia molecular e genética da resistência à vancomicina
em enterococos isolados de pacientes de dois hospitais de
Ribeirão Preto**

Leila Priscilla Pinheiro da Silva

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia como
etapa obrigatória para a obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia da Costa Darini

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Silva, Leila Priscilla Pinheiro da

Epidemiologia molecular e genética da resistência à vancomicina em enterococos isolados de pacientes de dois hospitais de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2012.

78p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Darini, Ana Lúcia da Costa

1. VRE. 2. Tn1546. 3. Fatores de virulência. 4. PFGE. 5. MLST. 6. Complexo clonal 17.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Leila Priscilla Pinheiro da Silva

Epidemiologia molecular e genética da resistência à vancomicina em enterococos isolados de pacientes de dois hospitais de Ribeirão Preto

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profª Drª Ana Lúcia da Costa Darini

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Este trabalho de pesquisa foi realizado nos seguintes centros de pesquisa:

Laboratório Principal: **Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular** do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP.

Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde foram isoladas as bactérias estudadas, sob coordenação do Prof. Dr. Roberto Martinez.

Dedico este trabalho

*Primeiramente a Deus, à minha amada
mãe, ao meu amado Diógenes e aos
queridos amigos.*

Agradecimentos

À *Profª Drª Ana Lúcia da Costa Darini*, professora titular da FCFRP-USP e coordenadora do LEBEM, pela confiança em mim depositada, pela oportunidade de realizar o mestrado sob sua orientação, pelos ensinamentos, paciência, dedicação e ao constante estímulo em favor do meu crescimento profissional durante todo o período de realização do trabalho.

Ao *Profº Roberto Martinez*, coordenador e supervisor da Seção de Microbiologia e Sorologia do HCFMRP-USP, por todo o aprendizado adquirido desde a realização de Aprimoramento em Microbiologia no referido hospital. Obrigada pelos valiosos ensinamentos, disposição em ajudar e por disponibilizar as bactérias para realização do presente estudo.

À *Srª Rosa Helena A. R. Gironi*, chefe do Laboratório de Microbiologia do HCFMRP-USP, e a todos os profissionais desse Laboratório pelo maravilhoso convívio, pelos ensinamentos concedidos, pela experiência profissional adquirida, pela paciência, amizades conquistadas e companheirismo. Agradeço também, as aprimorandas Mirley e Vanessa, as quais se tornaram minhas verdadeiras amigas, ajudando-me a amenizar a saudade da minha família. Obrigada de coração a todos vocês.

À *Profª Drª Ilana L. B. C. Camargo*, professora doutora do Instituto de Física de São Carlos – USP, pelo auxílio no planejamento de algumas metodologias utilizadas, pelos ensinamentos concedidos, pelas idéias esclarecedoras e pela constante disposição em ajudar.

Aos amigos do LEBEM, *André, Eduardo, Leonardo, Renata, Joseane, Ludmilla, Milena, Carolina, Natália, Juliana e Rubens*, muito obrigada pela amizade, carinho, momentos descontraídos e por tornarem o LEBEM um ambiente prazeroso de se trabalhar. Obrigada pela paciência, disposição em ajudar, discussões científicas, sugestões e ajudas em experimentos. Vocês foram essenciais para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao *Prof. Dr. Wilson de Araújo da Silva Júnior*, professor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e às *Srªs Adriana Aparecida Márquez e Cristiane Ayres*, pela realização dos sequenciamentos de DNA, sendo de grande importância para conclusão deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de mestrado concedida e suporte financeiro ao LEBEM.

À Deus, por me escutar, guiar e proteger nas horas de aflição, por iluminar minha vida e acalmar o meu espírito.

À minha família, e em especial a minha querida mãe, exemplo de mulher, a qual é minha fonte inspiradora, obrigada por todo apoio, incentivo, carinho, paciência, pelos ensinamentos de uma vida, por me fazer acreditar e me convencer que sou capaz de obter tudo aquilo que desejo, desde que haja muita dedicação e amor. Obrigada por sempre me dar forças e me confortar nas horas mais difíceis. Obrigada por existir em minha vida. Seu apoio foi crucial para realização deste trabalho. Te amo.

Ao Diógenes, meu grande amor, por todo companheirismo, dedicação, paciência, por sempre estar presente mesmo distante, pelos incentivos, amor e carinho dedicados a mim. Seu apoio foi muito importante para realização deste trabalho. Muito obrigada por tudo. Te amo.

À minha querida amiga Joana, por sua companhia durante 6 meses aqui em Ribeirão Preto, ajudando-me a abrandar a saudade da minha cidade querida (Natal/RN). Obrigada por ter se tornado esta amiga-irmã tão fiel e dedicada.

Às minhas queridas amigas, Ana Flávia, Jack, Renata, Milena e Simone, amigas sinceras, companheiras e leais, que me fizeram acreditar que a felicidade só é plenamente conquistada quando se tem amigos verdadeiros. Obrigada por tornarem minha vida em Ribeirão Preto mais prazerosa e gratificante.

“A vida que nós recebemos nos foi dada não para que simplesmente a admiremos, mas para que estejamos sempre à procura de uma nova verdade escondida dentro de nós”.

Conde Leon N. Tolstoi

RESUMO

SILVA, L. P. P. **Epidemiologia molecular e genética da resistência à vancomicina em enterococos isolados de pacientes de dois hospitais de Ribeirão Preto.** 2012. 78f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A emergência de resistência à vancomicina no mundo iniciou-se no final dos anos 80, sendo primeiro documentada na parte ocidental da Europa e posteriormente nos EUA. Depois disso, o isolamento de enterococos resistentes à vancomicina (VRE - do inglês, *vancomycin-resistant enterococci*) tem sido continuamente reportado em diversas localizações geográficas, inclusive no Brasil. As infecções nosocomiais causadas por enterococos são grandes desafios para os médicos devido à ocorrência de isolados resistentes a múltiplos antibióticos. Diversos métodos de tipagem molecular têm sido utilizados para estudar a epidemiologia de VRE. Neste trabalho, foi realizada a caracterização genética da resistência à vancomicina e epidemiologia molecular de VREs isolados de pacientes de dois hospitais de Ribeirão Preto, o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e a Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto (SCMRP), no período de setembro de 2008 a setembro de 2010. Foram estudados também os primeiros VREs isolados no HCFMRP-USP, em meados de 2005/2006. Foram determinadas as espécies e os genótipos de 53 VREs, pela reação da polimerase em cadeia (PCR), e todos eram *E. faecium* e apresentavam o gene *vanA*. Todos *E. faecium* isolados dos 2 hospitais em estudo apresentaram CIM para vancomicina $>256\mu\text{g/mL}$ pelo Etest[®], já daptomicina mostrou valores de CIM dentro do limite de sensibilidade para todos os enterococos analisados. Com relação aos fatores de virulência, foi evidente a predominância dos genes *acm* e *esp* nos *E. faecium* estudados. Os primeiros VRE_{fm} (do inglês, *vancomycin-resistant E. faecium*) isolados em meados de 2005/2006 de pacientes do HCFMRP-USP apresentaram o transposon Tn1546 intacto, já todos os *E. faecium* isolados do HCFMRP-USP e da SCMRP, no período de setembro de 2008 a setembro de 2010, apresentaram produto de amplificação maior do que os 4,4kb esperados para agrupamento gênico *vanRSHAX*. Resultados de *overlapping* PCR e sequenciamento da região do transposon que amplificou fragmento de DNA com tamanho maior que o esperado utilizando *primers* P11-P12, mostraram que 81% (43 VRE_{fm}) isolados nos dois hospitais em estudo, no período de setembro de 2008 a setembro de 2010, apresentaram deleção da extremidade esquerda do Tn1546 e inserção (IS1251), entre genes *vanS* e *vanH*. A análise da PFGE dos VRE_{fm} em estudo mostrou que havia ocorrido disseminações clonais com determinados perfis de PFGE em períodos específicos. O fato dos primeiros VRE_{fm} terem apresentado perfil de PFGE diferente da maioria dos isolados, não permitiu que se determinasse o ancestral comum por PFGE, mas resultados de MLST mostraram que VRE_{fm} isolados, no período de 2008-2010, podem ser descendentes diretos destes cinco primeiros VRE_{fm} ou podem ter evoluído de um mesmo ancestral comum. A análise da tipagem por MLST de 31 linhagens de VRE_{fm} selecionadas a partir dos resultados de PFGE, mostrou que havia 9 STs diferentes, dentre estes, sendo 5 STs novos (656, 657, 658, 659 e 660). Os STs predominantes foram STs 412 e 478. Todos STs identificados pertenciam ao complexo clonal 17 (CC17), com exceção do ST658 que era um *singleton*. O ST78 que vem se disseminando mundialmente, foi identificado pela primeira vez no Brasil em linhagens do presente estudo. E, por fim, a tipagem por MLST comprovou o que já havia sido determinado pelos resultados de PFGE, que existe relação clonal entre linhagens isoladas nos dois hospitais estudados de Ribeirão Preto.

Palavras-chave: VREs, Tn1546, fatores de virulência, PFGE, MLST, CC17

ABSTRACT

SILVA, L. P. P. **Molecular epidemiology and genetics of vancomycin resistance in enterococci isolated from patients in two hospitals in Ribeirão Preto, Sao Paulo, Brazil.** 2012. 78f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

World reports on vancomycin resistance emerged in the late 1980s and first documented in Western Europe and later in the United States. Since then, isolation of vancomycin-resistant enterococci (VRE) has been continuously reported in several geographic locations, including Brazil. The widespread occurrence of strains resistant to multiple antibiotics present a challenge to clinicians when treating enterococci caused nosocomial infections. Several molecular typing methods have been used to study the epidemiology of VRE. In this study, genetic characterization of vancomycin resistance and molecular epidemiology were performed in VREs isolated from patients in two hospitals in Ribeirão Preto, Sao Paulo/Brazil, the University Hospital of the Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo (HCFMRP-USP) and the Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto (SCMRP), from September 2008 to September 2010. The first five VREs isolated in the HCFMRP-USP, in mid 2005/2006 were also included in this study. Species and genotypes of 53 VREs determined by the polymerase chain reaction (PCR) were all *E. faecium* and had the *vanA* gene. MICs for vancomycin determined by Etest® were >256µg/mL for all *E. faecium* isolated in the two hospitals, whereas daptomycin showed MIC values within the limit of susceptibility for all the enterococci analyzed. *acm* and *esp* genes predominated as virulence factors. The first five vancomycin resistant *E. faecium* (VRE_{fm}) isolated in mid 2005/2006 showed an intact Tn1546 transposon, whereas all *E. faecium* isolated later, September 2008 to September 2010, gave a larger amplified DNA fragment than the expected 4,4kb gene cluster *vanRSHAX*. Results of overlapping PCR and sequencing (primers P11-P12) of the transposon region that amplified the larger than expected DNA fragment showed that 81% (n=43) of the these VRE_{fm} had a deletion of the left end of Tn1546 and also a IS1251, between the *vanS* and *vanH* genes. The analysis of VRE_{fm} PFGEs indicated the occurrence of clonal disseminations with some PFGE profiles at specific times. The different PFGE profiles of the first VRE_{fm} (2005-2006) in relation to the latter isolates showed that the common ancestor could not be determined by PFGE. However, MLST results indicated that VRE_{fm} isolated, in the period from 2008 to 2010, could be direct descendants of the first five VRE_{fm} or could have evolved from a common ancestor. MLST analysis of 31 VRE_{fm} isolates selected according to the PFGE results, showed that there were nine different STs, among these five new STs (656, 657, 658, 659, 660). The predominant STs were ST412 and 478. All STs identified belonged to clonal complex 17 (CC17), except for ST658, a singleton. The ST78 that has spread worldwide is being identified in Brazil for first time in this study. MLST confirmed PFGE results showing that there is a clonal link between strains isolated in the two hospitals of Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil.

Keywords: VREs, Tn1546, virulence factors, PFGE, MLST, CC17

RESUMEN

SILVA, L. P. P. **Epidemiología molecular y genética de la resistencia a la vancomicina en enterococos aislados de pacientes de dos hospitales de la ciudad de Ribeirao Preto.** 2012. 78h. Disertación (Máster). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

La aparición de resistencia a la vancomicina en el mundo comenzó a finales de los 80, y fue documentado por primera vez en Europa Occidental y más tarde en Estados Unidos. Después de esto, el aislamiento de enterococos resistentes a vancomicina (VRE - del inglés, *vancomycin-resistant enterococci*) ha sido continuamente informado en distintas localizaciones, entre ellas Brasil. Las infecciones nosocomiales causadas por enterococos son grandes retos para los médicos debido a la aparición de aislados resistentes a múltiples antibióticos. Varios métodos de tipificación molecular han sido utilizados para estudiar la epidemiología de VRE. En este trabajo, hemos realizado la caracterización genética de la resistencia a la vancomicina y la epidemiología molecular de VREs aislados de pacientes de dos hospitales de Ribeirao Preto, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e a Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto (SCMRP), desde septiembre de 2008 a septiembre de 2010. Se estudiaron también los primeros aislados VREs en el HCFMRP-USP, en 2005/2006. Se determinaron las especies y el genotipo de 53 VREs, por la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) y todos fueron *E. faecium* y presentaron el gen *vanA*. Los aislados *E. faecium* de los dos hospitales del estudio presentaron CIM para vancomicina > 256µg/mL por el Etest[®], mientras que daptomicina mostró valores de CIM dentro del límite de sensibilidad para todos los enterococos analizados. Respecto a los factores de virulencia, fue evidente la mayoría de los genes *acm* y *esp* en los *E. faecium* estudiados. Los primeros aislados VRE_{fm} (del Inglés, *vancomycin-resistant E. faecium*) en 2005/2006 de pacientes del HCFMRP-USP presentaron el transposón Tn1546 intacto, mientras que todos los *E. faecium* aislados del HCFMRP-USP y de la SCMRP en el periodo de septiembre de 2008 hasta septiembre de 2010 presentaron producto de amplificación más grande que los 4,4kb esperados para el grupo de genes vanRSHAX. Los resultados de la PCR solapante y secuenciación de la región del transposón que amplificó fragmento de ADN con un tamaño más grande que el esperado utilizando cebadores P11-P12, mostraron que 81% (43 VRE_{fm}) aislados en los dos hospitales en estudio, en el periodo de septiembre de 2008 hasta septiembre de 2010, presentaron pérdida del trozo izquierdo del Tn1546 y inserción (IS1251), entre los genes *vanS* y *vanH*. El análisis por PFGE de los VRE_{fm} demostró que había ocurrido diseminaciones clonales con determinados perfiles de PFGE en periodos específicos. El hecho de los primeros VRE_{fm} presentaren un perfil de PFGE diferente de la mayoría de los aislamientos, no permitió que se determinase el ancestro común por PFGE, pero los resultados de MLST mostraron que VRE_{fm} aislados, en el período 2008-2010, pueden ser descendientes directos de estos cinco primeros VRE_{fm} o pueden haber evolucionado de un ancestro común. El análisis de tipificación por MLST de 31 aislados de VRE_{fm} seleccionados de los resultados de PFGE, mostró que había 9 STs diferentes, entre estos, cinco son nuevos STs (656, 657, 658, 659 y 660). Los STs predominantes fueron 412 y 478. Todos los STs identificados pertenecían al complejo clonal 17 (CC17), con excepción del ST658 que fue un *singleton*. El ST78, diseminado por todo el mundo, fue identificado por primera vez en Brasil en lineages de este estudio. Y, por último, la tipificación por MLST comprobó lo que ya había sido determinado por los resultados de PFGE, que existe una relación clonal entre lineages aisladas en los dos hospitales estudiados de Ribeirao Preto.

Palabras-clave: VREs, Tn1546, factores de virulencia, PFGE, MLST, CC17

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas moleculares de glicopeptídeos	3
Figura 2	Estrutura química da daptomicina	4
Figura 3	Representação esquemática do protótipo Tn1546, mostrando o conjunto de genes <i>vanA</i> que conferem resistência aos glicopeptídeos	7
Figura 4	Representação esquemática das posições dos pares de <i>primers</i> que auxiliam na reação de amplificação denominada “ <i>overlapping PCR</i> ”. Os pares de <i>primers</i> utilizados neste estudo estão indicados por retângulos vermelhos	27
Figura 5	Gel de agarose a 1% demonstrando os fragmentos obtidos após clivagem do grupamento gênico <i>RSHAX</i>	36
Figura 6	Representação esquemática do Tn1546 intacto e dos elementos VanA dos VRE _{fm} do estudo	37
Figura 7	Dendrograma gerado pelo método UPGMA após PFGE utilizando o programa <i>Bionumerics</i> a partir do perfil de macrorrestrição do crDNA clivado com a enzima <i>SmaI</i>	39
Figura 8	Diagrama de similaridade genética gerado pelo programa eBURSTv3, com os dados de MLST de <i>E. faecium</i>	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Primers</i> utilizados nas PCRs para identificação das espécies de enterococos e pesquisa dos genes <i>vanA</i> , <i>vanB</i> e <i>vanC</i> 22
Tabela 2	Descrição dos <i>primers</i> utilizados para amplificação de genes de virulência... 24
Tabela 3	Conjunto de <i>primers</i> utilizados e localização no Tn1546 27
Tabela 4	Reagentes e volumes utilizados na reação de “ <i>overlapping PCR</i> ” 27
Tabela 5	Conjunto de <i>primers</i> utilizados para sequenciamento da região de inserção de IS1251 28
Tabela 6	<i>Primers</i> utilizados para a tipagem por MLST 31
Tabela 7	Distribuição de STs, CCs e PFGE entre VRE <i>fm</i> isolados no HCFMRP-USP e SCMRP no período de setembro de 2008 a setembro de 2010 e dos 5 primeiros VRE <i>fm</i> isolados do HCFMRP-USP 41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma (s)
µL	Microlitro (s)
Acm	<i>Collagen binding protein</i>
adk	Adenilato quinase
Agg	<i>Aggregation substance</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
atpa	ATP sintetase, subunidade alfa
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CC	Complexo clonal
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
Cyl	Citolisina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
crDNA	Ácido desoxirribonucléico cromossômico
cSSSI	<i>Complicated skin and skin structure infections</i>
CTI	Centro de Terapia Intensiva
CTIP	Centro de Terapia Intensiva Pediátrico
D-ala-D-ala	D-alanina-D-alanina
D-ala-D-lac	D-alanil-D-lactato
ddl	D-alanina-D-alanina ligase
DEPC	Dietilpirocarbonato
D-lac	D-lactato
DLV	<i>Double-locus variant</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
Esp	<i>Enterococcal surface protein</i>
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
F	<i>Forward</i>
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
g	Gravidade
GAM	Gastroenterologia
gdh	Desidrogenase glicose-6-fosfato
GeIE	Gelatinase

<i>gyd</i>	Deidrogenase gliceraldeido-3-fosfato
<i>HAI</i>	<i>Healthcare-associated infections</i>
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HCl	Ácido clorídrico
Hyl	Hialuronidase
IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
IMU	Imunologia
IS	<i>Insertion sequence</i>
Kb	Kilobase (s)
KCl	Cloreto de potássio
kg	Kilograma (s)
LEBEM	Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular
M	Molar (es)
mA	Miliampère (s)
mg	Miligramma (s)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro (s)
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
mM	Milimolar (es)
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
MSSA	<i>Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
ng	Nanograma (s)
ORF	<i>Open reading frame (s)</i>
ORT	Ortopedia
pb	Pares de base (s)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
pH	Potencial de hidrogênio
pmol	Picomol (es)
<i>pstS</i>	Transportador cassete ligado a ATP fosfato
<i>purK</i>	Fosforibosilaminoimidazol carboxilase subunidade ATPase
q.s.p	Quantidade suficiente para
R	<i>Reverse</i>
RNA	Ácido ribonucléico

rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
S	Subunidade
SCMRP	Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto
SLV	<i>Single-locus variant</i>
ST	<i>Sequence Type</i>
TBE	Tris, Ácido bórico, EDTA
TLV	<i>Triple-locus variant</i>
TMO	Transplante de medula óssea
Tn	Transposon
U	Unidade (s)
U.S. FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
V	Volts
VISA	<i>Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus</i>
VRE	<i>Vancomycin-resistant enterococci</i>
VRE_{fm}	<i>Vancomycin-resistant E. faecium</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percento
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
>	Maior
≥	Maior ou igual
<	Menor
≤	Menor ou igual
-	Menos
=	Igual

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. O gênero <i>Enterococcus</i>	2
1.2. Os antibióticos vancomicina e daptomicina	3
1.2.1. Vancomicina.....	3
1.2.2. Daptomicina	4
1.3. Resistência aos antibióticos	5
1.3.1. Resistência à vancomicina.....	5
1.3.1.1. Elementos VanA.....	8
1.3.2. Resistência à daptomicina	9
1.4. Fatores de virulência em enterococos.....	11
1.5. A importância de se estudar enterococos	12
1.5.1. Situação destas bactérias no mundo	12
1.5.2. Isolamento de VRE no Brasil	13
1.5.3. Isolamentos de VREs em hospitais de Ribeirão Preto	13
1.6. Métodos moleculares de tipagem epidemiológica.....	14
1.6.1. Eletroforese em campo pulsado.....	14
1.6.2. Tipagem por sequenciamento de <i>multilocus</i>	14
 2. Objetivos.....	 16
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
 3. Material e Métodos	 18
3.1. Amostras bacterianas.....	19
3.2. Extração de DNA genômico bacteriano	20
3.3. Identificação da espécie e determinação dos genótipos de resistência.....	21
3.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima	23
3.5. Pesquisa de genes de virulência.....	23
3.6. Caracterização dos elementos VanA	25
3.6.1. Clivagem do grupamento gênico <i>vanRSHAX</i>	26
3.6.2. <i>Overlapping</i> PCR dos elementos VanA	26
3.6.3. Identificação e localização exata do elemento de inserção	28
3.7. Eletroforese em campos pulsados.....	28

3.8. Tipagem por sequenciamento de <i>multilocus</i>	30
3.8.1. Sequenciamento dos produtos de PCR.....	31
3.8.2. Análises dos sequenciamentos	32
3.8.3. Determinação da relação genética entre as linhagens sequenciadas	32
4. Resultados	33
4.1. Determinação das espécies de enterococos	34
4.2. Pesquisa de genes <i>van</i>	34
4.3. Determinação da concentração inibitória mínima de vancomicina e daptomicina	34
4.4. Determinação da presença de genes de virulência	34
4.5. Os elementos VanA	35
4.6. Determinação da similaridade genômica de VRE _{fm} por PFGE.....	37
4.7. Tipagem por sequenciamento de <i>multilocus</i> (MLST)	40
5. Discussão	44
6. Conclusões	59
7. Referências	61
Apêndice	75

1. Introdução

1.1. O gênero *Enterococcus*

Os enterococos são bastante difundidos na natureza e podem ser encontrados no solo, plantas, água, alimentos e em animais, incluindo mamíferos, aves, insetos e répteis. Em humanos, como em outros animais, habitam predominantemente o trato gastrointestinal, ocorrendo em alto número, e são menos encontrados no trato geniturinário e cavidade oral. *Enterococcus* são cocos gram-positivos, catalase-negativos, que ocorrem como cocos isolados, aos pares ou em cadeias pequenas. Estes microrganismos são usualmente capazes de crescer em temperaturas que variam de 10 a 45°C, com temperatura ótima de crescimento em 35°C. São anaeróbios facultativos, a maior parte das espécies cresce em meios de cultura líquidos contendo 6,5% de NaCl e são capazes de hidrolisar esculina em presença de 40% de bile (TEIXEIRA et al., 2007).

O gênero *Enterococcus* compreende mais de 21 espécies, sendo que *E. faecalis* e *E. faecium* são as espécies mais frequentemente isoladas de espécimes clínicos humanos; no entanto, a proporção do isolamento destas duas espécies tem mudado dramaticamente na última década. *E. faecalis* foi a espécie mais isolada nos hospitais dos Estados Unidos (EUA) do início até meados da década de 1990, porém, em 2008, ocorreu um importante aumento na incidência de infecções hospitalares causadas por *E. faecium*. Além disso, *E. faecium* demonstram ser mais comumente resistentes a múltiplas drogas do que *E. faecalis*. Esta mudança na epidemiologia das infecções enterocócicas tem sido atribuída ao aumento da habilidade de linhagens genéticas de *E. faecium*, inseridas no denominado complexo clonal 17 (CC17), para colonizar o trato gastrointestinal de humanos, causar doenças e apresentar alto nível de resistência aos antibióticos recomendados para enterococos. Outras espécies, tais como *E. casseliflavus*, *E. durans* e *E. gallinarum* são também encontradas em espécimes clínicos, porém, em menor frequência (BIAVASCO et al., 2007; FISHER et al., 2009; HIDRON et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2007; TREITMAN et al., 2005; TSAI et al., 2005).

Enterococos têm ganhado notoriedade como uma das principais causas de infecções nosocomiais. As infecções enterocócicas ocorrem principalmente em pacientes imunodeprimidos ou debilitados, hospitalizados e incluem infecções intra-abdominais, do trato urinário, sepse hepatobiliares, bacteremia e endocardites, infecções de feridas cirúrgicas e sepse neonatal (FISHER et al., 2009; POH; OH; TAN, 2006). Enterococos são a segunda causa mais comum de infecções nosocomiais da corrente sanguínea nos Estados Unidos e a resistência à vancomicina ocorre em aproximadamente um terço dos isolados (BIAVASCO et al., 2007; TSAI et al., 2005).

1.2. Os antibióticos vancomicina e daptomicina

1.2.1. Vancomicina

Os antibióticos glicopeptídeos englobam vancomicina, teicoplanina, decaplanina e outros derivados. São constituídos por grandes estruturas moleculares cíclicas complexas, de elevados pesos moleculares, contendo em sua molécula açúcares e aminoácidos. A vancomicina tem estrutura tricíclica e a teicoplanina é tetracíclica (Figuras 1A e 1B) (TAVARES, 2001). A vancomicina é derivada de *Nocardia orientalis* (anteriormente conhecida como *Streptomyces orientalis*) (CUI et al., 2006).

Figura 1. Estruturas moleculares de glicopeptídeos A- Vancomicina, B- Teicoplanina.
Fonte: TAVARES, 2001.

A vancomicina é primariamente ativa contra bactérias gram-positivas, incluindo estreptococos, estafilococos, corinebactérias, clostrídios, listerias e *Bacillus* (CUI et al., 2006). A principal indicação da vancomicina é em infecções estafilocócicas graves, em pacientes alérgicos às penicilinas e cefalosporinas e em infecções causadas por estafilococos resistentes à meticilina e à oxacilina. Sendo assim, está indicada nas pneumonias, osteomielites, septicemias, celulites, abscessos, meningoencefalites e endocardites estafilocócicas, como alternativa às penicilinas e cefalosporinas (TAVARES, 2001). A vancomicina é o antibiótico de escolha para infecções causadas por linhagens de enterococos resistentes a penicilina, podendo ser administrada sozinha ou em combinação com aminoglicosídeos (BIENDO et al., 2010). Vale ressaltar que, alguns enterococos são geralmente tolerantes ao efeito bactericida dos antibióticos beta-lactâmicos, por isso, quando uma terapia bactericida é necessária, um aminoglicosídeo deve ser adicionado (ARIAS; CONTRERAS; MURRAY, 2010).

A vancomicina atua inibindo a síntese da parede celular de bactérias sensíveis por meio da sua ligação de alta afinidade à extremidade terminal D-alanina-D-alanina de unidades precursoras da parede celular. Com isso, inibe a utilização dos substratos pela glicosiltransferase (uma enzima de síntese da parede celular) para produzir a cadeia de peptidoglicano nascente (CUI et al., 2006).

1.2.2. Daptomicina

As infecções nosocomiais causadas por enterococos são grandes desafios para os médicos devido à ocorrência de isolados resistentes a múltiplos antibióticos, inclusive à vancomicina, limitando assim as opções de tratamento (CANTÓN et al., 2010).

Daptomicina é o primeiro de uma nova classe de antibióticos, os lipopeptídeos cíclicos; seu espectro de atividade atinge a maioria das bactérias gram-positivas: estafilococos, estreptococos, enterococos, incluindo, linhagens gram-positivas resistentes a vários antibióticos de primeira escolha (SADER et al., 2004; VAN BAMBEKE et al., 2008). Sua estrutura química está representada na Figura 2 (NOVARTIS, 2010).

Figura 2. Estrutura química da daptomicina. Fonte: NOVARTIS, 2010.

Daptomicina é um antibiótico de administração intravenosa indicado para o tratamento de infecções de pele e mucosas, bacteremias por *Staphylococcus aureus* e endocardites (associadas ou não à bacteremia) (SADER et al., 2004; VAN BAMBEKE et al., 2008). Embora o desenvolvimento da daptomicina para uso clínico tenha tido como alvo principal *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA, do inglês, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), este antibiótico tem demonstrado potente atividade bactericida em modelos de infecções enterocócicas e tem sido usado para o tratamento de infecções por enterococos em humanos (CANTÓN et al., 2010). Dessa forma, na prática clínica atual, sugere-se que a daptomicina sozinha ou combinada com outros antibióticos, pode atingir resultados favoráveis em pacientes com infecções por enterococos (frequentemente naqueles com múltiplas co-morbidades), sendo ocasionalmente utilizada em doses superiores a 6mg/kg, que é a dosagem aprovada para tratamento de bacteremia por *S. Aureus*, quando utilizada como monoterapia (NOVARTIS, 2009; CANTÓN et al., 2010). Vale ressaltar que, a Sociedade de Doenças Infecciosas da América (IDSA, do inglês, *Infectious Diseases Society of America*) recomenda o uso de daptomicina para o tratamento de bacteremia relacionada com cateter devido a enterococos resistentes à vancomicina (VRE, do inglês, *vancomycin-resistant enterococci*) ou enterococos resistentes à ampicilina em pacientes com ou sem diálise (MERMEL et al., 2009).

O mecanismo de ação da daptomicina é diferente de alguns outros antibióticos. A daptomicina liga-se à membrana bacteriana e provoca despolarização rápida da membrana. Esta perda do potencial de membrana causa inibição da síntese de proteína, DNA e RNA, resultando na morte da célula bacteriana (NOVARTIS, 2010). Um modelo de ação da daptomicina propõem que moléculas do antibiótico se inserem na membrana da célula, de maneira cálcio dependente, e se oligomerizam, formando poros que permitem extravasamento de íons da célula (MURAIH et al., 2011).

1.3. Resistência aos antibióticos

1.3.1. Resistência à vancomicina

A emergência de resistência à vancomicina como um problema terapêutico em enterococos foi primeiro documentada na parte ocidental da Europa, especificamente na França e Inglaterra (LECLERCQ et al., 1988; UTTLEY et al., 1988). Após esta descoberta inicial, ocorreu um aumento epidêmico de enterococos resistentes aos glicopeptídeos em

hospitais nos Estados Unidos (SAHM et al., 1989). Depois disso, o isolamento de VRE tem sido continuamente reportado em diversas localizações geográficas (TEIXEIRA et al., 2007).

Sendo assim, enterococos que eram conhecidos por fazerem parte da microbiota do trato gastrointestinal de humanos e animais, no entanto, nos últimos 30 anos, emergiram como importantes patógenos nosocomiais (HIDRON et al., 2008).

VREs têm sido classificados de acordo com perfil fenotípico e genotípico. O fenótipo VanA, com alta resistência induzível à vancomicina bem como à teicoplanina, é codificado pelo gene *vanA*. O fenótipo VanB confere resistência induzível de moderada à alta, à vancomicina, mas não à teicoplanina e é codificado pelo gene *vanB* (*vanB1* e *vanB2*) e o fenótipo VanC, codificado pelo gene *vanC*, confere resistência intrínseca à baixa concentração de vancomicina. VanA e VanB são considerados fenótipos mais relevantes clinicamente e são usualmente associados com isolados de *E. faecium* e *E. faecalis*, enquanto resistência VanC é uma característica intrínseca de *E. gallinarum* (genótipo *vanC1*) e *E. casseliflavus* (genótipos *vanC2* e *vanC3*). Outros tipos adicionais de resistência aos glicopeptídeos, codificados pelos genes *vanD*, *VanE* e *vanG* ocorrem com menor frequência e conferem, de moderada a baixa, resistência à vancomicina. (COURVALIN, 2005; TEIXEIRA et al., 2007; LEDEBOER et al., 2007).

O fenótipo VanA pode ser caracterizado pela presença do transposon Tn1546 intacto ou elementos VanA, denominação esta recebida quando ocorrem alterações no Tn1546. O Tn1546 intacto, apresenta 10.851pb, pertence a família Tn3 e é carregado por plasmídeo conjugativo (ARTHUR, COURVALIN, 1993). Este transposon possui 9 sequências abertas de leitura (ORFs, do inglês, *open reading frames*), genes para transposase e resolvase (ORF1 e ORF2, respectivamente) e 7 ORFs relacionadas com a resistência (*vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY* e *vanZ*) (Figura 3) (HANDWERGER, SKOBLE, 1995). Os genes *vanR* e *vanS* codificam *vanR-vanS* que são 2 componentes do sistema regulatório que ativa transcrição de *vanH*, *vanA* e *vanX* em resposta à presença de vancomicina no meio de cultura. Estes últimos genes codificam 3 proteínas necessárias para resistência aos glicopeptídeos, respectivamente, dehidrogenase (VanH) que reduz piruvato em D-lac; ligase (VanA) que sintetiza D-ala-D-lac e D,D-dipeptidase (VanX) que hidrolisa D-ala-D-ala (ARTHUR; MOLINAS; COURVALIN, 1992; ARTHUR, QUINTILIANI, 2001). A ação combinada destas 3 enzimas resulta na incorporação de D-ala-D-lac ao invés de D-ala-D-ala nos precursores peptideoglicanos (ARTHUR; REYNOLDS; COURVALIN, 1996). Além disso, o conjunto de gene *vanA* codifica D,D-carboxipeptidase (*vanY*) que contribui para resistência aos glicopeptídeos por clivar o D-ala C-terminal de precursores peptideoglicanos ligados à membrana (ARTHUR et

al., 1998). Finalmente, o conjunto de gene *vanA* contém o gene *vanZ* de função desconhecida. A proteína *vanZ* foi encontrada conferindo baixo nível de resistência a teicoplanina (ARTHUR et al., 1995).

Figura 3. Representação esquemática do protótipo Tn1546, mostrando conjunto de genes *vanA* que conferem resistência aos glicopeptídeos

Recentemente, foram descobertos mais dois tipos de resistência aos glicopeptídeos, codificados pelos genes *vanL* e *vanM*. *E. faecalis* N06-0364, exibindo concentração inibitória mínima (CIM) de 8µg/mL para vancomicina, foi identificado com um novo gene, designado *vanL*, que confere baixo nível de resistência à vancomicina (BOYD et al., 2008). Xu e colaboradores (2010) investigaram a linhagem *E. faecium* HS0661 que foi isolada em 2006 de um paciente com infecção intra-abdominal em Shanghai. Esta bactéria foi resistente à maioria dos antimicrobianos, incluindo vancomicina (CIM, >256 µg/ml) e teicoplanina (CIM, 96 µg/ml). Foi realizada reação da polimerase em cadeia (PCR) para detecção dos genes *vanA*, *vanB* e *vanD*, mostrando resultado negativo. Sendo assim, o novo gene que confere resistência aos glicopeptídeos no isolado de *E. faecium* HS0661 foi clonado e sequenciado, sendo denominado de gene *vanM*.

Dessa forma, a resistência dos enterococos aos glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) resulta de uma alteração do radical D-alanil-D-alanina em D-alanil-D-lactato ou D-alanil-D-serina, que têm baixa afinidade para estes antibióticos, mediado por diferentes genes *van* (BOYD et al., 2008; BUGG et al., 1991; COURVALIN, 2006; GILMAN et al., 2003). Portanto, sete tipos de genes conferindo resistência aos glicopeptídeos foram descritos em enterococos baseados na sequência e organização do DNA. São denominados de acordo com o nome do gene ligase, que codifica ou D-ala:D-lac (*vanA*, *vanB* e *vanD*) ou D-ala:D-

serina ligases (*vanC*, *vanE*, *vanG* e *vanL*) para síntese de precursores de peptidoglicano com baixa afinidade aos glicopeptídeos. Além disso, atualmente, um novo determinante de resistência aos glicopeptídeos, o gene *vanM*, foi caracterizado de um isolado clínico de *E. faecium* resistente aos glicopeptídeos, sendo observado que este gene codifica uma D-alá-Dlac ligase, relacionada a *vanA*, *vanB* e *vanD* e que poderia ser transferido por conjugação (XU et al., 2010).

1.3.1.1. Elementos VanA

Como citado anteriormente, quando ocorre alguma alteração no Tn1546, este passa a ser denominado elemento VanA ou Tn1546- *like element*. Estas alterações no Tn1546 podem ser resultantes de mutações, deleções e/ou sequências de inserção. Woodford e colaboradores (1998) investigaram elementos genéticos responsáveis pela resistência aos glicopeptídeos com fenótipo VanA em 106 enterococos, isolados de pacientes hospitalizados e de origens não-humanas, no Reino Unido, e os comparou com o protótipo Tn1546. Os elementos VanA foram distribuídos em 24 grupos (designados de A a X), mostrando que, elementos VanA em enterococos são heterogêneos, embora todos mostrem regiões de homologia com Tn1546. Novais e colaboradores (2008) em estudo semelhante em Portugal, também identificaram heterogeneidade nos elementos VanA estudados, sendo identificadas 24 variantes de Tn1546, todas localizadas em plasmídeos (30 a 250kb). Além disso, também demonstraram que, polimorfismos na região central *vanRSHA* de Tn1546 foram pouco detectados, enquanto alterações *upstream* de *vanR* e *downstream* de *vanA* foram mais frequentemente identificadas. Dessa forma, mostrando que, a aparente heterogeneidade de Tn1546 entre enterococos isolados de humanos, animais e do ambiente pode refletir frequentes eventos de recombinação genética e evolução de elementos genéticos amplamente disseminados. Lópes e colaboradores (2010) também determinaram moderada variabilidade na estrutura de Tn1546 (9 variantes), entre 51 enterococos contendo gene *vanA* e com perfis de PFGE não relacionados, isolados na Espanha de diferentes origens (clínica, alimento e amostras fecais de humanos e aves domésticas saudáveis).

Portanto, a caracterização molecular da estrutura de Tn1546 prover informações epidemiológicas importantes sobre a evolução de resistência à vancomicina em diferentes ecossistemas e também sobre a disseminação de determinantes de resistência por transferência horizontal (LÓPEZ et al., 2010).

1.3.2. Resistência à daptomicina

Nos últimos 15 anos têm ocorrido um aumento na resistência dos cocos gram-positivos aos antibióticos. A resistência aos antibióticos, entre os diversos gêneros bacterianos, é um crescente problema de saúde pública; desta forma, patógenos resistentes a múltiplas drogas tais como VRE estão aumentando no mundo todo. Atualmente, a limitação nas opções terapêuticas, mostra a necessidade da produção de novos agentes antimicrobianos com atividade contra estes patógenos (ELIOPOULOS, 2009).

Este aumento na resistência estimulou o desenvolvimento de novos agentes como daptomicina, linezolida e quinupristina/dalfopristina para combater infecções graves. A daptomicina foi aprovada pelo U. S. FDA (do inglês, *United States Food and Drug Administration*) em 2003. Baseado em dados da sensibilidade *in vitro*, daptomicina é altamente potente contra isolados com sensibilidades reduzidas para estes mais novos agentes (linezolida e quinupristina/dalfopristina) (D' COSTA et al., 2006).

O CLSI (do inglês, *Clinical and Laboratory Standards Institute*) e o EUCAST (do inglês, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) não têm definidos pontos de corte de resistência à daptomicina para enterococos. De acordo com o CLSI, isolados de enterococos com valores de CIMs para daptomicina $\leq 4\mu\text{g/mL}$ são considerados sensíveis a esta droga. Já os enterococos com CIMs de daptomicina $>4\mu\text{g/mL}$ são freqüentemente designados como resistentes ou “não-sensíveis”. O EUCAST também preconiza como $4\mu\text{g/mL}$, o ponto de corte de sensibilidade da daptomicina para enterococos (CANTÓN et al., 2010). Desta forma, a denominação mais adequada é “não sensibilidade” à daptomicina.

Kelesidis e colaboradores (2011) realizaram pesquisa de literatura a partir do PubMed e EMBASE, de 2003 até 2010, identificando 23 estudos que relatavam 150 enterococos não sensíveis à daptomicina. Destes 150 isolados, 140 (93,3%) eram VRE, 132 (88%) eram *E. faecium* e o país de origem foi documentado para 144 (96%) destes 150 isolados, incluindo 58 (40,3%) relatados da Ásia, 49 (34%) da Europa e 37 (25,7%) da América do Norte. Sendo assim, baseado no ponto de corte para sensibilidade aprovado pelo CLSI (2010), daptomicina tem atividade *in vitro* contra mais que 90% dos isolados enterocócicos. Menos que 2% dos enterococos foram não sensíveis à daptomicina com MICs $>4\mu\text{g/mL}$. Porém, os clínicos devem estar cientes da possibilidade de emergência de enterococos não sensíveis à daptomicina, especialmente associado ao tratamento de infecção da corrente sangüínea com daptomicina, devendo monitorar a não sensibilidade de bactérias isoladas repetidamente durante o tratamento (KELESIDIS et al., 2011).

Pouco se sabe sobre mecanismos de resistência à daptomicina em enterococos, ao contrário de *Staphylococcus aureus*, para o qual a resistência à daptomicina tem sido extensivamente estudada e é sabido que resulta de mutações cromossômicas. Dessa forma, para identificar as mudanças genéticas que constituem a base do desenvolvimento de resistência à daptomicina em enterococos, Palmer e colaboradores (2011) geraram variantes resistentes à daptomicina a partir de passagens seriadas de *E. faecalis* V583, na presença de concentrações cada vez mais aumentadas de daptomicina *in vitro*. *E. faecalis* V583 é membro de um complexo clonal enterocócico, associado com surtos de infecção hospitalar e endemicidade, sendo resistente à vancomicina, mas sensível à daptomicina (CIM= 2µg/mL). Foram obtidas três linhagens resistentes à daptomicina a partir de *E. faecalis* V583 e por comparação da sequência genômica destas 3 linhagens adaptadas em relação linhagem parental *E. faecalis* V583, foram identificados 7 genes candidatos de resistência à daptomicina e três diferentes vias mutacionais em *E. faecalis*. Mutações em um destes 7 genes candidatos, codificando uma sintase cardiolipina, foram encontradas em cada das linhagens adaptadas de *E. faecalis* V583, bem como nos isolados clínicos de *E. faecalis* e *E. faecium* resistentes à daptomicina.

Com relação aos outros agentes antibacterianos citados no texto, a linezolida foi aprovada pelo FDA em 2000 para uso no tratamento de infecções por gram-positivos incluindo infecções complicadas de pele e estruturas da pele (cSSSI, do inglês, *complicated skin and skin structure infections*) causado por MRSA e *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA, do inglês, *methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*) e pneumonia nosocomial causada por MSSA, MRSA, *Streptococcus pneumoniae* e VRE. Linezolida é uma oxazolidinona com atividade contra bactérias gram-positivas incluindo VRE (ambos *E. faecium* e *E. faecalis*), MRSA, *Staphylococcus aureus* intermediário à vancomicina (VISA, do inglês, *vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*) e *S. pneumoniae* (VINH; RUBINSTEIN, 2009). Outro antimicrobiano disponível é quinupristina/dalfopristina que foi aprovado pelo FDA para o tratamento de infecções por VRE em 1999 (ALLINGTON; RIVEY, 2001). É ativo contra a maioria dos organismos gram-positivos, com exceção de *E. faecalis*. Infelizmente, resistência a estas drogas surgiu após alguns anos de uso (GONZALES et al., 2001; DUNCAN et al., 2001). A resistência a quinupristina/dalfopristina pode ocorrer devido a mutações em sítios alvos, inativação enzimática e indução de efluxo ativo (ALLINGTON; RIVEY, 2001). A resistência à linezolida em enterococos é principalmente mediada por mutações no domínio V do rRNA 23S, que parece alterar a interação do antibiótico com seu alvo (ARIAS; CONTRERAS; MURRAY, 2010). A resistência à

linezolida tem emergido em enterococos nos Estados Unidos, Europa e Ásia, e disseminação nosocomial tem sido relatada (WANG; HSUEH, 2009).

1.4. Fatores de virulência em enterococos

Embora seja reconhecido que enterococos causam infecções graves, tais como endocardite e septicemia, são geralmente considerados microrganismos de baixa virulência e os fatores de virulência de *E. faecium* não são muito conhecidos. Porém, alguns fatores têm sido sugeridos como contribuintes para a virulência nesta espécie: substância de agregação (gene *agg*), citolisina (gene *cyl*), proteína ligadora de colágeno (gene *acm*), antígeno de endocardite de *E. faecalis* (gene *efas*), proteína de superfície enterocócica (gene *esp_{fm}*), gelatinase (gene *gel*) e hialuronidase (gene *hyl*) (MANNU et al., 2003; TOP; WILLEMS; BONTEN, 2008).

Gelatinase, substância de agregação e citolisina são fatores de virulência encontrados em *E. faecalis*, embora também têm sido pesquisados entre isolados de *E. faecium* (EATON; GASSON, 2001; ROUTSI et al., 2003; VANKERCKHOVEN et al., 2004).

Um dos principais determinantes de virulência é a proteína de superfície enterocócica (Esp) codificada pelo gene *esp* que é encontrada tanto em *E. faecium* como *E. faecalis*, mostrando que está envolvido na adesão e formação de biofilme em superfícies abióticas, como também no aumento da conjugação (LEAVIS et al., 2004; ROUTSI et al., 2003; SHANKAR; BAGHDAYAN; GILMORE, 2002).

A gelatinase, metaloprotease que hidrolisa gelatina e colágeno, tem sido identificada em linhagens de *E. faecium* e tem papel importante no desenvolvimento de biofilme (HANCOCK; PEREGO, 2004; RICE et al., 2003; VANKERCKHOVEN et al., 2004).

O gene hialuronidase (*hyl*) inicialmente descrito como codificando hialuronidase, tem recentemente mostrado codificar glicosil hidrolase (FREITAS et al., 2010).

A substância de agregação é proteína de superfície ferormônio-induzível que medeia formação de agregados durante a conjugação, bem como auxilia na transferência de plasmídeos e na adesão a um conjunto de superfícies eucarióticas (KOCH et al., 2004).

Os genes da citolisina podem ser carregados em plasmídeos ou estão integrados no cromossomo bacteriano (JETT et al., 1994). Citolisina e substância de agregação parecem atuar sinergicamente para aumentar a gravidade da endocardite (CHOW et al., 1993).

1.5. A importância de se estudar enterococos

1.5.1. Situação destas bactérias no mundo

O isolamento de VRE foi primeiro descrito em 1988 no Reino Unido e França marcando mudança na perspectiva das infecções enterocócicas (LECLERCQ et al., 1988; UTTLEY et al., 1988). Dessa forma, enterococos não eram mais considerados como meros colonizadores do trato gastrointestinal, mas estavam emergindo como importantes patógenos nosocomiais. Após esta descoberta inicial, ocorreu um aumento epidêmico de enterococos resistentes aos glicopeptídeos em hospitais nos Estados Unidos (SAHM et al., 1989).

Estudo do CDC (do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*) indicou que, de janeiro de 2006 a outubro de 2007, um total de 28.502 HAIs (do inglês, “*healthcare-associated infections*”) foram relatadas, sendo 68% de hospitais do nordeste e sul dos Estados Unidos. Dos *E. faecium* e *E. faecalis* analisados neste período, 80% e 6,9%, respectivamente, eram resistentes à vancomicina (HIDRON et al., 2008). Na Europa, a prevalência de enterococos resistentes à vancomicina é bem diversificada, variando de <1% a >40%, com importantes diferenças regionais. As maiores taxas de VREs associadas com infecções nosocomiais na Europa foram relatadas em alguns países do sul da Europa com níveis de até 45% detectados nos últimos anos, na Grécia e Portugal (WERNER et al., 2008).

O isolamento de VRE em países asiáticos ocorreu mais tardiamente, como também no Brasil. Existem diversos relatos descrevendo o isolamento de VRE em regiões do leste asiático e em países, incluindo, Japão, Coreia e Taiwan. Desde o primeiro relato japonês de isolamento de VRE com fenótipo VanA (*E. faecium*) de espécime clínico em 1996, tem aumentado a frequência de isolamento de VRE de pacientes (FUJITA et al., 1998; OZAWA et al., 2002).

No Brasil, VRE (*E. faecium*) com fenótipo VanD foi inicialmente descrito em 1996 em Curitiba (DALLA COSTA, L. M. et al., 2000) em uma criança com aplasia medular; conseqüentemente, culturas de vigilância começaram a ser adotadas por vários hospitais, seguindo a orientação do CDC. Dessa forma, desde 1997, a ocorrência de VRE tem sido documentada em hospitais de outras cidades brasileiras (D’AZEVEDO et al., 2000; CORDEIRO et al., 2004; FURTADO et al., 2005; CAMARGO et al., 2006; PALAZZO et al., 2011).

1.5.2. Isolamento de VRE no Brasil

O primeiro caso documentado de infecção por *E. faecium* tipo VanA ocorreu no Brasil durante 1997 de um caso de meningite em São Paulo (ZANELLA et al, 1999). Um ano mais tarde, diversas linhagens de *E. faecium* e *E. faecalis* resistentes à vancomicina foram isolados do mesmo hospital em São Paulo, fornecendo evidência de um surto causado por enterococos VanA (ZANELLA et al, 2003). Após estes primeiros isolamentos, VREs foram detectados em hospitais de várias cidades/Estados, incluindo São Paulo, Marília, Campinas, Rio de Janeiro, Uberlândia, Porto Alegre, entre outras (D'AZEVEDO et al., 2000; CAMARGO; GILMORE; DARINI, 2006; ALMEIDA et. al, 2004; D'AZEVEDO et al., 2008; PALAZZO et al., 2011). Nos dias atuais VREs estão presentes em todo país, visto inúmeros relatos em eventos científicos nacionais.

1.5.3. Isolamentos de VREs em hospitais de Ribeirão Preto

Segundo informações da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), os primeiros isolamentos de enterococos resistentes à vancomicina ocorreram por volta de 2005 no referido hospital.

Em 2008 foi detectado um surto de infecção enterocócica em pacientes onco-hematológicos, havendo casos de infecção da corrente sanguínea e óbito. Dessa forma, desencadeou-se uma busca de portadores de VRE em pacientes procedentes da Unidade de Hematologia. Portanto, pacientes com colonização intestinal por enterococos na referida Unidade foram identificados, sugerindo disseminação clonal de linhagem resistente à vancomicina. Medidas de contenção do surto foram tomadas e todos os casos foram comunicados à CCIH e os pacientes foram isolados.

Em 2009, a cultura de vigilância para detecção de VREs em suabes retais de pacientes da Unidade de Hematologia foi intensificada com o intuito de se fazer um controle dos pacientes portadores bem como determinar novos portadores. Foram observados que novos casos de infecção por VRE estavam ocorrendo, isolando-se VRE de urina, sangue, cavidade peritonial e ferida cirúrgica de pacientes de outras clínicas. Dessa forma, a coleta de suabes retais foi estendida a outras unidades, como Centro de Terapia Intensiva Infantil, Berçário Infantil, Unidade de Transplante Renal, Ortopedia e Imunologia. Com este levantamento, tem-se observado a disseminação de VRE colonizando o trato digestivo de pacientes hospitalizados no HCFMRP-USP.

Em paralelo, o fato de também ter ocorrido o isolamento de VREs na Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto (SCMRP), permitiu fazer comparação interhospitalar de VREs isolados nos 2 hospitais de Ribeirão Preto.

1.6. Métodos moleculares de tipagem epidemiológica

Diversos métodos de tipagem molecular têm sido utilizados para estudar a epidemiologia de VRE. A análise do cromossomo bacteriano é indicada para se definir o número de linhagens ou clones e/ou a similaridade entre as linhagens estudadas.

1.6.1. Eletroforese em campo pulsado

A eletroforese em campo pulsado (PFGE, do inglês, *pulsed-field gel electrophoresis*) é amplamente utilizada como método de tipagem epidemiológica, permitindo a análise de todo o genoma e possibilitando alta diferenciação das linhagens, sendo por isso considerada o “padrão ouro” para análise de surtos hospitalares. No entanto, a PFGE é indicada para estudos epidemiológicos envolvendo linhagens isoladas em um curto período de tempo e devido a esta alta possibilidade de diferenciação das linhagens, esta técnica é menos adequada para determinar a similaridade genômica entre isolados não relacionados epidemiologicamente (HOMAN et al., 2002).

1.6.2. Tipagem por seqüenciamento de *multilocus*

Atualmente, um dos métodos que vem sendo utilizado por diversos pesquisadores para a tipagem de microrganismos é o seqüenciamento de *multilocus* (MLST, do inglês, *multilocus sequence typing*). A técnica foi desenvolvida para estudos epidemiológicos globais e estudos de vigilância, tendo a vantagem de permitir a análise populacional de bactérias isoladas em diferentes períodos de tempos, pois se baseia na análise da seqüência de genes altamente conservados (genes *housekeeping*) (JOLLEY et. al., 2001). Portanto, MLST é um método de genotipagem baseado na amplificação, por PCR, e sequenciamento de diferentes *loci* do DNA cromossômico (crDNA), em que são analisados fragmentos internos de 7 genes *housekeeping*. Cada locus analisado apresenta uma determinada seqüência que recebe um número específico (número do alelo) com a finalidade de identificação. O conjunto de números dos 7 alelos representa um perfil alélico sendo definido como *sequence type* (ST) de cada bactéria analisada (HOMAN et. al., 2002).

Um banco de dados internacional de linhagens de *E. faecium* analisadas por MLST está disponível no website <http://efaecium.mlst.net/>. Esta técnica permite trocas de dados informatizados via internet, por isto tem sido utilizada com muito sucesso para o estudo de epidemiologia molecular e exploração de estrutura populacional e evolução de virulência de várias espécies bacterianas, permitindo fácil comparação de isolados locais com todas as linhagens de diversas partes do mundo contidas no banco de dados (HOMAN et. al., 2002; FEIL et. al., 2004).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar a genética de resistência à vancomicina e epidemiologia molecular de enterococos isolados de pacientes internados em dois hospitais de Ribeirão Preto.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar, por amplificação de marcadores genéticos, as espécies de VREs isolados de pacientes do HCFMRP-USP e da SCMRP;
- Pesquisar a presença de genes *vanA*, *vanB* e *vanC* nos VREs isolados;
- Confirmar a resistência à vancomicina dos VREs pelo método de difusão em ágar (Etest);
- Determinar o perfil de sensibilidade à daptomicina, pelo Etest;
- Analisar a integridade do transposon envolvido na resistência à vancomicina;
- Pesquisar genes de virulência nos isolados de VREs em estudo;
- Determinar a similaridade genômica dos VREs pelo perfil de macrorestrição do crDNA obtido após PFGE;
- Relacionar epidemiologicamente os VREs pelo seqüenciamento de *multilocus* (MLST), comparando os isolados do HCFMRP-USP e da SCMRP.

3. Material e Métodos

3.1. Amostras bacterianas

Foram estudados 53 VREs isolados de dois hospitais de Ribeirão Preto¹. Dentre estes, 43 VREs foram isolados de pacientes internados no HCFMRP-USP, no período de setembro de 2008 a setembro de 2010, dos quais 29 foram isolados de cultura de vigilância (suabes retais); 13 de infecções, de espécimes clínicos variados (n=6 urina; n=3 sangue; n=1 ouvido; n= 2 feridas cirúrgicas e n=1 cavidade peritonal) e um VRE de origem desconhecida. Além destes 43 VREs isolados no HCFMRP-USP, também foram estudados os primeiros 5 VREs (HC02MI-61, HC10F-62, HC46F-63, HC930U-64, HCVRE-65) isolados no mesmo hospital, em meados de 2005/2006. Estes 5 primeiros VREs isolados no HCFMRP-USP estavam armazenados a -80°C no Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (LEBEM-FCFRP-USP) para futuros estudos moleculares. Dentre os 53 VREs isolados em hospitais de Ribeirão Preto, 5 foram isolados na SCMRP, 4 de infecções (n=2 urina; n=1 bile e n=1 secreção abdominal) e um VRE de origem desconhecida, no período de julho de 2009 a meados de 2010. Portanto, do total de 53 VREs isolados dos dois hospitais de Ribeirão Preto, 48 VREs foram isolados no HCFMRP-USP e 5 VREs na SCMRP. Dos pacientes do HCFMRP-USP colonizados por VRE, a maior parte foi procedente das unidades de Hematologia (n=14) e da Imunologia (n=5). Os dados (amostra clínica, data de coleta do material, procedência e nome do microorganismo isolado) fornecidos pelo aparelho de automação Vitek2 (Biomerieux) das bactérias isoladas do HCFMRP-USP constam no Apêndice A.

Os suabes retais colhidos por pedidos médicos de cultura de vigilância no HCFMRP-USP foram enviados ao Laboratório de Microbiologia da mesma instituição com o intuito de verificar se os pacientes estavam colonizados por VRE. Já os enterococos isolados dos demais espécimes clínicos foram isolados de culturas solicitadas pela rotina médica. Com relação aos enterococos isolados da SCMRP, estes foram identificados no laboratório de microbiologia do referido hospital e enviados ao LEBEM-FCFRP-USP para estudo molecular.

No Laboratório de Microbiologia do HCFMRP-USP, os suabes foram semeados em meio de cultura contendo bile esculina acrescido de 6µg/ml de vancomicina (CLSI, 2009), meio de cultura seletivo para VRE. Dessa forma, a partir do crescimento neste meio de cultura, foi realizado um subcultivo para uma placa contendo meio de cultura Müeller-Hinton (Oxoid) acrescido de 5% de sangue de carneiro (Ágar sangue), permanecendo em estufa a

¹ Projeto de Pesquisa aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP – Processo CEP 253

35°C por 24 horas. A partir do crescimento bacteriano em placa de ágar sangue foram realizados a identificação e teste de sensibilidade pelo sistema Vitek 2® (Biomérieux) para identificar a espécie dos enterococos e confirmar se a bactéria era realmente resistente à vancomicina. Estas amostras foram armazenadas em BHI com 15% de glicerol e congeladas a -80°C para estudos posteriores no LEBEM-FCFRP-USP.

3.2. Extração de DNA genômico bacteriano

O DNA genômico das bactérias foi extraído pelo método previamente descrito por Bolano et al (2001). Este protocolo é baseado na lise mecânica da parede celular bacteriana para obtenção do DNA.

Para a extração do DNA genômico foram utilizadas colônias bacterianas retiradas de placas de ágar sangue após incubação em estufa a 37°C por 24 horas. Dessa forma, o cultivo bacteriano foi feito em 5 mL de caldo BHI a 37°C, por 18-20 horas.

Após incubação, o caldo BHI com bactérias foi centrifugado por 5 minutos a 2.655g a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento bacteriano foi lavado com 5mL de solução fisiológica (0,85g NaCl em 100mL de água destilada). Dando continuidade à extração, os tubos foram centrifugados sob as mesmas condições citadas acima e o sobrenadante foi desprezado.

Em seguida, foi adicionada, ao sedimento bacteriano, a mesma quantidade de pérolas de vidro (proporção 1:1), previamente tratadas com ácido nítrico. Este ácido tem a função de remover metais pesados que atuam como co-fatores para nucleases (DNAses e RNAses). O tratamento das pérolas de vidro foi realizado da seguinte forma: as pérolas de vidro foram colocadas em solução de ácido nítrico 50% por 2 horas, mantendo sob agitação constante; em seguida foram enxaguadas em água destilada por, no mínimo, 10 vezes, deixando 30 minutos e, entre cada troca, foram agitadas por 10 minutos. Então, as pérolas de vidro foram cobertas com solução de dietilpirocarbonato (DEPC 0,1% em água destilada) e deixadas 24 horas a 37°C em frasco tampado com papel alumínio, depois foram autoclavadas e, por fim, a solução de DEPC foi desprezada e as pérolas foram secas a 180°C por 2 horas, ficando devidamente prontas para serem utilizadas na extração.

Posteriormente, foi adicionada solução tamponante de extração (Tris HCl pH 8,5-0,5M; NaCl; EDTA pH 8-0,5M; SDS e água deionizada) na proporção 2:1, sendo assim, para 300µL do sedimento bacteriano foram adicionados 600µL da solução tamponante e logo após, foram agitados vigorosamente por 10 minutos.

Foram transferidos 500 μ L da mistura (sedimento bacteriano + solução tamponante) para tubo tipo “eppendorf” de 1,5mL. A seguir, foram adicionados ao tubo, 500 μ L de fenol-clorofórmio (1:1), homogeneizando cuidadosamente por 15 segundos. Posteriormente, o tubo foi centrifugado por 20 minutos a 15.294g a 4°C.

O sobrenadante ($\pm$ 400 μ L) foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado isopropanol absoluto (armazenado a -20°C) na proporção 1:1 e o tubo foi mantido a -20°C por 18-20 horas.

Após incubação, o tubo foi centrifugado a 15.294g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado 1 mL de etanol 70% (armazenado a -20°C), procedimento seguido por homogeneização por inversão. Em seguida, o tubo foi submetido a uma nova centrifugação sob as mesmas condições descritas anteriormente. Finalmente, após o sobrenadante ter sido desprezado, todo o líquido remanescente foi desprezado em papel absorvente e o tubo contendo o DNA foi seco em “Speed-Vac” – Concentrator 5301 (Eppendorf AG – 22331- Hamburg - Germany) a 60°C.

Após a secagem, o sedimento bacteriano foi suspenso em água ultra-pura (Sigma) e foi mantido por 18-20 horas a 4°C. Foi adicionado cerca de 1 μ L de solução de RNase (10 μ g/mL) seguido de incubação por 1 hora a 37°C. A quantificação e avaliação da pureza do DNA foi realizada em espectrofotômetro de luz ultravioleta com comprimentos de onda (λ) de 260nm e 280nm utilizando o aparelho Gene Quant (Amersham Pharmacia Biotech), sendo a concentração do DNA fornecida em μ g/mL. O DNA foi diluído em água ultra-pura (Sigma) à concentração de 30ng/ μ L e armazenado a -20°C. Apenas DNAs de boa qualidade, com razão DNA/RNA em torno de 1,8 a 2, foram utilizados no estudo.

3.3. Identificação da espécie e determinação dos genótipos de resistência

Foi utilizada PCR com o objetivo de se confirmar a espécie e investigar a presença dos genes *vanA*, *vanB* ou *vanC* em todos os isolados de VREs do estudo.

A PCR foi feita em volume final de 25 μ L: foi utilizada água ultra-pura (sigma) “Qualidade PCR” q.s.p, solução tamponante de reação 10x diluída para uma concentração final 1x (Tris 20mM e KCl 50mM), 2mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 0,625U de *Taq DNA polimerase*, 0,2mM de cada um dos 4 nucleotídeos (dNTP), 21pmol dos *primers* (Tabela 1) para amplificação dos genes *vanA* e *vanB* e 25pmol dos *primers* para amplificação dos genes *ddl* e *vanC1* e, finalmente, 2 μ L de DNA (na concentração de 30ng/ μ L). Foi utilizado o termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf).

Tabela 1- *Primers* utilizados nas PCRs para identificação das espécies de enterococos e pesquisa genes *vanA*, *vanB* e *vanC*

Gene Amplificado	Par de primer	Seqüência de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho do produto da PCR (pb)	Referência Bibliográfica
<i>vanA</i>	A1	+ATGGCAAGTCAGGTGAAGATGG	399	WOODFORD et al, 1993
	A2	-TCCACCTCGCCAACAACCTAACG		
<i>vanB</i>	<i>vanB1</i>	+TCTGTTTGAATTGTCTGGTAT	589	WOODFORD et al, 1993
	<i>vanB2</i>	-GACCTCGTTTAGAACGATG		
<i>ddl E.faecium</i>	EFE-1	+GCAAGGCTTCTTCTTAGAGA	550	DUTKA-MALEN et al, 1995
	EFE-2	-CATCGTGTAAGCTAACTTC		
<i>ddl E.faecalis</i>	EFS-A	+ATCAAGTACAGTTAGTCTT	941	DUTKA-MALEN et al, 1995
	EFS-B	-ACGATTCAAAGCTAACTG		
<i>vanC1 (E.gallinarum)</i>	<i>vanC1A</i>	+GGTATCAAGGAAACCTC	822	DUTKA-MALEN et al, 1995
	<i>vanC1B</i>	-CTCCGCCATCATAGCT		
<i>E. casseliflavus/</i>	<i>vanC-2/3A</i>	+CTCCTACGATTCTCTTG	439	DUTKA-MALEN et al, 1995
<i>E. flavescens</i>	<i>vanC-2/3B</i>	-CGAGCAAGACCTTTAAG		

Observações: +sense, -antisense

As linhagens-controle utilizadas foram *E. faecium* NCTC 717, *E. faecalis* NCTC 775, *E. gallinarum* NCTC 12359 e *E. casseliflavus* NCTC 1261.

Foi utilizado o protocolo de amplificação descrito por Dutka-Malen, Evers e Courvalin (1995) para a determinação das espécies dos enterococos, como também pesquisa do gene *vanC*: 1 ciclo de 94°C por 2 minutos e 30 ciclos de 94°C por 60 segundos, 54 °C por 60 segundos e 72 °C por 60 segundos e , por fim, foi submetido a uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Foi utilizado o protocolo descrito por Woodford et al. (1993) para a determinação da presença dos genes *vanA* e *vanB*: 1 ciclo de 94 °C por 5 minutos para assim ocorrer desnaturação primária e 30ciclos de 94°C por 25 segundos, 52 °C por 40 segundos e 72°C por 50 segundos e , por fim, foi submetido a extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Após a amplificação dos fragmentos que determinam as espécies e os genes *vanA*, *vanB* ou *vanC*, a estes produtos de PCR, foram adicionados 10µL de solução de azul de bromofenol e os mesmos foram aplicados em gel de agarose a 1%. O marcador de peso molecular de 100pb (Fermentas) foi aplicado no gel e a corrida eletroforética foi realizada a 90V e 160mA em solução tamponante TBE 0,5X. O gel foi imerso em solução de brometo de etídio (1µg/mL) por 15 minutos para que os produtos amplificados fossem corados e logo após, foi observado sob luz ultravioleta com o auxílio do fotodocumentador AlphaImager (Alpha Innotech).

3.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima

As concentrações inibitórias mínimas de vancomicina e daptomicina foram determinadas pelo Etest[®]. A sensibilidade da vancomicina foi baseada nos valores de CIM preconizados pelo CLSI (2009), o qual estabelece que a resistência à vancomicina ocorre quando há inibição do crescimento bacteriano somente em concentrações maiores ou iguais a 32 µg/mL e sensibilidade quando a inibição ocorre em concentrações menores ou iguais a 4 µg/mL. Já a sensibilidade à daptomicina foi baseada nos valores de CIM preconizados por revisões da literatura (AB BIODISK) e pelo CLSI (2009), estabelecendo que a sensibilidade para daptomicina ocorre quando a inibição do crescimento se mantém em concentrações menores ou iguais a 4 µg/mL.

Para a determinação da CIM da vancomicina e daptomicina pelo Etest[®] foram utilizadas as amostras armazenadas a -80°C em BHI com glicerol, as quais foram cultivadas em ágar sangue e incubadas por 24 horas a 35°C em estufa e a partir desta cultura foram preparados os inóculos. O meio de cultura utilizado foi o Mueller-Hinton. As suspensões bacterianas foram preparadas em solução fisiológica e a turbidez destas suspensões foi equivalente a 0,5 da escala de Mac Farland, determinada pelo equipamento Densimat[®] (BioMérieux).

A fita de Etest[®] foi colocada, com auxílio de uma pinça, sobre a superfície do meio de cultura após a secagem do inóculo bacteriano e incubada a 35°C por 24-48 horas para a determinação das CIMs. Foi realizada a leitura das CIMs após 24 horas de incubação e a mesma foi confirmada após 48 horas.

Neste experimento foi utilizada linhagem-controle de *E. faecalis* ATCC 29212.

3.5. Pesquisa de genes de virulência

O DNA dos enterococos foi extraído conforme descrito anteriormente e utilizado nas PCRs para a pesquisa de genes de virulência descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Descrição dos *primers* utilizados para amplificação de genes de virulência

Gene alvo	Primer	Sequência do primer (5' - 3')	Fragmento Amplificado (pb)	Temperatura hibridação	Referência Bibliográfica
Adesina	<i>Acmf</i>	5'-GGCCAGAAACGTAACCGATA-3'	353	58°C	CAMARGO, 2005
	<i>Acmr</i>	5'-CGCTGGGGAATCTTGTAATA-3'			
Substância de agregação	<i>Aggf</i>	5'-AGTGACGATTGATTTATCCAAAGTG-3'	446	55.3°C	CAMARGO, 2005
	<i>Aggr</i>	5'-CGTTCGGAAGATTTCACTTCATAAT-3'			
Citolisina	<i>CylLLf</i>	5'-AACTAAGTGTTGAGGAAATG-3'	159	48.5°C	CAMARGO, 2005
	<i>CylLLr</i>	5'-AAAGACACAACACTACAGTTAC-3'			
Citolisina	<i>CylLsf</i>	5'-AGAACTTGTTGGTCCTTC-3'	134	50°C	CAMARGO, 2005
	<i>CylLsr</i>	5'-GCTGAAAATAATGCACCTAC-3'			
Citolisina	<i>CylAf</i>	5'-ACAGGTTATGCATCAGATCT-3'	507	52°C	CAMARGO, 2005
	<i>CylAr</i>	5'-AATTCACCTCTTGGAGCAATC-3'			
Proteína de superfície de <i>Enterococcus</i>	<i>Espf</i>	5'-AGATTCATCTTTGATTCTTGG-3'	500	56°C	SHANKAR, 2005
	<i>Espr</i>	5'-AATTGATTCTTTAGCATCTGG-3'			
Gelatinase	<i>Gelf</i>	5'-AATTGCTTTACACGGAACGG-3'	548	60°C	CAMARGO, 2005
	<i>Gelr</i>	5'-GAGCCATGGTTTCTGGTTGT-3'			
Hialuronidase	<i>Hylf</i>	5'-CGATGCGCAAGAATTAGACA-3'	308	54.4°C	CAMARGO, 2005
	<i>Hylr</i>	5'-CATGATTGGACAACCGAGTG-3'			

A PCR foi realizada em volume final de 25µL para detecção dos genes de virulência: foi utilizada água ultra-pura “Qualidade PCR” q.s.p, solução tamponante de reação 10x diluída para uma concentração final 1x (Tris 20mM e KCl 50mM), 2mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 0,625U de *Taq DNA polimerase*, 0,2mM de cada um dos 4 nucleotídeos (dNTP), 21pmol dos *primers* (Tabela 2) para amplificação dos genes de virulência e 2µL de DNA, na concentração de 30ng/µL.

As condições para a PCR foram: 94°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, temperatura de hibridação para cada par de *primer* (Tabela 2) por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos (CAMARGO, 2005). O termociclador utilizado para os experimentos foi o *Mastercycler Gradiente* (Eppendorf). Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1%. Após o término da eletroforese, o gel foi imerso em solução de brometo de etídio (1µg/mL) por 15 minutos para que os produtos amplificados fossem corados e logo após, foi observado sob luz ultravioleta com o auxílio do fotodocumentador AlphaImager (Alpha Innotech). As linhagens-controle para as reações foram: *E. faecalis* MMH594 (*asc10*⁺, *cylLILsABM*⁺, *esp*⁺, *IPA*⁺) (HUYCKE; SPIEGEL; GILMORE, 1991), *E. faecalis* JH2ss (*pAD1*) (*asa1*⁺), *E. faecalis* OG1RF (*gelE*⁺)

(DUNNY; FUNK; ADSIT, 1981), *E. faecium* TX0016 (hylefm+, acm+) (RICE et al., 2003) e *E. faecalis* JH2-2 (controle negativo de todos os genes de virulência).

3.6. Caracterização dos elementos VanA

Foram realizadas duas reações para amplificação do transposon Tn1546, denominadas de *Long-PCR* 1 e *Long-PCR* 2/3.

A *Long-PCR* 1 foi utilizada para amplificação dos elementos VanA (Figura 3) utilizando-se *primers* complementares às extremidades invertidas e repetidas do transposon. A *Long-PCR* 2/3 foi utilizada para amplificação dos genes *vanRSHAX*, um fragmento de 4,4kb que corresponde aos nucleotídeos 4101-8549 do Tn1546 (Figura3) utilizando-se os *primers* específicos (WOODFORD et. al., 1998). As reações de *Long-PCR* têm a finalidade de amplificar longas seqüências (>5.000 pb), e para tal foram utilizados kits comerciais - “*Long PCR Enzyme Mix*” (Fermentas), segundo recomendações do fabricante com algumas modificações, em volume final de 25µL: para *Long-PCR* 1 foi utilizada água ultra-pura “Qualidade PCR” q.s.p, solução tamponante de reação 10x diluída para uma concentração final 1x, 2mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 2,5U de *Taq DNA polimerase*, 2,5mM de dNTP, 600pmol do *primer* P1 (5'-GGAAAATGCGGATTTACAACGCTAAG-3') e 4,2µL de DNA, na concentração de 30ng/µL. Os mesmos reagentes foram utilizados para realização da *Long-PCR* 2/3, mudando apenas as concentrações de alguns deles, como: a solução tamponante de reação 10x diluída para uma concentração final 1x foi utilizada já acrescida de cloreto de magnésio (MgCl₂), foi utilizada 1,25U de *Taq DNA polimerase*, 0,2mM de cada um dos 4 nucleotídeos (dNTP), 300pmol de cada *primer* P2 (5'-AGACAA GTCTGAGATTGACCTTGCC-3') e P3 (5' ATATGCTTGAAACCCACTGTTT TCC-3') para amplificação dos genes *vanRSHAX* e 2µL de DNA, também na concentração de 30ng/µL.

As condições para a *Long-PCR* 1 foram: 94°C por 2 minutos, seguido por 10 ciclos de 94°C por 10 segundos, 65°C por 30 segundos, 68°C por 10 minutos, seguido por 19 ciclos de 94°C por 10 segundos, 65°C por 30 segundos, 68°C por 10 minutos (aumentando em 20 segundos o tempo de elongação a cada ciclo) e, por fim, uma extensão final a 72°C por 6 minutos. Para a *Long-PCR* 2/3 as seguintes temperaturas foram reduzidas: hibridação dos *primers*, durante os 10 primeiros ciclos (58,5°C por 10 segundos) e nos próximos 19 ciclos (58,5°C por 30 segundos) e, por fim, uma extensão final a 68°C por 7 minutos.

O termociclador utilizado para os experimentos foi o *Mastercycler Gradient* (Eppendorf). Os produtos de *Long-PCR* 1 e 2/3 foram analisados em gel de agarose a 1%.

Após o término das eletroforeses, os géis foram imersos em solução de brometo de etídio (1µg/mL) por 15 minutos para que os produtos amplificados fossem corados e logo após, foram observados sob luz ultravioleta com o auxílio do fotodocumentador AlphaImager (Alpha Innotech).

3.6.1. Clivagem do grupamento gênico *vanRSHAX*

Foi realizada a clivagem do grupamento gênico *vanRSHAX* dos enterococos que apresentaram produto de *Long-PCR*2/3 diferente do protótipo Tn1546, ou seja, que apresentaram fragmento maior que os 4,4kb esperados. A clivagem foi realizada de acordo com Palepou et al. (1998) com algumas modificações, utilizando a enzima de restrição *DdeI*, nas seguintes condições: 5µL de DNA (produto de *Long-PCR* 2/3); 0,5µL endonuclease *DdeI*; 1µL de tampão específico para *DdeI* e 3,5µL de H₂O ultra-pura. A reação foi incubada a 37⁰C por 18-20 horas e foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando todo o produto da clivagem enzimática do grupamento gênico *vanRSHAX*.

3.6.2. *Overlapping PCR* dos elementos VanA

A caracterização dos elementos *vanA* foi realizada pela reação de *Long-PCR*, que verifica se o transposon Tn1546 apresenta 10.851 pb. Quando o Tn1546 não apresenta-se intacto, todos os elementos VanA das amostras estudadas podem ser investigados com o auxílio de 19 *primers* sobrepostos (Figura 4) na reação de amplificação denominada “*overlapping PCR*”, segundo Woodford et. al. (1998), com o intuito de localizar eventuais inserções e/ou deleções.

No presente trabalho, foi realizado *overlapping PCR* de todos os enterococos que, pela reação de *Long-PCR*1, o transposon Tn1546 não apresentava 10.851 pb. Para isto, foram utilizados alguns dos 19 pares de *primers* demonstrados na Figura 4, foram eles: P1-P2 e P3-P4, que amplificam a extremidade esquerda do transposon Tn1546; P19-P1, que amplifica extremidade direita do transposon e P11-P12. A Tabela 3 mostra os pares de *primers* que foram utilizados, a localização exata deles no protótipo Tn1546 e tamanho dos fragmentos amplificados. O par de *primer* (P11-P12) foi utilizado para amplificar a região do transposon correspondente aos genes *vanS-vanH* (Figura 4) de todos VREs que apresentaram um fragmento maior que os 4,4kb esperados para grupamento gênico *vanRSHAX*, a partir da reação de *Long-PCR*2/3.

Tabela 3 - Conjunto de *primers* utilizados e localização no Tn1546

Pares de <i>primers</i>	Localização no Tn1546 (n° do nucleotídeo inicial e final)	Tamanho dos fragmentos amplificados (pb)
P1-P2	22-1330	1309
P3-P4	1222-2353	1132
P11-P12	4675-6353	1679
P19-P1	10403-10830	428

Figura 4. Representação esquemática das posições dos pares de *primers* que auxiliam na reação de amplificação denominada “*overlapping PCR*”. Os pares de *primers* utilizados neste estudo estão indicados por retângulos vermelhos.

A reação de “*overlapping PCR*” foi realizada em volume final de 50µL e foram utilizados os reagentes nas concentrações indicadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Reagentes e volumes utilizados na reação de “*overlapping PCR*”

Reagentes	Volume (µL) - 1 reação
Sol. tamponante (KCl)10x	5
MgCl ₂ 25mM	4
dNTP 10mM	1
Primer F (10mM)	2,5
Primer R (10mM)	2,5
Taq polimerase	0,3
Água ultra-pura	33,5
DNA	1,2

As condições para reação de “*overlapping PCR*” foram: 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

3.6.3. Identificação e localização exata do elemento de inserção

A pesquisa do elemento de inserção *IS1251* foi realizada através de PCR, como descrito no item 3.3. Foram utilizados *primers forward* e *reverse* descritos na literatura, acesso nº *GenBank* L34675 (CAMARGO, 2002), sendo constituídos das seguintes sequências de bases, respectivamente: 5'-TAT TGT GCG TTG GGG TAC AA-3' e 5'-AGC TTT GCA TTT GAA GCG TT-3', os quais amplificaram fragmento de 100pb. Os ciclos utilizados foram os mesmos descritos no item 3.3., para amplificação do gene *vanA*.

Para confirmação do elemento de inserção *IS1251* e localização exata no *Tn1546* foi realizado sequenciamento do produto de PCR de alguns isolados que amplificaram, por PCR, fragmentos de *IS1251*. Inicialmente foi realizada PCR em volume final de 50µL, utilizando *primers* RJAF_f e P12_r, para amplificação da região do transposon onde *IS1251* estava inserida: foi preparada reação contendo 1,25U de *Sigma Taq DNA Polimerase High fidelity*, 25 pmol de cada *primer* e água ultrapura (Sigma) para completar o volume final de 50 µL. Foram utilizados 2 µL do DNA (concentração de 30ng/µL) como molde para amplificação. As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 48°C e 2 minutos a 72 °C, seguido por uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Ao se obter este produto de PCR, o mesmo, após purificação, foi utilizado como molde para realização de sequenciamento que, para tal, foram utilizados os *primers* descritos na Tabela 5, dos quais alguns amplificam regiões no transposon *Tn1546* e outros amplificam regiões dentro da *IS1251*.

Tabela 5- Conjunto de *primers* utilizados para sequenciamento da região de inserção de *IS1251*

<i>Primers</i>	Seqüência do <i>primer</i> (5, - 3,)	Localização
RJAF _f	5' -ATCGAATTCAAGAACTG -3'	<i>Tn1546</i>
RJ1F _f	5' -TACGACGTTTAGGGTAGA -3'	<i>Tn1546</i>
RJBF _r	5' -AAAGGATTCAACGGACG -3'	<i>IS1251</i>
RJ1-AF _r	5' -TAACTGATAGCCTACACG -3'	<i>IS1251</i>
P12 _r	5' -CATAGTATAATCGGCAA -3'	<i>Tn1546</i>

3.7. Eletroforese em campos pulsados

Foram analisados, por PFGE, os perfis de macrorrestrição do DNA genômico dos 53 *E. faecium* isolados do HCFMRP (n=48) e da SCMRP (n=5), após digestão com a enzima *SmaI*, seguindo protocolo descrito por Kaulfmann (1998) com algumas modificações.

A PFGE foi realizada usando fonte EPS600 e equipamento Gene Navigator (Pharmacia Biotech). Inicialmente, os VREs foram cultivados em placas contendo meio de cultura ágar Müeller-Hinton e incubados a 37°C por 24 horas. Uma colônia de cada isolado foi inoculada em aproximadamente 3mL de caldo BHI e incubada nas mesmas condições citadas acima.

Dando continuidade ao experimento, foi transferida uma alíquota de 1,5mL da cultura obtida para um tubo “tipo *eppendorf*” e foi centrifugada a 15.294g, por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em 500µL de solução PIV (10mM Tris, pH 8.0, 1.0 M NaCl). Uma nova centrifugação foi realizada sob as mesmas condições citadas anteriormente. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado suspenso em 200 µL de solução PIV. Em seguida, 150µL da suspensão bacteriana foram transferidos para outro tubo “tipo *eppendorf*”, que foi colocado em banho de água a 45°C e foram adicionados a este tubo 150µL de agarose solubilizada a 45°C (1,5% Agarose Ultra Pure, Gibco) para o preparo dos blocos de agarose, que foram montados por gotejamento em lâminas de vidro.

Os blocos de agarose foram colocados em tubos cônicos e em seguida foi acrescido 1mL de solução de lise EC (6mM Tris pH 8.0, 1M NaCl, 100mM EDTA pH 8.0, 0,2% deoxycolato de sódio, 0,5% N-lauryl sarcosine, 0,5% Brij 58), contendo 1mg/mL de lisozima e 20µg/mL de RNase. Os tubos foram incubados a 37°C, por 4 horas. Logo após, a solução tamponante foi retirada e foi adicionado 1mL de solução ES (0,5M EDTA, 1% Na laurylsarcosine), acrescida de 1mg/mL de proteinase K. Os tubos com os blocos de agarose contendo o DNA, foram incubados a 50°C, por 18 horas.

Após 18 horas, a solução ES foi decantada e os blocos foram lavados com 13 mL de solução TE 1X (10mM Tris, pH 7.5; 1mM EDTA, pH 8.0) por 5 vezes com duração de 30 minutos para cada lavagem. Após a lavagem dos blocos para a remoção da proteinase K, os mesmos foram mantidos em tubos de 1,5mL com 1mL de solução tamponante TE e foram estocados a 4°C, por um período máximo de 12 meses, até utilização.

Na próxima etapa foi realizada a clivagem dos DNAs contidos nos blocos de agarose com a enzima de restrição *SmaI*. Para que o DNA fosse fragmentado, cada bloco foi colocado em 100µL de solução tamponante 1X concentrada da enzima *SmaI* e mantido por 30 minutos, à temperatura ambiente. Esta solução tamponante foi retirada e foram adicionados, em cada tubo, 45µL do tampão da enzima diluída 1X, acrescida da enzima de restrição *SmaI* (27U). Por fim, a reação foi incubada, em banho de água a 30°C, por 24 horas.

Para a eletroforese, foram preparados 150mL de gel de agarose 1% (Agarose Ultra Pure, Gibco) em TBE 0,5X (0,89M Tris; 0,89M ácido bórico; 0,25M EDTA; pH 8.0). A

eletroforese foi realizada em TBE 0,5X à temperatura de 8°C em voltagem de 180V por 25 horas. Os pulsos elétricos foram de 20 segundos por 10 horas, 8 segundos por 10 horas e 3 segundos durante 5 horas.

Após a eletroforese, o gel foi imerso em solução de brometo de etídio a 1µg/mL, por 15 minutos e em seguida, imerso em água por 30 minutos, sendo assim fotografado pelo sistema AlphaImager® (Alpha Innotech).

O perfil eletroforético de macrorrestrição foi analisado pela análise visual segundo critérios estabelecidos por Tenover (1995) e também pelo programa Bionumerics (*Applied Maths*). A similaridade genômica dos isolados foi determinada pelo coeficiente Dice e dendrograma foi construído segundo o método UPGMA (do inglês, *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

3.8. Tipagem por seqüenciamento de *multilocus*

A tipagem foi realizada por seqüenciamento de *multilocus* (MLST) para *E. faecium*, segundo o esquema proposto por Homan et. al. (2002). Este método é baseado na amplificação e seqüenciamento de fragmentos internos de 7 genes *housekeeping* de *E. faecium*: *atpA* (ATP sintetase, subunidade alfa), *ddl* (D-alanina-D-alanina), *gdh* (Desidrogenase glicose-6-fosfato), *purK* (fosforibosilaminoimidazol carboxilase subunidade ATPase), *gyd* (deidrogenase gliceraldeido-3-fosfato), *pstS* (transportador cassete ligado a ATP fosfato) e *adK* (adenilato quinase).

Segundo as condições descritas no *website* <http://efaecium.mlst.net/>, com algumas modificações, a PCR foi realizada em volume final de 50 µL. Foi preparada reação contendo 0,625U de *Sigma Taq DNA Polimerase High fidelity*, 20 pmol de cada *primer* e água ultrapura (Sigma) para completar o volume final de 50 µL. Foram utilizados 4 µL do DNA (concentração de 30ng/µL) como molde para amplificação. As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50 °C e 30 segundos a 72 °C, seguido por uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. As reações de amplificação e seqüenciamento foram realizadas com os *primers* segundo Homan et al. (2002) descritos na Tabela 6. Os produtos amplificados foram purificados com o *kit* de purificação GFX-TM PCR (*Amershan Bioscience*) para seqüenciamento.

Tabela 6- *Primers* utilizados para a tipagem por MLST

Gene alvo	Nome do <i>primer</i>	Seqüência do <i>primer</i> 3'-5'
Adenilato quinase	<i>Adk1n</i>	GAACCTCATTTTAATGGGG
	<i>Adk2n</i>	TGATGTTGATAGCCAGACG
ATP sintetase, subunidade alfa	<i>atpA1n</i>	TTCAAATGGCTCATACGG
	<i>atpA2n</i>	AGTTCACGATAAGCAACAGC
D-alanina-D-alanina	<i>Ddl1</i>	GAGACATTGAATATGCCTTATG
	<i>Ddl2</i>	AAAAAGAAATCGCACCG
Desidrogenase glicose-6-fosfato	<i>Gdh1</i>	GGCGCACTAAAAGATATGGT
	<i>Gdh2</i>	CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA
Deidrogenase gliceraldeido-3-fosfato	<i>Gyd1</i>	CAAAGTCTTAGCTCCAATGGC
	<i>Gyd2</i>	CATTTCGTTGTCATACCAAGC
Fosforibosilaminoimidazol carboxilase subunidade ATPase	<i>purK1</i>	GCAGATTGGCACATTGAAAGT
	<i>purK2</i>	TACATAAATCCCGCTGTTTCT
Transportador cassete ligado a ATP fosfato	<i>pstS1</i>	TTGAGCCAAGTCGAAGCTGGAG
	<i>pstS2</i>	CGTGATCACGTTCTACTTCC

3.8.1. Seqüenciamento dos produtos de PCR

Os seqüenciamentos dos produtos da PCR, tanto para MLST quanto para *IS1251*, foram realizados em seqüenciador automático de DNA MegaBace™ 1000 DNA Sequencing System (LG Health Care).

Para a realização dos seqüenciamentos, 1 µl de cada produto de PCR e 0,8 µl de cada respectivo iniciador, foram adicionados a 4 µl de solução do kit DYEnamic™ ET Dye Terminator (LG Health Care), próprio para o seqüenciamento no MegaBACE™ e água deionizada esterilizada suficiente para o volume final de 10 µl em microplaca de 96 poços. Em seguida, a placa foi colocada no termociclador *Mastercycler Gradiente* (Eppendorf), programado para executar os seguintes ciclos: 95 °C por 2 segundos, 95 °C por 10 segundos, 51 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto. As três últimas etapas foram repetidas 35 vezes.

O DNA amplificado foi precipitado, seguindo-se o protocolo de precipitação com acetato de amônio, segundo recomendações do fabricante. Após a precipitação, as amostras foram seqüenciadas no MegaBACE™ 1000 (LG Health Care). Os resultados foram documentados automaticamente em eletroferogramas na extensão abd.

Para cada gene foram realizadas reações de amplificações, cujos produtos foram seqüenciados, no mínimo, duas vezes, para garantir a reprodutibilidade e qualidade das seqüências obtidas, bem como ter um número maior de seqüências para análise.

3.8.2. Análises dos sequenciamentos

Após o seqüenciamento e análise inicial da qualidade das seqüências, cada conjunto de seqüências de um mesmo gene foi analisado individualmente, pelo programa *ChromasPro* versão 1.33 (Technelysium Pty Ltd). Pela análise dos eletroferogramas foram gerados contigs, ou seja, várias seqüências sobrepostas em comum, juntamente com uma sequencia padrão previamente conhecida, a qual tem a função de delimitar o tamanho da seqüência a ser analisada e que está disponível no banco de dados <http://efaecium.mlst.net/>. Cada seqüência obtida, após análise, foi finalmente documentada na forma linear (extensão FASTA) para posterior análise *online*. Para cada seqüência diferente de um *locus* específico foi dado um número de alelo e cada combinação única de alelos (o perfil alélico) foi atribuído outro número (*sequence type* - ST).

3.8.3. Determinação da relação genética entre as linhagens sequenciadas

Utilizando o programa eBURSTv3, também disponível *online* <http://efaecium.mlst.net/>, um diagrama de similaridade genética foi construído baseando-se nos alelos e STs de cada isolado estudado e do banco de dados, para demonstrar a relação entre as amostras e também para separá-las em grupos, representando complexos clonais, quando existentes. O diagrama é gerado em forma de esferas, representando cada ST e linhas unindo os STs mediante a proximidade genética (JOLLEY et. al., 2001; FEIL et. al., 2004, TURNER et. al., 2007; PITONDO-SILVA, 2007). O programa eBURSTv3 também permitiu a análise das amostras estudadas em relação às amostras contidas no banco de dados de diversas localidades geográficas, sendo então realizada uma análise global (FEIL et. al., 2004; TURNER et. al., 2007).

4. Resultados

4.1. Determinação das espécies de enterococos

Foi realizada PCR para identificação das espécies de VREs isolados de 2 hospitais de Ribeirão Preto. Dentre os 53 VREs analisados, foram identificados: 43 *E. faecium* no HCFMRP-USP e 5 *E. faecium* na SCMRP, no período de setembro 2008 a setembro de 2010 e 5 *E. faecium* (HC02MI-61, HC10F-62, HC46F-63, HC930U-64, HCVRE-65) isolados também no HCFMRP-USP, em meados de 2005/2006, que foram os cinco primeiros VREs isolados no referido hospital.

4.2. Pesquisa de genes *van*

Os genes *vanA*, *vanB* e *vanC* foram pesquisados por PCR. Todos *E. faecium* estudados dos dois hospitais de Ribeirão Preto apresentaram o gene *vanA*, justificando a resistência à vancomicina e à teicoplanina. Nenhum dos isolados apresentou genes *vanB* ou *vanC*.

4.3. Determinação da concentração inibitória mínima de vancomicina e daptomicina

Todos *E. faecium* isolados dos 2 hospitais em estudo apresentaram CIM de vancomicina $>256\mu\text{g/mL}$ pelo Etest[®].

A CIM da daptomicina dada pelo Etest[®] para os 53 isolados de *E. faecium* estudados mostrou que 54,7% (n=29) apresentaram CIM de $1,5\mu\text{g/mL}$; 24,5% (n=13) CIM de $2\mu\text{g/mL}$; 15,1% (n=8) CIM de $1\mu\text{g/mL}$ e 5,7% (n=3) apresentaram valores de CIM de daptomicina $\leq 0,5\mu\text{g/mL}$. Portanto, como sensibilidade à daptomicina é quando a inibição do crescimento se mantém em concentrações menores ou iguais a $4\mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2009), os valores das CIMs de daptomicina apresentaram dentro do limite de sensibilidade para todos os enterococos analisados.

4.4. Determinação da presença de genes de virulência

Dentre os genes codificadores de determinantes de virulência pesquisados (Apêndice A) por PCR, nenhum dos 53 *E. faecium* resistentes à vancomicina (VRE_{fm}, do inglês, *vancomycin resistant E. faecium*) estudados apresentou genes codificadores de subunidades da citolisina (genes *cylLL*, *cylLs*, *cylA*) e genes codificadores de hialuronidase (gene *hyl*).

Já com relação ao gene codificador de proteína de superfície enterocócica (gene *esp_{fm}*), os resultados mostraram que todos 53 VRE_{fm} isolados do HCFMRP-USP e da SCMRP apresentaram fragmentos amplificados do gene *esp*.

Outro gene codificador de determinante de virulência pesquisado foi o gene da proteína ligadora de colágeno (gene *acm*); de 48 VRE_{fm} isolados no HCFMRP-USP, 47

(97,9%) apresentaram o referido gene, com exceção *E. faecium* HC-22; todos *E. faecium* isolados da SCMRP apresentaram o gene *acm*.

A PCR para pesquisa do gene codificador de substância de agregação (gene *agg*) mostrou que dentre os 48 *VREfm* isolados do HCFMRP-USP, 9 (18,8%) dos isolados apresentaram o gene *agg*. Dos *VREfm* isolados da SCMRP, apenas 2 dos 5 isolados de *E. faecium* apresentaram o gene *agg*.

E, por fim, a pesquisa por PCR do gene codificador de gelatinase (gene *gel*) revelou que de 48 *VREfm* isolados do HCFMRP-USP, 8 (16,7%) apresentaram o gene *gel*. Dos *VREfm* isolados da SCMRP, apenas 2 dos 5 isolados de *E. faecium* apresentaram o gene *gel*.

A relação dos genes codificadores de fatores de virulência pesquisados está demonstrada no apêndice A.

4.5. Os elementos VanA

Dentre os 53 *VREfm* isolados do HCFMRP-USP e da SCMRP, apenas os 5 primeiros *VREfm* isolados do HCFMRP-USP apresentaram fragmentos amplificados na reação de *Long-PCR1*, mostrando que estes isolados apresentavam o transposon *Tn1546* intacto, com os 10.851pb. Já os elementos VanA dos outros 48 *VREfm* estudados não apresentaram *amplicons* nesta reação, indicando a ausência ou deleção de, no mínimo, uma das sequências repetidas e invertidas terminais (*IR_R* ou *IR_L*) do transposon (Figura 4).

Todos os enterococos isolados nos 2 hospitais de Ribeirão Preto foram também analisados, pela reação de *Long-PCR 2/3*, quanto à amplificação do conjunto de genes *vanRSHAX*, um fragmento de 4,4kb que corresponde aos nucleotídeos 4101-8549 do *Tn1546*. Os 5 primeiros *VREfm*, isolados em 2005/2006 no HCFMRP-USP, apresentaram o grupamento gênico *RSHAX* intacto. Já, todos 48 *VREfm* isolados do HCFMRP-USP e da SCMRP, no período de setembro de 2008 a setembro de 2010, apresentaram produto de amplificação maior do que os 4,4kb esperados, indicando presença de sequência de inserção em algum lugar deste conjunto de genes.

Foi realizada a clivagem com a enzima de restrição *DdeI* de todos os *amplicons* que apresentaram grupamento gênico *RSHAX* de tamanho maior do que os 4,4kb esperados. Estes fragmentos clivados mostraram nitidamente que, ao invés do fragmento de 874pb, apresentaram outras duas bandas sendo uma maior e a outra menor que o fragmento de 874pb. Também, em relação ao fragmento de 570pb, há provavelmente sobreposição de fragmentos (Figura 5). Foi realizado seqüenciamento da região onde se encontrou banda extra, para

assim, determinar qual a localização exata da sequência de inserção e identificação do elemento IS inserido.

Figura 5 – Gel de agarose a 1% demonstrando os fragmentos obtidos após clivagem do grupamento gênico *RSHAX*. C – *E. faecalis* *vanA* (protótipo *Tn1546* intacto); P – marcador de peso molecular de 1Kb *Plus DNA Ladder*; *E. faecium* HC02MI-61, *E. faecium* HC-32 e *E. faecium* HC-33.

Dentre os 53 *VREfm* isolados do HCFMRP-USP e da SCMRP, apenas os 5 primeiros VREs isolados do HCFMRP-USP apresentaram fragmentos amplificados para extremidades esquerda (P1-P2) e direita (P19-P1) do transposon *Tn1546*, na reação de *overlapping* PCR. A linhagem HC-42 isolada do HCFMRP não apresentou fragmentos amplificados para nenhuma das extremidades do transposon. Já 81% (43 *VREfm*) estudados apresentaram fragmentos amplificados para extremidade direita (P19-P1) do transposon *Tn1546*, mas não para extremidade esquerda (P1-P2) (Figura 6). Com relação aos resultados de *overlapping* PCR utilizando pares de *primers* P11-P12 e P3-P4, todos 48 *VREfm* isolados do HCFMRP-USP e da SCMRP, no período de setembro de 2008 a setembro de 2010, que apresentaram produto de amplificação maior do que os 4,4kb esperados pela reação de *Long-PCR* 2/3, apresentaram fragmento maior que o esperado usando o par de *primer* P11-P12, entre genes *vanS* e *vanH*, localizando uma inserção de aproximadamente 1.500 pb nesta região do elemento *VanA*. Com relação ao par de *primer* P3-P4, todos 48 *VREfm*, citados anteriormente, amplificaram fragmento de DNA do tamanho esperado (1.132 pb), indicando perda apenas da extremidade esquerda (P1-P2).

De acordo com sequenciamento da região do transposon onde se verificou uma inserção, entre genes *vanS* e *vanH* (primer P11-P12), foi confirmada a presença de *IS1251*, a qual está inserida de maneira invertida na posição *downstream* do nucleotídeo 5.820 do elemento VanA (Figura 6). Foi utilizada a ferramenta *blast* do website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/> para comparar as sequências obtidas dos isolados do presente estudo com as sequências depositadas no banco de dados. Esta sequência de inserção de aproximadamente 1.500 pb presente nos isolados estudados mostrou 98%, 97% e 97% de identidade genética com a sequência de inserção *IS1251*, correspondentes aos números de acesso, AF148130.1, AY560917.1 e L34675.1, respectivamente.

Figura 6 - Representação esquemática do Tn1546 intacto e dos elementos VanA dos VRE_{fm} do estudo

4.6. Determinação da similaridade genômica de VRE_{fm} por PFGE

De acordo com o dendrograma construído a partir do perfil de macrorrestrição dos isolados de *E. faecium* analisados (Figura 7) e considerando que isolados com similaridade genômica superior a 90% (tracejado vermelho) são do mesmo tipo clonal, foram visualizados 14 perfis de PFGE. As linhagens foram divididas de acordo com o perfil de PFGE da seguinte forma: A (8 isolados), B (1 isolado), C (1 isolado), D (7 isolados), E (1 isolado), F (6 isolados), G (3 isolados), H (10 isolados), I (5 isolados), J (1 isolado), K (1 isolado), L (2 isolados), M (5 isolados), N (1 isolado). Apesar de várias tentativas, não foi possível determinar o perfil de macrorrestrição do *E. faecium* HC-51, devido à degradação do DNA.

Os perfis de PFGE foram analisados e foi verificado que havia 4 perfis clonais (A, D, F, H) com 6 ou mais isolados. Além disso, de acordo com a Figura 7, foi observada similaridade genômica entre isolados do HCFMRP-USP e da SCMRP (SCM-25, SCM-38, SCM-39, SCM-56), sendo que, linhagens de ambas as instituições apresentaram perfis de PFGE A, H e I.

Foram realizadas culturas de vigilância de VRE na Unidade de Hematologia, no HCFMRP, nos meses de setembro e outubro de 2008. Pela análise da PFGE (Figura 7) foram observados 5 perfis de PFGE diferentes (L, F, G, H, N). Os perfis de PFGE L, F, G e H também foram encontrados em VREs isolados tanto de colonização quanto de infecção de pacientes de diferentes clínicas (Apêndice A e Figura 7), em 2009, mostrando a disseminação destas linhagens no referido hospital.

No período de abril a julho de 2009, foram realizadas no HCFMRP-USP culturas de vigilância de VRE nas Unidades de Hematologia e Imunologia, sendo detectados pacientes colonizados por VRE nestas enfermarias, mas também foram identificados pacientes com infecção por VRE na Imunologia e em outras clínicas. Pela análise da PFGE (Figura 7) foi observada disseminação clonal dos enterococos com perfis (D, F e I) de PFGE neste período.

No período de agosto a novembro de 2009, foram realizadas culturas de vigilância de VRE no CTI Pediátrico e Berçário no HCFMRP-USP, sendo detectados pacientes colonizados, mas também com infecção por VRE com disseminação clonal dos enterococos com perfis (H e H1) de PFGE neste período do estudo. Além disso, também foi observado que os isolados da SCMRP apresentaram alta similaridade genômica com os do HCFMRP-USP neste período do estudo (Apêndice A e Figura 7).

Com relação aos VREs isolados em 2010, foi observado que nos meses de julho e agosto ocorreu disseminação clonal do perfil A de PFGE (Apêndice A e Figura 7). Os VREs foram isolados tanto de colonização como de infecção e os pacientes estavam em clínicas diferentes. A partir da análise do Apêndice A e Figura 7, pode-se observar que neste período de 2010 também ocorreu alta similaridade genômica entre um isolado de VRE (SCM-56) da SCMRP com os do HCFMRP-USP.

De acordo com a análise do dendrograma (Figura 7), os primeiros VRE_{fm} (HC02MI-61, HC10F-62, HC46F-63, HC930U-64, HCVRE-65) isolados no HCFMRP-USP, em meados de 2005/2006, apresentaram perfil de PFGE (M, M1 e M2) diferente da maioria dos isolados, não ocorrendo a presença deste perfil de PFGE em isolados posteriores.

Figura 7 – Dendrograma gerado pelo método UPGMA após PFGE utilizando o programa *Bionumerics* a partir do perfil de macrorrestrrição do crDNA clivado com a enzima *SmaI*. Os perfis de PFGE dos isolados estão representados por letras coloridas maiúsculas, seguido da identificação numérica do VRE estudado, procedência do paciente, data da coleta do material, novamente perfil de PFGE e ST (MLST). HC, HCFMRP- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; SCMRP- Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto; HEM: Hematologia; GAM: Gastroenterologia; IMU: Imunologia; TMO: Transplante de medula óssea; ORT: Ortopedia; CTI: Centro de Terapia Intensiva; CTIP: Centro de Terapia Intensiva Pediátrico; → Isolados de pacientes com infecção (15, 16, 17, 22, 26, 27, 33, 34, 37, 38, 39, 43, 47, 54, 55, 56, 57)

4.7. Tipagem por sequenciamento de *multilocus* (MLST)

Dos 53 *E. faecium* identificados nos 2 hospitais de Ribeirão Preto, 31 foram caracterizados por MLST, os quais foram selecionados de acordo com resultados obtidos por PFGE. Aqueles que apresentavam diferentes perfis de PFGE foram escolhidos e, dentre os que apresentavam mesmo perfil de PFGE, estes foram escolhidos de acordo com a data de isolamento, espécimes clínicos que tinham sido isolados (infecção ou colonização), procedência (setor do hospital) e hospital de isolamento (HCFMRP-USP ou SCMRP) (Figura 7).

De acordo com os resultados obtidos por MLST, dos 31 *E. faecium* analisados neste estudo (Figura 8 e Tabela 7), foram detectados 9 diferentes STs, dentre estes, 5 STs foram descritos pela primeira vez (656, 657, 658, 659 e 660), demonstrados em vermelho na Tabela 7. Os novos STs 659 (HC-62) e 660 (HC-63), foram obtidos devido à presença de alelos inéditos para gene *ddl*, identificados como 52 e 53, respectivamente. Os demais novos STs (656, 657 e 658), apesar de possuírem alelos previamente conhecidos, o conjunto dos mesmos gerou uma combinação alélica inédita, resultando nestes STs que ainda não haviam sido descritos (Tabela 7).

A Figura 8 ilustra o diagrama de similaridade genética gerado pelo programa eBURSTv3, com todos os STs presentes no banco de dados público de MLST de *E. faecium*, sendo possível ver os complexos clonais gerados, bem como a relação genética entre as linhagens estudadas. Estão indicados por setas todos os STs identificados em *E. faecium* até agora descritos no Brasil e, os 9 diferentes STs encontrados nos isolados do presente estudo, estão destacados por linhas tracejadas. Vale ressaltar que, cada esfera presente no diagrama de similaridade genética representa um ST, cujo tamanho é proporcional ao número de isolados que o ST contém, considerando todos os isolados cadastrados no banco de dados de MLST (Figura 8).

Dos 31 *E. faecium* caracterizados por MLST (Figura 8 e Tabela 7), 3,2% (n=1) apresentou ST17; 9,7% (n=3) apresentaram ST78 que é SLV (do inglês, *single-locus variant*) do ST17; 3,2% (n=1) apresentou ST659 e 3,2% (n=1) ST660, os quais são SLV do ST78; 3,2% (n=1) apresentou ST656, o qual é TLV (do inglês, *triple-locus variant*) do ST78. Já 38,7% (n=12) apresentaram ST412, o qual é DLV (do inglês, *double-locus variant*) do ST78; 32,3% (n=10) apresentaram ST478, que é SLV do ST412 e 3,2% (n=1) apresentou ST657, o qual é SLV do ST478 e DLV do ST412. E, por fim, a linhagem HC-40 apresentou ST658, que é um *singleton*, ou seja, não possui nenhum ST associado a este ST, o qual foi o único ST não pertencente ao complexo clonal 17 (CC17), todos os outros STs identificados faziam parte deste complexo clonal. Portanto, de acordo com Figura 7 e Tabela 7, os principais STs identificados nos VRE_{efm} estudados, no período de 2008-2010, foram ST412 e ST478, ambos

pertencentes ao CC17, os quais predominaram ao longo do período do estudo, sendo identificados nas várias enfermarias dos 2 hospitais estudados.

Tabela 7 – Distribuição de STs, CCs e PFGE entre *VREfm* isolados no HCFMRP-USP e SCMRP no período de setembro de 2008 a setembro de 2010 e dos 5 primeiros *VREfm* isolados do HCFMRP-USP

Linhagem	Data Isolamento	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>	ST	CC	PFGE
<i>E. faecium</i> HC-02	24/09/2008	15	3	1	44	1	20	1	656	17	L1
<i>E. faecium</i> HC-03	25/09/2008	15	43	1	44	1	20	1	478	17	F
<i>E. faecium</i> HC-04	02/10/2008	15	43	1	44	1	20	1	478	17	G
<i>E. faecium</i> HC-05	02/10/2008	15	1	1	44	1	20	1	412	17	H
<i>E. faecium</i> HC-07	16/10/2008	1	1	1	1	1	1	1	17	17	N
<i>E. faecium</i> HC-09	29/01/2009	15	1	1	44	1	20	1	412	17	G
<i>E. faecium</i> HC-10	31/03/2009	15	1	1	44	1	20	1	412	17	L
<i>E. faecium</i> HC-11	07/04/2009	15	43	1	44	1	20	6	657	17	J
<i>E. faecium</i> HC-12	14/04/2009	15	43	1	44	1	20	1	478	17	I
<i>E. faecium</i> HC-14	14/04/2009	15	43	1	44	1	20	1	478	17	F
<i>E. faecium</i> HC-20	23/06/2009	15	43	1	44	1	20	1	478	17	D
<i>E. faecium</i> HC-22	Junho/2009	15	1	1	44	1	20	1	412	17	I
<i>E. faecium</i> SCM-25	Julho/2009	15	43	1	44	1	20	1	478	17	I1
<i>E. faecium</i> HC-26	17/07/2009	15	43	1	44	1	20	1	478	17	D
<i>E. faecium</i> HC-28	Julho/2009	15	1	1	44	1	20	1	412	17	H
<i>E. faecium</i> HC-33	13/08/2009	15	1	1	44	1	20	1	412	17	H1
<i>E. faecium</i> HC-34	26/08/2009	15	1	1	44	1	20	1	412	17	H
<i>E. faecium</i> HC-35	25/08/2009	15	1	1	44	1	20	1	412	17	E
<i>E. faecium</i> SCM-38	Setembro/2009	15	1	1	44	1	20	1	412	17	H1
<i>E. faecium</i> HC-40	20/10/2009	36	1	1	44	17	20	1	658	-	K
<i>E. faecium</i> HC-42	30/11/2009	15	43	1	44	1	20	1	478	17	I2
<i>E. faecium</i> HC-43	Julho/2010	15	1	1	44	1	20	1	412	17	B
<i>E. faecium</i> HC-48	29/07/2010	15	43	1	44	1	20	1	478	17	A1
<i>E. faecium</i> HC-53	30/07/2010	15	1	1	44	1	20	1	412	17	A
<i>E. faecium</i> SCM-56	Agosto/2010	15	1	1	44	1	20	1	412	17	A
<i>E. faecium</i> SCM-57	Agosto/2010	15	43	1	44	1	20	1	478	17	C
<i>E. faecium</i> HC-61	Meados 2005/2006	15	1	1	1	1	1	1	78	17	M1
<i>E. faecium</i> HC-62	Meados 2005/2006	15	52	1	1	1	1	1	659	17	M2
<i>E. faecium</i> HC-63	Meados 2005/2006	15	53	1	1	1	1	1	660	17	M
<i>E. faecium</i> HC-64	Meados 2005/2006	15	1	1	1	1	1	1	78	17	M1
<i>E. faecium</i> HC-65	Meados 2005/2006	15	1	1	1	1	1	1	78	17	M

Em vermelho: novos alelos e STs encontrados no presente estudo

Figura 8- Diagrama de similaridade genética gerado pelo programa eBURSTv3, com os dados de MLST de *E. faecium*. Os 9 STs encontrados nas linhagens do estudo estão destacados por linhas tracejadas e esferas circundadas por halos rosa. As setas indicam os STs referentes a linhagens de *E. faecium* provenientes do Brasil. Esferas em amarelo indicam início de formação de novos subgrupos; em azul, STs centrais de complexos clonais; demais STs são representados por esferas pretas. O tamanho das esferas é proporcional à quantidade de linhagens pertencentes ao ST representado.

Dentre os 5 primeiros *E. faecium* isolados no HCFMRP-USP em meados de 2005 e 2006 (HC-61 a HC-65), 3 apresentaram ST78 e 2 apresentaram novos STs, sendo eles ST659 e ST660 (Tabela 7). Apesar destes STs não terem sido detectados em anos posteriores, foi observado que a maioria dos isolados de 2008-2010, apresentou variações genéticas, sendo elas DLV ou TLV, a partir do ST78, gerando os STs 656, 412 e 478, mostrando assim a predominância dos STs gerados a partir do ST78 nas linhagens estudadas (Figura 8). Vale ressaltar que, o ST78, o qual vem se disseminando mundialmente, está sendo relatado pela primeira vez no Brasil, nas linhagens do presente estudo. O único *VRE_{fm}* que apresentou ST17 (HC-07) não se disseminou.

De acordo com a análise dos dados de PFGE e MLST (Figuras 7 e 8 e Tabela 7), foi observado que alguns isolados que apresentavam mesmo perfil de PFGE, mostraram STs diferentes. Por exemplo, as linhagens HC-63 e HC-65, que apresentaram mesmo perfil M de PFGE, sendo uns dos primeiros *VRE_{fm}* isolados, apresentaram diferentes STs (ST660 e 78, respectivamente) (Tabela 7). Outro exemplo ocorreu com as linhagens *VRE_{fm}* HC-04 (ST478) e HC-09 (ST412), ambas com perfil G de PFGE e isoladas de pacientes colonizados em outubro de 2008 e janeiro de 2009, respectivamente. Por fim, um terceiro exemplo ocorreu com as linhagens *VRE_{fm}* (HC-12 e HC-22), as quais apresentavam perfil I de PFGE, a primeira foi isolada de paciente colonizado e a segunda de paciente com infecção, estas linhagens apresentaram os STs 478 e 412, respectivamente.

A partir dos resultados obtidos por MLST, foi observado que as linhagens (SCM-25, SCM-38, SCM-56 e SCM-57) isoladas na SCMRP, apresentaram STs 412 e 478, mostrando assim relação clonal com as linhagens do HCFMRP que apresentaram o mesmo ST (Tabela 7).

5. Discussão

A emergência de resistência à vancomicina no mundo iniciou-se no final dos anos 80, sendo primeiro documentada na parte ocidental da Europa e posteriormente nos EUA (LECLERCQ et al., 1988; UTTLEY et al., 1988). Depois disso, o isolamento de enterococos resistentes à vancomicina tem sido continuamente reportado em diversas localizações geográficas, inclusive no Brasil (ZANELLA et al., 2003; CAMARGO et al., 2005; CAMARGO; GILMORE; DARINI, 2006; TEIXEIRA et al., 2007; MORETTI et al., 2011; PALAZZO et al., 2011).

O HCFMRP-USP é um hospital terciário, de grande porte e que realiza procedimentos de alta complexidade. Apesar do isolamento de VRE, na década de 90 ter ocorrido em vários hospitais brasileiros, o primeiro caso de VRE no HCFMRP-USP só ocorreu por volta de 2005, seguido por disseminação de infecção enterocócica em pacientes onco-hematológicos em 2008, havendo casos de infecção da corrente sanguínea e com conseqüente óbito. Em 2009, a cultura de vigilância para detecção de VRE em suabes retais de pacientes da Unidade da Hematologia foi intensificada, como também foi verificada a ocorrência de novos casos de infecção por VRE, no trato urinário, sangue, cavidade peritoneal e ferida cirúrgica de pacientes de várias clínicas. Com este levantamento, foi constatada a disseminação de VRE colonizando o trato digestivo de pacientes hospitalizados no HCFMRP (comunicação pessoal – CCIH – HCFMRP/USP). Outro fato concomitante foi o isolamento de VREs na SCMRP, o que permitiu fazer comparação interhospitalar de VREs isolados nos 2 hospitais de Ribeirão Preto.

Dado o isolamento recente destes VREs, o presente trabalho foi importante para que se conhecesse a epidemiologia molecular dos VREs isolados nos pacientes destes hospitais, podendo dar subsídios para medidas de controle de infecção hospitalar e conduta terapêutica.

Atualmente, são conhecidos, em enterococos, sete fenótipos de resistência à vancomicina adquiridos (fenótipos VanA/B/D/E/G/L/M); contudo, apenas VanA e, em menor proporção, VanB são mais prevalentes (WERNER et al., 2008). *E. faecium* é o reservatório de resistência de fenótipos VanA e VanB em seres humanos (WILLEMS et al., 2005; WILLEMS; BONTEN, 2007). Conseqüentemente, o aumento da taxa de VRE em diversos países europeus é devido ao aumento da prevalência de *E. faecium* resistente à vancomicina.

O fenótipo VanA pode ser caracterizado pela presença de elementos VanA ou do Tn1546 intacto, transposon com 10.851 pb, o qual contém o grupamento de genes que codifica resistência aos glicopeptídeos. O Tn1546 se apresenta intacto na maioria das linhagens de VREs isoladas no Brasil (CAMARGO et al., 2005; PALAZZO et al., 2006), no entanto, já foram detectadas alterações no Tn1546 em algumas linhagens isoladas no Brasil

(DARINI; PALEPOU; WOODFORD, 2000; CAMARGO et al., 2004, CAMARGO, 2005; PALAZZO et al., 2006; PALAZZO et al., 2011), sendo assim, denominando-os *Tn1546-like elements* ou elementos VanA, para diferenciá-los do protótipo original.

No período do estudo, houve predominância de VREs da espécie *E. faecium*, houve apenas 1 isolamento de *E. faecalis* no HCFMRP e dois na SCMRP (dados não incluídos neste estudo), os quais apresentavam gene *vanA*, cuja presença deste gene confere resistência à vancomicina e teicoplanina. No presente estudo, todos *E. faecium* isolados nos dois hospitais de Ribeirão Preto também apresentaram gene *vanA* e CIM para vancomicina >256µg/mL pelo Etest[®].

De acordo com os resultados deste trabalho, os 5 primeiros VRE_{fm} (HC-61 a HC-65) isolados em meados de 2005/2006 de pacientes do HCFMRP-USP apresentaram o grupamento gênico *RSHAX* intacto e produziram *amplicons* no tamanho esperado na reação de *Long-PCR1*, mostrando que estes isolados apresentavam o transposon *Tn1546* intacto, com os 10.851pb. Já todos 48 *E. faecium* isolados do HCFMRP-USP e da SCMRP, no período de setembro de 2008 a setembro de 2010, apresentaram produto de amplificação maior do que os 4,4kb esperados na reação de *Long-PCR2/3* e não apresentaram amplificação do elemento VanA na reação de *Long-PCR1*. Dessa forma, a inabilidade dos VRE_{fm} estudados para amplificar o elemento VanA, na reação de *Long-PCR1*, pôde ser explicada devido ao fato que, ao se realizar *overlapping PCR* com *primers* específicos, foi verificado que a maioria dos VRE_{fm} em estudo n=43 (81%) apresentaram fragmentos amplificados para extremidade direita (P19-P1) do transposon *Tn1546*, mas apresentavam deleção da região invertida e repetida esquerda do transposon (IR_L) (*primers* P1-P2).

Com relação ao resultado de *overlapping PCR* utilizando par de *primer* P11-P12, para estes 48 *E. faecium* isolados do HCFMRP-USP e da SCMRP, no período de setembro de 2008 a setembro de 2010, foi observado que apresentaram fragmento maior que o esperado, entre genes *vanS* e *vanH*, verificando uma inserção de aproximadamente 1.500 pb. De acordo com sequenciamento desta região foi confirmada a presença de *IS1251*, a qual está inserida de maneira invertida na posição *downstream* do nucleotídeo 5.820 do elemento VanA, começando 17 nucleotídeos além do códon de parada de *vanS*. Esta sequência de inserção (*IS1251*) foi primeiro descrita nos Estados Unidos (HANDWERGER et al., 1995), sendo novamente identificada posteriormente em isolados também dos EUA (JENSEN et al., 1998; WILLEMS et al., 1999). Já no Brasil, Camargo e colaboradores (2004) detectaram esta *IS1251* pela primeira vez, em 2004, em elemento VanA de VRE isolado de cultura de sangue de uma paciente em um hospital brasileiro (Rio de Janeiro), a qual tinha uma história de

tratamento de transplante de medula óssea nos EUA, sugerindo que este VRE foi introduzido do exterior, provavelmente através disseminação inter-hospitalar e internacional. Palazzo e colaboradores (2011), ao realizarem caracterização genotípica da resistência aos glicopeptídeos de VREs isolados em Campinas/São Paulo, também detectaram estas mesmas alterações no elemento VanA, uma deleção da extremidade esquerda do transposon e uma inserção de aproximadamente 1.500 pb, identificada como IS1251, entre genes *vanS* e *vanH*, em consonância com o presente trabalho. Até recentemente, o que prevalecia entre determinantes de resistência aos glicopeptídeos em VREs no Brasil era a presença do transposon Tn1546 intacto, cenário este que pode estar sendo modificado, pela predominância de alterações nos elementos VanA em VREs isolados mais recentemente. Com relação ao resultado de *overlapping* PCR utilizando par de *primer* P3-P4, para estes 48 *E. faecium* isolados do HCFMRP-USP e da SCMRP, no período de setembro de 2008 a setembro de 2010, foi observado que todos amplificaram fragmento de DNA do tamanho esperado (1.132pb), mostrando que a deleção da extremidade esquerda do transposon, verificada a partir da ausência de amplificação de DNA com os *primers* P1-P2, não se estendeu para região amplificada pelos *primers* P3-P4, ficando restrita apenas à região amplificada pelos *primers* P1-P2. Vale ressaltar que, ocorreu uma exceção entre os resultados de VREfm (HC-42), isolado do HCFMRP, o qual não apresentou fragmentos amplificados para nenhuma das extremidades do transposon (Figura 6), mostrando a presença de outra variante do elemento VanA.

A presença de polimorfismos nas variantes do transposon Tn1546 de enterococos é bastante discutida entre pesquisadores mundialmente, sendo relatada a ocorrência de mutações, deleções e diferentes sequências de inserção nestes elementos VanA. Como também, tem sido sugerida por alguns pesquisadores a presuntiva associação entre estes elementos VanA específicos, áreas geográficas e/ou origens ambientais (HANDWERGER et al., 1995; JENSEN et al., 1998; WOODFORD et al., 1998; WILLEMS et al., 1999; SCHOUTEN et al., 2001; NOVAIS et al., 2008).

Portanto, pode-se deduzir que os enterococos do presente estudo, inicialmente com elementos VanA intactos, foram adquirindo sequências de inserções e/ou deleções com o decorrer do tempo e se adaptando ao ambiente hospitalar.

Além do estudo fenotípico e genotípico, é necessária a avaliação de drogas eficazes contra os VREs. A daptomicina, antimicrobiano recentemente disponível na terapêutica médica, tem mostrado eficácia contra cocos gram-positivos resistentes à vancomicina, motivo pelo qual houve interesse em testar este antibiótico *in vitro* contra os enterococos do estudo. A

CIM de daptomicina pelo Etest[®] mostrou que todos *E. faecium* isolados nos 2 hospitais em estudo foram sensíveis a este antibiótico. Este resultado está de acordo com diversos estudos que mostram a alta percentagem de sensibilidade de enterococos à daptomicina em diferentes localidades (PFALLER; SADER; JONES, 2007; BILLSTROM et al., 2008; MALLI et al., 2008; ZHANEL et al., 2008; SADER et al., 2009). Sendo assim, recentemente, estudos têm mostrado que daptomicina é ativa contra mais que 98% de enterococos testados, independente de sua sensibilidade a outros agentes antibacterianos. Esta ausência de resistência cruzada pode ser explicada devido ao fato que daptomicina tem um modo de ação distinto em relação aos outros antibióticos, incluindo glicopeptídeos (CANTÓN et al., 2010). Billstrom e colaboradores (2008) estudaram todos isolados de *E. faecium* de pacientes com sinais clínicos de sepse em Hospital Universitário na Suécia, entre janeiro de 2000 e dezembro de 2005 e também nenhum dos isolados foi resistente à daptomicina e à linezolida. Sader e Jones (2009) realizaram estudo comparativo e mostraram que o número de linhagens não sensíveis à daptomicina foi raro mesmo depois de alguns anos de seu uso clínico, indicando que a emergência de não sensibilidade é muito baixa nos centros médicos dos EUA, quando se utiliza os pontos de cortes preconizados pelo CLSI (2009). Destacando-se a importância de se monitorar continuamente, contudo, para que seja rapidamente detectada a emergência de uma real resistência e para guiar terapia com este e outros mais novos e ativos agentes antimicrobianos. Desta forma, desde o início do uso da daptomicina, tem sido relatados casos de *E. faecium* (LEWIS et al., 2005; LONG et al., 2005; LESHIO et al., 2006; FRAER et al., 2007) e *E. faecalis* (MUNOZ-PRICE; LOLANS; QUINN, 2005; KANAFANI; FEDERSPIEL; FOWLER, 2007; HIDRON et al., 2008) resistentes à daptomicina, mas ainda é raro. Dessa forma, como citado anteriormente, pesquisa de literatura realizada por Kelesidis e colaboradores (2011), a partir do PubMed e EMBASE, de 2003 até 2010, mostra que foram identificados 23 estudos que relatavam 150 enterococos não sensíveis à daptomicina, ou seja, menos que 2% dos enterococos foram não sensíveis à daptomicina com CIMs >4µg/mL. Outro estudo recente, também abordado anteriormente, foi realizado por Palmer e colaboradores (2011), que geraram variantes resistentes à daptomicina a partir de *E. faecalis* V583, na presença de concentrações cada vez mais aumentadas de daptomicina *in vitro*, com intuito de identificar as mudanças genéticas que constituem a base do desenvolvimento de resistência à daptomicina em enterococos. Foram identificados 7 genes candidatos a responsáveis pela resistência à daptomicina e três diferentes vias mutacionais em *E. faecalis*. Mutações em um destes 7 genes candidatos, codificando uma sintase cardiolipina, foram

encontradas em cada uma das linhagens adaptadas de *E. faecalis* V583, bem como nos isolados clínicos de *E. faecalis* e *E. faecium* resistentes à daptomicina.

Foi analisado o perfil de sensibilidade a outros antimicrobianos (beta-lactâmicos e quinolonas) de alguns *E. faecium* isolados do HCFMRP-USP e da SCMRP, dados pelo sistema de automação Vitek 2[®] (Biomérieux). Todos 37 *E. faecium* analisados foram resistentes à penicilina, ampicilina e levofloxacino. Destes *E. faecium* analisados 62,2%, 94,6%, 86,5% e 81,1% foram sensíveis a respectivamente, quinupristina/dalfopristina, linezolida, tetraciclina e cloranfenicol (dados não mostrados). Atualmente, nos hospitais dos EUA, mais de 80% dos *E. faecium* são resistentes à vancomicina e praticamente todos eles (>90%) apresentam resistência à ampicilina (HIDRON et al., 2008), o que também foi observado no presente estudo. Estudo realizado na França por Biendo e colaboradores (2010) também mostrou que todos 131 VRE_{fm} identificados, no período de abril de 2004 a janeiro de 2009, eram resistentes à penicilina e ampicilina.

Enterococos são considerados microrganismos de baixa virulência e os fatores de virulência de *E. faecium* não são muito conhecidos. Porém, alguns genes têm sido sugeridos como contribuintes para a virulência nesta espécie: substância de agregação (gene *agg*); citolisina (gene *cyl*); proteína ligadora de colágeno (gene *acm*), que tem sido associada com a patogênese de *E. faecium* do CC17 em endocardites; antígeno de endocardite de *E. faecalis* (gene *efas*); proteína de superfície enterocócica (gene *esp_{fm}*), que está envolvida na adesão inicial e formação de biofilme em *E. faecium* e que agrava transitoriamente infecção do trato urinário experimental; gelatinase (gene *gel*), a qual hidrolisa gelatina e colágeno e hialuronidase (gene *hyl*), que é carregado por plasmídeo transferível, mostrando aumentar a habilidade de uma linhagem laboratorial de *E. faecium* para colonizar o trato gastrointestinal de ratos e também aumentar a virulência de uma linhagem comensal de *E. faecium* em uma peritonite experimental (ARIAS et al., 2009; LEENDERTSE; HEIKENS; WIJNANDS, 2009; MANNU et al., 2003; NALLAPAREDDY; SINGH; MURRAY, 2008; RICE et al., 2009; TOP; WILLEMS; BONTEN, 2008).

A PCR para pesquisa de genes codificadores de determinantes de virulência indicou que, dentre os enterococos isolados das 2 instituições médicas em estudo, nenhum deles apresentou genes codificadores de subunidades da citolisina (genes *cylLL*, *cylLs*, *cylA*) e genes codificadores de hialuronidase (gene *hyl*). Em contrapartida, dos 53 *E. faecium* analisados, 100% (n=53) apresentaram fragmentos amplificados do gene *esp*, 98,1% (n=52) apresentavam o gene *acm*, 20,8% (n=11) apresentavam o gene *agg*, e 18,9% (n=10) apresentavam o gene *gel*. Portanto, é evidente a predominância dos genes *acm* e *esp* nos *E.*

faecium estudados. Todos VRE_{fm} isolados no HCFMRP-USP e SCMRP, em 2008 e 2009, apresentavam os genes *acm* e *esp_{fm}*, com exceção do VRE_{fm} (HC-22) que apresentou apenas o gene *esp_{fm}*. Já os isolados de 2010 quando comparados aos de 2009 apresentaram um maior número de fatores de virulência. A maior parte dos enterococos isolados nos meses de julho e agosto de 2010 apresentou genes *agg* e *gel*, além dos genes *acm* e *esp_{fm}*, sendo, provavelmente, mais virulentos, do que os isolados em 2009 (Apêndice A). Desta forma, os enterococos estudados possuem fatores de virulência importantes na adesão e invasão do hospedeiro. A presença em especial do gene *esp* em todos *E. faecium* analisados neste estudo, mostra sua importância na aderência inicial da bactéria e formação de biofilme. Portanto, os enterococos isolados nos 2 hospitais (HCFMRP-USP e SCMRP) em estudo mostraram importantes fatores de virulência relacionados com a adesão e capacidade para causar infecção em hospedeiros.

Camargo, Gilmore e Darini (2006) realizaram um estudo que objetivou determinar a relação genética de *E. faecium* resistentes e sensíveis à vancomicina isolados de infecções humanas e amostras fecais no Brasil e comparar estes isolados com aqueles de animais domesticados. Isolados (n=56) foram classificados por MLST e avaliados pelo perfil de virulência. O gene *acm* foi detectado em 98% dos isolados, porcentagem bastante elevada, consistente com o resultado observado no presente estudo.

Billstrom e colaboradores (2008) realizaram estudo com o intuito de determinar a ocorrência de sete determinantes de virulência em isolados clínicos de *E. faecium*, de culturas de sangue, por um período de 6 anos e investigar possíveis correlações entre virulência e resistência a antibiótico. Estes pesquisadores mostraram que o gene *esp* foi encontrado em 56% dos isolados e o gene *hyl* em 4%. Além disso, eles mostraram também que a grande maioria dos isolados com o gene *esp* foi resistente à ampicilina, ciprofloxacino e imipenem. Segundo Lund, Billstrom e Edlund (2006) uma possível explicação para a forte correlação entre a presença do gene *esp* e a resistência antimicrobiana pode ser devido à alta frequência de conjugação observada em isolados que têm gene *esp* comparados com aqueles que não possuem o referido gene.

Fallico e colaboradores (2011) caracterizaram, por PCR, 50 VREs e 23 *E. faecium* sensíveis à vancomicina de um hospital italiano, quanto à presença do gene *esp* e de genes responsáveis pela resistência aos glicopeptídeos. Destes 50 VREs, 49 apresentaram o gene *vanA* e apenas uma linhagem apresentou o gene *vanB*. Já com relação à presença do gene *esp*, 73% e 43% dos VREs e VSEs apresentavam o referido gene, respectivamente. Outra literatura pesquisada foi a de Panesso e colaboradores (2010), os quais realizaram um estudo

multicêntrico de 2006-2008 para avaliar a epidemiologia molecular de enterococos em 4 países da América do Sul (Colômbia, Equador, Peru e Venezuela). A genotipagem por PFGE e MLST foi realizada em todos os VRE_{fm} e a pesquisa da presença dos genes *esp* e *hyl* também foi realizada. Dos 723 enterococos isolados, *E. faecalis* foi o mais comum (78%). Resistência à vancomicina foi detectada em 6% dos isolados (74% dos quais foram *E. faecium*). Dentre os isolados de VRE_{fm}, os genes *esp* e *hyl* foram detectados em 69% e 23% dos isolados, respectivamente. Vale ressaltar que, apenas a presença do gene de virulência específico, não significa que este gene está necessariamente sendo expresso, portanto, são necessários maiores estudos para determinar se realmente o gene está sendo expresso. Palazzo e colaboradores (2011) caracterizaram VREs isolados durante um surto que ocorreu em um hospital universitário brasileiro (HC-UNICAMP) em 2007 e foi verificado que todos VREs apresentaram genes *acm*, *esp* e *hyl* e nenhum deles apresentou genes *cyl*, *agg* e *gel*. Portanto, mediante o exposto, pode-se observar que foi detectado em alguns estudos (BILLSTROM et al., 2008; PALAZZO et al., 2011; PANESSO et al., 2010) a presença dos genes *esp*, *acm* e *hyl* nos VRE_{fm} estudados, já no presente estudo houve a predominância dos genes *acm* e *esp* nos *E. faecium* em análise, no entanto, nenhum dos isolados apresentou gene *hyl*. Portanto, o presente trabalho mostra que as linhagens de VREs isoladas dos hospitais em estudo, têm adquirido diversos determinantes de virulência e resistência, aumentando a habilidade para sobreviver e causar doenças em hospitais.

Além da pesquisa dos genes determinantes de virulência, foi realizado o estudo epidemiológico por PFGE dos *E. faecium* isolados nos hospitais de Ribeirão Preto.

O método de tipagem molecular PFGE é amplamente utilizado com o propósito de analisar o DNA genômico bacteriano, possibilitando alta diferenciação das linhagens, sendo por isso considerada o “padrão ouro” para análise de surtos hospitalares (HOMAN et al., 2002).

Os perfis de macrorrestrição do DNA genômico dos *E. faecium* isolados do HCFMRP e da SCMRP foram caracterizados por PFGE após clivagem com a enzima *SmaI*. A análise do dendrograma (Figura 7) gerado pelo programa *Bionumerics* mostrou que havia 4 perfis clonais predominantes (A, D, F, H), considerando que isolados com similaridade genômica superior a 90% são do mesmo tipo clonal. Desta forma, ocorreram disseminações clonais de enterococos com perfis de PFGE (F, G, H, L1 e N) em 2008, sendo estes isolados obtidos a partir da cultura de vigilância de pacientes colonizados da Unidade da Hematologia. Em 2009, os perfis de PFGE L, F, G e H continuaram sendo encontrados em VREs isolados tanto de

colonização quanto de infecção de pacientes de diferentes clínicas (Apêndice A e Figura 7), mostrando a disseminação destas linhagens, com estes perfis de PFGE, no referido hospital.

Em períodos específicos de 2009, predominaram os perfis de PFGE (D, F, H, H1, I) em pacientes situados principalmente nas unidades da Hematologia, Imunologia, CTI pediátrico e Berçário e, por fim, em 2010, ocorreu a disseminação clonal de enterococos com perfil A de PFGE, sendo isolados tanto de colonização como de infecções e os pacientes estavam internados em clínicas diferentes.

O Apêndice A mostra os dados dos VREs por ordem cronológica. Ao fazer uma análise global dos isolados mostrados no Apêndice A, observa-se uma heterogeneidade dos perfis de PFGE ao longo do tempo, porém, ao se realizar a análise por períodos específicos, foi observada a predominância de determinados perfis de PFGE em clínicas específicas. A análise dos dados do Apêndice A também permite inferir que a predominância de determinados perfis de PFGE em pacientes colonizados de clínicas específicas em 2009, como por exemplo, Imunologia, Gastroenterologia e Berçário, pode ter ocorrido devido a casos de infecção por VRE nas referidas clínicas. Sendo assim, a CCIH instaurou cultura de vigilância nestes ambientes, determinando a presença de pacientes colonizados por VRE. O pensamento inverso também é válido, predominância de determinados perfis de PFGE em pacientes infectados, pode ter ocorrido devido a casos de pacientes colonizados, sugerindo habilidade de isolados intestinais atuarem como patógenos, dependendo das características imunológicas de cada paciente, sendo maior a probabilidade disto acontecer em pacientes imunocomprometidos. No entanto, não se pode extrapolar esta hipótese para os isolados de 2008 e 2010, pois os VREs isolados de casos de infecção em 2008 não estavam disponíveis nos bancos de bactérias do HCFMRP-USP e os VREs isolados em 2010 não apresentaram esta correlação entre perfil de PFGE e colonização/infecção.

Apesar dos *VRE_{fm}* terem sido isolados por um período extenso (2008-2010), o método de tipagem molecular por PFGE conseguiu mostrar resultado consistente e confiável, pois pela análise do dendrograma (Figura 7) foi observado que havia ocorrido disseminações clonais com determinados perfis de PFGE durante períodos curtos (meses) nestes 3 anos. Por exemplo, no período de abril a julho de 2009, ocorreu disseminação clonal dos enterococos com perfis (D, F e I) de PFGE; já no período de agosto a novembro de 2009, ocorreu disseminação clonal dos enterococos com perfil (H e H1) de PFGE, portanto, o fato de ter havido o isolamento de diferentes perfis de PFGE em períodos curtos específicos facilitou a interpretação dos resultados da PFGE. Alguns estudos mostraram que *E. faecium* VanA isolados no Brasil apresentam diferentes perfis de PFGE, indicando que diversas linhagens

estão envolvidas em infecção e colonização de pacientes (ZANELLA et al., 2003; CAMARGO et al., 2004), como também pôde ser observado no presente estudo.

Outro fato interessante observado foi que a análise da PFGE dos primeiros *VRE_{fm}* (HC02MI-61, HC10F-62, HC46F-63, HC930U-64, HCVRE-65) isolados no HCFMRP-USP, em meados de 2005/2006, mostrou perfil de PFGE (M, M1 e M2) diferente da maioria dos isolados, não ocorrendo estes perfis de PFGE em isolados posteriores. Desta forma, estes primeiros isolados de *VRE_{fm}* não estão relacionados com a disseminação de VRE no HCFMRP-USP, não podendo ser detectado o ancestral comum entre os isolados estudados.

D'AZEVEDO e colaboradores (2008) realizaram estudo para avaliar a relação genética de VREs isolados em um hospital de ensino brasileiro, localizado em São Paulo, após oito anos de seu primeiro isolamento. Foram analisados 37 isolados de VREs obtidos de 81 culturas de vigilância de pacientes admitidos nas 4 maiores Unidades de Tratamento Intensivo, em Fevereiro de 2006. Foram observados cinco grupos clonais distintos entre os *VRE_{fm}* por PFGE. Todos esses clones foram diferentes do primeiro clone de VRE isolado oito anos atrás no mesmo hospital, como também foi verificado no presente estudo.

Foi determinado que os isolados com similaridade genômica superior a 90% seriam do mesmo tipo clonal, pois foi observada, pela análise da literatura, alta taxa de polimorfismos entre os enterococos e grande variabilidade na definição do ponto de corte na interpretação dos resultados de PFGE. Morrison e colaboradores (1999) estudaram o polimorfismo no padrão de bandas de DNA exibido por 30 *VRE_{fm}* isolados de uma unidade renal por um período de 11 meses. Estes 30 isolados de pacientes diferentes foram analisados por PFGE e resultou em 17 padrões de bandas que formaram 4 grupos distintos com similaridade de 82%. Estes pesquisadores mostraram que há um alto polimorfismo nos padrões de bandas de DNA entre os *VRE_{fm}*.

A análise de PFGE deste estudo também mostrou que alguns isolados da SCMRP (SCM-25, SCM-38, SCM-39, SCM-56) apresentaram alta similaridade genômica com os do HCFMRP-USP (Apêndice A e Figura 7), havendo evidências de transmissão horizontal entre hospitais, necessitando assim de maiores investigações sobre a possibilidade de disseminação clonal entre os referidos hospitais, através de pacientes que possivelmente possam ter sido internados em ambos os hospitais, ou transferidos de um hospital para o outro, ou mesmo de funcionários que trabalham em ambas as instituições.

Adicionalmente aos dados apresentados deste estudo, 2 ou mais *VRE_{fm}* isolados do mesmo paciente, foram investigados pelo perfil de sensibilidade aos antibióticos, perfil de PFGE e presença de genes de virulência. Independentemente do espécime clínico investigado

ou se os isolados fossem de infecção ou colonização não houve diferença entre VREs de mesmos pacientes. Portanto, VREs do mesmo clone tanto infectaram quanto colonizaram pacientes do HCFMRP-USP (dados não mostrados).

Além da caracterização molecular por PFGE dos *E. faecium* isolados nos 2 hospitais de Ribeirão Preto, também foi realizado estudo epidemiológico por MLST de 31 *E. faecium* dentre os 53 VRE*fm* identificados. A tipagem por MLST foi desenvolvida para investigações epidemiológicas globais e a longo prazo, pois se baseia na análise da sequência de genes *housekeeping*, altamente conservados. A emergência global de VRE*fm* tem sido caracterizada pela disseminação clonal de *E. faecium* pertencentes, predominantemente, ao complexo clonal 17 (CC17) (TOP; WILLEMS; BONTEN, 2008).

Os resultados obtidos por MLST de 31 VRE*fm* analisados neste estudo (Figura 8 e Tabela 7), mostraram 9 STs diferentes, todos pertencentes ao CC17, com exceção do ST658, que era *singleton* e não estava inserido no CC17. Ainda, com relação aos 9 STs encontrados, 5 deles eram inéditos (656, 657, 658, 659 e 660) e foram descritos pela primeira vez neste estudo.

Dentre os 5 primeiros *E. faecium* isolados no HCFMRP-USP em meados de 2005 e 2006, 3 apresentaram ST78, o qual é SLV do ST17 e os outros 2 *E. faecium* apresentaram STs (659 e 660) que eram SLV do ST78. O ST78 não foi detectado em anos posteriores, mas foi observado que a maioria dos isolados de 2008-2010, apresentou variações genéticas, apresentando-se como DLV ou TLV do ST78, gerando os STs 656, 412 e 478, mostrando assim, rápida evolução genética destes isolados durante período estudado. Estes resultados sugerem que, os isolados deste estudo, são ou descendentes diretos ou têm evoluído de um mesmo ancestral comum, o que não foi observado pelos resultados de PFGE. Vale ressaltar, portanto, a predominância dos STs derivados de variações genéticas a partir do ST78 nas linhagens estudadas. Um único VRE*fm* (HC-07), isolado em outubro de 2008 de paciente colonizado da Unidade de Hematologia do HCFMRP-USP, apresentou ST17, o qual não se disseminou nos hospitais estudados. Linhagens pertencentes ao ST17 são consideradas epidêmicas, sendo encontradas em surtos hospitalares e infecções clínicas em diferentes países, incluindo Reino Unido, Austrália, Estados Unidos (GALLOWAY-PEÑA et al., 2009), França, Itália (FALLICO et al., 2011), Holanda, Espanha (NEBREDÁ et al., 2007; VALDEZATE et al., 2008), Portugal (MATO et al., 2009), Alemanha (WERNER et al., 2008), Grécia, entre outros, sendo considerado o ST fundador do CC17, cujas linhagens pertencentes a este complexo clonal, são distribuídas mundialmente.

De acordo com diagrama de similaridade genética construído a partir dos dados de MLST (Figura 8), os principais STs identificados nos *VRE_{fm}* estudados, no período de 2008-2010, foram: ST412, que foi encontrado em 38,7% (n=12) dos isolados e ST478, que foi detectado em 32,3% (n=10) dos isolados (Figura 8, Tabela 7 e Apêndice A). Os STs 412 e 478, ambos pertencentes ao CC17, predominaram ao longo do período do estudo, sendo identificados nas várias enfermarias dos 2 hospitais estudados. Por exemplo, no período de abril a julho de 2009 foram identificados STs 412 e 478 nas linhagens estudadas, isoladas de pacientes colonizados e infectados de diferentes clínicas (Apêndice A). Já no período de agosto a novembro de 2009, foram identificados *VRE_{fm}* com ST412, isolados de pacientes com infecção e colonizados nas Unidades de Neonatologia, Berçário e Imunologia do HCFMRP-USP, bem como isolados de pacientes da SCMRP, mostrando provável disseminação inter-hospitalar de enterococos geneticamente relacionados neste período do estudo. Esta similaridade genética entre linhagens do HCFMRP-USP e SCMRP sugere mais uma vez transmissão horizontal entre hospitais, através de deslocamentos inter-hospitalar de pacientes ou mesmo de funcionários que trabalham em ambas as instituições. A habilidade destes enterococos, com STs específicos, em persistir dentro de determinadas enfermarias e disseminar entre hospitais, sugere que estes isolados têm se adaptado extremamente bem ao ambiente hospitalar. Panesso e colaboradores (2010) realizaram um estudo multicêntrico de 2006-2008 para avaliar a epidemiologia molecular de enterococos em 4 países da América do Sul (Colômbia, Equador, Peru e Venezuela). A genotipagem por MLST foi realizada para isolados representativos de cada perfil de PFGE, mostrando que o ST412 foi o mais frequente entre estes VREs isolados de países da América do Sul, coerente com os resultados do presente estudo, indicando a presença de linhagens associadas ao ambiente hospitalar.

No Brasil, a maioria dos *VRE_{fm}* envolvidos em surtos relatados recentemente, não eram relacionados com CC17. Linhagens de *VRE_{fm}* pertencentes ao CC17 foram identificadas em casos esporádicos no Brasil (ST50, ST115, ST97, ST164) e ST17 em dois isolados durante primeiro surto de VRE VanA no hospital Santa Marcelina de São Paulo em 1998, como também em dois isolados do Rio de Janeiro, um em 2000 e o outro em 2001, na Clínica São Vicente (CAMARGO; GILMORE; DARINI, 2006). Dessa forma, a grande maioria dos *VRE_{fm}* relacionados com surtos isolados até pouco tempo no Brasil apresentava ST114, o qual não está inserido no complexo clonal CC17 (CAMARGO; GILMORE; DARINI, 2006; TITZE-DE-ALMEIDA et al., 2006). No entanto, Palazzo e colaboradores (2011) caracterizaram 21 *VRE_{fm}* isolados durante surto que ocorreu no Hospital Universitário da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas (HC-UNICAMP) em 2007,

bem como dois outros enterococos, um sensível e outro resistente, isolados do mesmo paciente num período de uma semana, no Hospital Boldrini, um hospital pediátrico onco-hematológico, também localizado em Campinas. Resultados obtidos por MLST mostraram que STs novos foram identificados: ST447, 448 e 478. O ST478 era DLV do ST203, o qual foi descrito em isolados clínicos da Coreia (SUP OH et al., 2005), Alemanha, China, Japão e Dinamarca. Dessa forma, apesar destes três STs diferentes terem sido identificados, todas as linhagens pertenciam ao complexo clonal 17, mostrando assim mudança no perfil clonal das linhagens brasileiras caracterizadas por MLST, as quais passaram a estar inclusas no CC17, o que não acontecia até pouco tempo, cujas linhagens estavam fora do CC17.

O presente trabalho, mostrou que ST478 continua a aparecer entre VREs isolados do Brasil, confirmando assim, as mudanças nos perfis de VRE*fm* causando surtos no Brasil, mostrando que linhagens de VRE*fm* pertencentes ao CC17 estão começando a predominar no Brasil, fato que já era verificado em outros países.

Um fato interessante observado também foi que, ao consultar o banco de dados de MLST de *E. faecium* para se verificar quais STs estavam presentes no Brasil, foi observado que havia informações depositadas sobre VREs isolados de pacientes hospitalizados de São Paulo, em 2009, em que o ST412 predominou nesta coleção bacteriana, como também um isolado apresentou ST478 (dados ainda não publicados). Dessa forma, mais uma vez podendo inferir que o CC17 está predominando entre as linhagens isoladas, mais recentemente, no Brasil, sendo detectados os STs 412 e 478 entre VREs isolados em hospitais do Brasil.

Após determinação dos STs das linhagens estudadas, também se realizou comparação das linhagens do presente estudo com dados de 2.112 *E. faecium* de diferentes origens e regiões geográficas mundiais, disponíveis no banco de dados internacional de MLST (<http://www.mlst.net>). Pela primeira vez foi verificada, com a inclusão dos STs das linhagens do presente estudo, maior frequência do ST78 (n=194) no banco de dados, cuja predominância era, até então, do ST17 (n=191). Sendo assim, pode-se observar que está ocorrendo aumento da distribuição de enterococos apresentando ST78 mundialmente. De acordo com estas informações depositadas no banco de dados de MLST de *E. faecium*, vários países já detectaram enterococos com ST78 em pacientes hospitalizados, são eles: Itália (STAMPONE et al., 2005; FALLICO et al., 2011), Áustria, Alemanha, Coreia (KO SOO et al., 2005), Hungria, Holanda, China, Japão (MATSUSHIMA et al., 2011), Portugal, Taiwan (HSIEH et al., 2011), Letônia (LVA) e agora sendo detectado no Brasil. Portanto, o ST78 está sendo relatado pela primeira vez no Brasil, em linhagens do presente estudo. Soo Ko e colaboradores (2005) caracterizaram 98 VRE*fm*, isolados de 4 hospitais de atenção terciária

na Coreia, por métodos de tipagem molecular, verificando que resultados de MLST mostraram 9 STs, os quais todos pertenciam ao complexo clonal 78. Stampone e colaboradores (2005) também demonstraram que o aumento no número de infecções da corrente sanguínea causadas por VRE, na Itália, devia ser devido ao aparecimento e disseminação de clone de *VREfm*, resistente a múltiplas drogas, adaptado ao ambiente hospitalar e que apresentava ST78. Fallico e colaboradores (2011) caracterizaram 50 VREs isolados de um hospital italiano e verificaram que o ST78 foi predominante entre os isolados. Em 2010, Hsieh e colaboradores realizaram a tipagem molecular por MLST de 29 *E. faecium*, os quais foram isolados de pacientes do hospital universitário de Taiwan, de maio 2007 a janeiro 2008 e mostraram que 82,8% dos isolados apresentavam ST78, que pertence ao CC17.

O CC17 representa grupo de linhagens epidêmicas de *E. faecium* que têm disseminado mundialmente, tendo como provável fundador o ST17. As linhagens pertencentes ao CC17 são caracterizadas por resistência a quinolonas e ampicilina e por possuírem o gene *esp* que codifica proteína de superfície, a qual está associada à virulência da bactéria. Portanto, a presença do gene *esp* é sugestiva de epidemicidade de isolados de *VREfm* (TOP; WILLEMS; BONTEN, 2008), características estas que foram detectadas nos isolados do presente estudo. Todos *VREfm* dos dois hospitais de Ribeirão Preto que tiveram analisados seus perfis de sensibilidade a antimicrobianos, mostraram resistência à ampicilina e levofloxacino, como também todos *E. faecium* analisados possuíam gene *esp*. Outros pesquisadores, Rice e colaboradores (2009) e Willems e colaboradores (2001), associaram ao CC17, além do genes *esp*, também o gene *hyl*, mas em discordância com estes estudos, nenhum apresentou gene *hyl*, embora todos *VREfm* isolados dos 2 hospitais de Ribeirão apresentaram o gene *esp*.

Sendo assim, através da aquisição de múltiplos mecanismos adaptativos, incluindo as aquisições sequenciais de genes de resistência a antimicrobianos e genes de virulência, enterococos vão adquirindo vantagens seletivas, possibilitando sua adaptação ao ambiente hospitalar. Dessa forma, permitindo cada vez mais aquisição de novas formas de adaptações e diversificação genética, resultando em grupo de genótipos fortemente relacionados como visto no complexo clonal 17 (CC17), sendo todos descendentes do genótipo fundador, ST17, e bem adaptados ao ambiente hospitalar (LEAVIS; BONTEN; WILLEMS, 2006).

Portanto, o presente estudo mostra que enterococos são microrganismos com notável habilidade para adaptar ao ambiente hospitalar e adquirir determinantes de resistência a antibióticos. Desta forma, o presente trabalho vem confirmar que *VREfm* isolados em recentes anos no Brasil, pertencem ao CC17 e possuem determinantes genéticos, como genes de virulência e de resistência a antimicrobianos, contribuindo como vantagem seletiva para

estes microrganismos na adaptação ao ambiente hospitalar. Vale ressaltar que, aliado a isto, o fato destes enterococos também possuírem resistência a outros antimicrobianos, como ampicilina e levofloxacino, todos estes fatores juntos facilitam a disseminação de VRE no ambiente hospitalar. Outra forma de adaptação genética apresentada pelos enterococos do estudo foi que os primeiros enterococos isolados no HCFMRP-USP possuíam o transposon *TnI546* intacto, no entanto, isto não foi observado em isolados posteriores, os quais foram adquirindo sequências de inserção e deleções, mostrando polimorfismos entre variantes do *TnI546*.

6. Conclusões

- A resistência à vancomicina dos enterococos estudados é devido à presença do gene *vanA*;
- Todos VRE*fm* foram sensíveis à daptomicina, pelo Etest;
- Os elementos VanA envolvidos na resistência à vancomicina são diferentes no início dos casos de colonização/infecção por VRE quando comparados aos isolados em 2010;
- A integridade do transposon envolvido na resistência à vancomicina foi verificada apenas nos primeiros isolados de VRE no HCFMRP-USP;
- A maioria dos VRE*fm* do estudo apresentaram as mesmas alterações do elemento VanA, mostrando deleção da extremidade esquerda do transposon e inserção da IS1251 entre genes *vanS* e *vanH*;
- Os VRE*fm* do estudo apresentaram um maior número de genes de virulência em 2010 quando comparados aos isolados de 2008 e 2009;
- Ocorreram disseminações clonais com determinados perfis de PFGE em períodos específicos nos hospitais em estudo, não permitindo que se determinasse ancestral comum por PFGE;
- Os resultados obtidos por MLST mostraram 9 STs diferentes, todos pertencentes ao CC17, com exceção do ST658, mostrando que linhagens de VRE*fm* pertencentes ao CC17 estão começando a predominar no Brasil, como já acontece em outros países;
- O ST78, que está emergindo mundialmente, foi relatado pela primeira vez no Brasil em linhagens do presente estudo;
- Pelos perfis de PFGE foi observada similaridade genômica entre VRE*fm* isolados dos dois hospitais envolvidos no estudo, o que foi confirmado pelos resultados de MLST;
- Resultados de MLST sugerem que VRE*fm* isolados em anos posteriores (2008-2010) possam ser descendentes diretos dos cinco primeiros isolados de VRE*fm* no HCFMRP em meados de 2005/2006 ou possam ter evoluído do mesmo ancestral comum.

7. Referências

ALLINGTON, D. R.; RIVEY, M. P. Quinupristin/dalfopristin: a therapeutic review. **Clinical Therapeutics**, v.23, p.24-44, 2001.

ALMEIDA, R. T.; FILHO, M. R.; SILVEIRA, C. A. N.; RODRIGUES, I. P.; FILHO, J. E.; NASCIMENTO, R. S.; FERREIRA, R. F.; MORAES, L. M. P.; BOELEN, H.; BELKUM, A. V.; FELIPE, M. S. S. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Enterococci* recovered from Brazilian intensive care units. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.8, n.3, p.197-205, 2004.

ARIAS, C. A.; CONTRERAS, G. A.; MURRAY, B. E. Management of multi-drug resistant enterococcal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v.6, p.555-62, 2010.

ARIAS, C. A.; PANESSO, D.; SINGH, K. V.; RICE, L. B.; MURRAY, B. E. Cotransfer of antibiotic resistance genes and a *hylEfm*-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.4240-4246, 2009.

ARTHUR, M.; DEPARDIEU, F.; CABANIE, L.; REYNOLDS, P.; COURVALIN, P. Requirement of the VanY and VanX D,D-peptidases for glycopeptide resistance in enterococci. **Molecular Microbiology**, v.30, n.4, p.819-830, 1998.

ARTHUR, M.; MOLINAS, C.; COURVALIN, P. Sequence of the *vanY* gene required for production of a vancomycin-inducible D,D-carboxypeptidase in *Enterococcus faecium* BM4147. **Gene**, v.120, n.1, p.111-114, 1992.

ARTHUR, M.; MOLINAS, C.; DEPARDIEU, F.; COURVALIN, P. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.1, p.117-127, 1993.

ARTHUR, M.; QUINTILIANI, R. Regulation of VanA- and VanB-Type Glycopeptide Resistance in Enterococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.2, p.375-381, 2001.

ARTHUR, M.; REYNOLDS, P.; COURVALIN, P. Glycopeptide resistance in enterococci. **Trends in Microbiology**, v.4, n.10, p.401-407, 1996.

BIAVASCO, F.; FOGLIA, G.; PAOLETTI, C.; ZANDRI, G.; MAGI, G.; GUAGLIANONE, E.; SUNDSFJORD, A.; PRUZZO, C.; DONELLI, G.; FACINELLI, B. VanA-Type Enterococci from Humans, Animals, and Food: Species Distribution, Population Structure, Tn1546 Typing and Location, and Virulence Determinants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.10, p.3307-3319, 2007.

BIENDO, M.; ADJIDÉ, C.; CASTELAIN, S.; BELMEKKI, M.; ROUSSEAU, F.; SLAMA, M.; GANRY, O.; SCHMIT, J. L.; EB, F. Molecular Characterization of Glycopeptide-Resistant Enterococci from Hospitals of the Picardy Region (France). **International Journal of Microbiology**, 2010.

BILLSSTROM, H.; LUND, B.; SULLIVAN, A.; NORD, C. E. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.32, p.38-49, 2008.

BOLANO, A.; STINCHI, S.; PREZIOSI, R.; BISTONI, F.; ALLEGRUCCI, M.; BALDELLI, F.; MARTINI, A.; CARDINALI, G. Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research**, v.1, p.221-224, 2001.

BOYD, D. A.; WILLEY, B. M.; FAWCETT, D.; GILLANI, N.; MULVEY, M. R. Molecular Characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with Low-Level Vancomycin Resistance Harboring a Novel D-Ala-D-Ser Gene Cluster, *vanL*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n.7, p. 2667–2672, 2008.

BUGG, T. D. H.; WRIGHT, G. D.; DUTKA-MALEN, S.; ARTHUR, M.; COURVALIN, P.; WALSH, C. T. Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. **Biochemistry**, v.30, p.10408–10415, 1991.

CAMARGO, I. L. B. C. **Frequência e estabilidade de elementos de inserção em enterococos resistentes à vancomicina isolados no Brasil**. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2002.

CAMARGO, I. L. B. C. **Estudo dos fatores de virulência em *Enterococcus* sp. isolados no Brasil**. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2005.

CAMARGO, I. L. B. C.; DEL PELOSO P. F.; DA COSTA, C. F.; GOLDMAN, G. H.; DARINI, A. L. C. Identification of an unusual VanA element in glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* in Brazil following international transfer of a bone marrow transplant patient. **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.767-770, 2004.

CAMARGO, I. L. B. C.; GILMORE, M. S.; DARINI, A. L. C. Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brazil. **Clinical Microbiology Infectious**, v.12, p.1123-1130, 2006.

CANTÓN, R.; GARBAJOSA, P. R.; CHAVES, R. L.; JOHNSON, A. P. A potential role for daptomycin in enterococcal infections: what is the evidence? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, p.1126–1136, 2010.

CHAMBERS, H. F. Antimicrobianos: inibidores da síntese protéica e antibacterianos diversos. In: GILMAN, A. G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda, 2003. cap.47, p.929-953.

CHOW, J. W. ; THAL, L. A.; PERRI, M. B. ; VAZQUEZ, J. A. ; DONABEDIAN, S. M. ; CLEWELL, D. B. ; ZERVOS, M. J. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.37, p.2473–2477, 1993.

CLSI – **CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE**. Zone Diameter and MIC Interpretive Standards for *Enterococcus spp.* v. 29, n. 3, Approved standard M2 M7.2009.

CORDEIRO, J. C. R.; SILBERT, S.; REIS, A. O.; SADER, H. S. Inter-hospital dissemination of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecalis* in Brazil. **Clin. infect. Dis.**, v.10, p.260-262, 2004.

COURVALIN, P. Genetics of glycopeptide resistance in gram-positive pathogens. **Int. J. Med. Microbiol**, v.294, p.479–486, 2005.

COURVALIN, P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, p.25–34, 2006.

CUI, L.; IWAMOTO, A.; LIAN, JQ.; NEOH, HM.; MARUYAMA, T.; HORIKAWA, Y.; HIRAMATSU, K. Novel Mechanism of Antibiotic Resistance Originating In Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.2, p.428-438, 2006.

DALLA COSTA, L. M.; REYNOLDS, P. E.; SOUZA, H. A. P. H. M.; SOUZA, D. C.; PALEPOU, MF. I.; WOODFORD, N. Characterization of a divergent /van/D-type resistance element from the first glycopeptide-resistant strain of *Enterococcus faecium* /isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, p.3444-46, 2000.

DARINI, A. L. C.; PALEPOU, M. F.; WOODFORD, N. Effects of the movement of insertion sequences on the structure of VanA glycopeptide resistance elements in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.44, n.5, p.1362-1364, 2000.

D'AZEVEDO, P. A.; FURTADO, G. H. C.; MEDEIROS, E. A. S.; SANTIAGO, K. A.; SILBERT, S.; PIGNATARI, A. C. C. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci strains eight years apart from its first isolation in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.50, n.4, p.195-198, 2008.

D'AZEVEDO, P. A.; KACMAN, S. B.; SCHMALFUSS, T.; SILVA, A.; RODRIGUES, L.F. Primeiro caso de *Enterococcus* resistente a vancomicina isolado em Porto Alegre, RS. **J. bras. Pat.**, 36: 258, 2000.

D'COSTA, V. M.; MCGRANN, K. M.; HUGHES, D. W.; WRIGHT, G. D. Sampling the antibiotic resistome. **Science**, v.311, p.374-377, 2006.

DUNCAN, R. A. et al. Linezolid-resistant vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection in a liver transplant recipient intolerant of quinupristin/dalfopristin and treated with daptomycin. In: Abstracts of the 39th (2001) **Infectious Diseases Society of America (IDSA)** Meeting; 2001 October 25-28; San Francisco, CA (Abstract 537).

DUNNY, G. M.; FUNK, C.; ADSIT, J. Direct stimulation of transfer of antibiotic resistance by sex pheromones in *Streptococcus faecalis*. **Plasmid**, v.6, p.270-278, 1981.

DUTKA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Detection of glycopeptides resistance genotype and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.24-27, 1995.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.4, p.1628-1635, 2001.

ELIOPOULOS, G. M. Microbiology of drugs for treating multiply drug-resistant gram-positive bacteria. **The Journal of Infection**, v.59, p.17-24, 2009.

FALLICO, L.; BOLDRIN, C.; GROSSATO, A.; FRANCHIN, E.; DE CANALE, E.; TOMMASINI, T.; PARISI, S. G.; MANGANELLI, R.; PALÙ, G. Molecular epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates from an Italian hospital. **Infection**, v.39, n.2, p.127-133, 2011.

FRAHER, M. H.; CORCORAN, G. D.; CREAGH, S.; FEENEY, E. Daptomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a patient with no prior exposure to daptomycin. **The Journal of Hospital Infection**, v.65, p.376-378, 2007.

FEIL, E. J.; LI, B. C.; AANENSEN, D. M.; HANAGE, W. P.; SPRATT, B. G. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. **Journal of Bacteriology**, v.186, p.1518-1530, 2004.

FREITAS, A. R.; TEDIM, A. P.; NOVAIS, C.; RUIZ-GARBAJOSA, P.; WERNER, G.; LAVERDE-GOMEZ, J. A.; CANTÓN, R.; PEIXE, L.; BAQUERO, F.; COQUE, T. M. Global spread of the hylefm colonization virulence gene in megaplasms of the *Enterococcus faecium* CC17 polyclonal subcluster. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.2660-2665, 2010.

FUJITA, N.; YOSHIMURA, M.; KOMORI, T.; TANIMOTO, K.; IKE, Y. First report of the isolation of high-level vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from a patient in Japan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, p.2150, 1998.

FURTADO, G. H. C.; MARTINS, S. T.; COUTINHO, A. P.; SOARES, G. M. M.; WEY, S. B.; MEDEIROS, E. A. S. Incidence of vancomycin resistant *Enterococcus* at a university hospital in Brazil. **Revista Saúde pública**. (S. Paulo), v.39, p.41-46, 2005.

GALLOWAY-PEÑA, J. R.; NALLAPAREDDY, S. R.; ARIAS, C. A.; ELIOPOULOS, G. M.; MURRAY, B. E. Analysis of Clonality and Antibiotic Resistance among Early Clinical Isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, v.200, p.1566-1573, 2009.

GONZALES, R. D.; SCHRECKENBERGER, P. C.; GRAHAM, M. B.; KELKAR, S.; DENBESTEN, K.; QUINN, J. P. Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. **Lancet**, v.357, p.1179, 2001.

HANCOCK, L. E.; PEREGO, M. The *Enterococcus faecalis* fsr two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.17, p.5629-5639, 2004.

HANDWERGER, S.; SKOBLE, J.; DISCOTTO, L. F.; PUCCI, M. J. Heterogeneity of the vanA gene cluster in clinical isolates of enterococci from the northeastern United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, n.2, p.362-368, 1995.

HIDRON, A. I.; EDWARDS, J. R.; PATEL, J.; HORAN, T. C.; SIEVERT, D. M.; POLLOCK, D. A.; FRIDKIN, S. K.; NATIONAL HEALTHCARE SAFETY NETWORK TEAM; PARTICIPATING NATIONAL HEALTHCARE SAFETY NETWORK FACILITIES. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.29, p.996-1011, 2008.

HOMAN, W. L.; TRIBE, D.; POZNANSKI, S.; LI, M.; HOGG, G.; SPALBURG, E.; VAN EMBDEN, J. D. A.; WILLEMS, R. J. L. Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.6, p.1963-1971, 2002.

HSIEH, Y. C.; LEE, W. S.; OU, T. Y.; HSUEH, P. R. Clonal spread of CC17 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with multilocus sequence type 78 (ST78) and a novel ST444 in Taiwan. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.29, p.25-30, 2010.

HUYCKE, M. M.; SPIEGEL, C. A.; GILMORE, M. S. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, p.1626-1634, 1991.

JENSEN, L. B.; AHRENS, P.; DONS, L.; JONES, R. N.; HAMMERUM, A. M.; AARESTRUP, F. M. Molecular Analysis of Tn1546 in *Enterococcus faecium* Isolated from Animals and Humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.2, p.437-442, 1998.

JOLLEY, K. A.; FEIL, E. J.; CHAN, M-S; MAIDEN, M. C. Sequence type analysis and recombinational tests (START). **Bioinformatics applications note**, v.17, p.1230-1231, 2001.

KANAFANI, Z. A.; FEDERSPIEL, J. J.; FOWLER, V. G. Jr. Infective endocarditis caused by daptomycin-resistant *Enterococcus faecalis*: a case report. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.39, p.75-77, 2007.

KAULFMANN, M. E. Pulse-Field Gel Electrophoresis. In: Woodford, N.; and Johnson, A. P. **Molecular bacteriology: protocols and clinical applications**. New Jersey: Humana Press, p.33-50, 1998.

KELESIDIS, T.; HUMPHRIES, R.; USLAN, D. Z.; PEGUES, D. A. Daptomycin Nonsusceptible Enterococci: An Emerging Challenge for Clinicians. **Clinical Infectious Diseases**, v.52, n.2, p.228-234, 2011.

KO, K. S.; BAEK, J. Y.; LEE, JY.; OH, W. S.; PECK, K. R.; LEE, N. Y.; LEE, W. G.; LEE, K.; SONG, JH. Molecular Characterization of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.5, p.2303-2306, 2005.

KOCH, S.; HUFNAGEL, M.; THEILACKER, C.; HUEBNER, J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. **Vaccine**, v.22, n.7, p.822-830, 2004.

LEAVIS, H. L.; BONTEN, M. J.; WILLEMS, R. J. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v.9, p.454-460, 2006.

LEAVIS, H.; TOP, J.; SHANKAR, N.; BORGES, K.; BONTEN, M.; VAN EMBDEN, J.; WILLEMS, R. J. L. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. **Journal of Bacteriology**, v.186, p.672-682, 2004.

LECLERCQ, R.; DERLOT, E.; DUVAL, J.; COURVALIN, P. Plasmid mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. **New England Journal of Medicine**, v.319, p.157-61, 1988.

LEDEBOER, N. A.; DAS, K.; EVELAND, M.; ROGER-DALBERT, C.; MAILLER, S.; CHATELLIER, S.; DUNNE, W. M. Evaluation of a Novel Chromogenic Agar Medium for Isolation and Differentiation of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.5, p.1556-1560, 2007.

LEENDERTSE, M.; HEIKENS, E.; WIJNANDS, L. M. Enterococcal surface protein transiently aggravates *Enterococcus faecium*-induced urinary tract infection in mice. **Journal Infectious Diseases**, v.200, p.1162-1165, 2009.

LESHO E. P.; WORTMANN, G. W.; CRAFT, D.; MORAN, K. A. De novo daptomycin nonsusceptibility in a clinical isolate. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.673, 2006.

LEWIS, J. S.; OWENS, A.; CADENA, J.; SABOL, K.; PATTERSON, J. E.; JORGENSEN, J. H. Emergence of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, p.1664-1665, 2005.

LONG, J. K.; CHOUEIRI, T. K.; HALL, G. S.; AVERY, R. K.; SEKERES, M. A. Daptomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a patient with acute myeloid leukemia. **Mayo Clinic Proceedings**, v.80, p.1215-1216, 2005.

LÓPEZ, M.; SÁENZ, Y.; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, M. J.; MARCO, F.; ROBREDO, B.; ROJO-BEZARES, B.; RUIZ-LARREA, F.; ZARAZAGA, M.; TORRES, C. Tn1546 structures and multilocus sequence typing of vanA-containing enterococci of animal, human and food origin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, p.1570-1575, 2010.

LUND, B.; BILLSTROM, H.; EDLUND, C. Increased conjugation frequencies in clinical *Enterococcus faecium* strains harbouring the enterococcal surface protein gene *esp*. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, p.588-591, 2006.

MALLI, E.; SPILIOPOULOU, I.; KOLONITSIOU, F.; KLAPSA, D.; GIANNITSIOTI, E.; PANTELIDI, K.; PRATTI, A.; PANOPOULOU, M.; GRAPSA, S.; ALEPOPOULOU, E.; NEONAKIS, I.; FRANTZIDOU, F.; ALEXIOU-DANIEL, S.; BAKOLA, D.; KOUTSIA-CAROUZOU, C.; MALAMOU-LADA, H.; ZERVA, L.; VLAHAKI, E.; KARTALIKTENIDOU, S.; ANASTASSIOU, E. D.; PETINAKI, E. In vitro activity of daptomycin against Gram-positive cocci: the first multicentre study in Greece. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.32, p.525-528, 2008.

MANNU, L.; PABA, A.; DAGA, E.; COMUNIAN, R.; ZANETTI, S.; DUPRÈ, I.; SECHI, L. A. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **International Journal Food Microbiology**, v.88, p.291-304, 2003.

MATO, R.; ALMEIDA, F.; PIRES, R.; RODRIGUES, P.; FERREIRA, T.; SANTOS-SANCHES, I. Assessment of high-level gentamicin and glycopeptide-resistant *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* clonal structure in a Portuguese hospital over a 3-year period. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.28, p.855-859, 2009.

MATSUSHIMA, A.; TAKAKURA, S.; YAMAMOTO, M.; MATSUMURA, Y.; SHIRANO, M.; NAGAO, M.; ITO, Y.; IINUMA, Y.; SHIMIZU, T.; FUJITA, N.; ICHIYAMA, S. Regional spread and control of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in Kyoto, Japan. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 2011.

MERMEL, L. A.; ALLON, M.; BOUZA, E.; CRAVEN, D. E.; FLYNN, P.; O'GRADY, N. P.; RAAD, I. I.; RIJNDERS, B. J. A.; SHERERTZ, R. J.; WARREN, D. K. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v.49, p.1-45, 2009.

MORETTI, M. L.; CARDOSO, L. G. O.; LEVY, C. E.; VON NOWAKOSKY, A.; BACHUR, L. F.; BRATFICH, O.; LEICHSENDRING, M. L.; FAGNANI, R.; DANTAS, S. M. P. E.; RESENDE, M. R.; TRABASSO, P. Controlling a vancomycin-resistant enterococci outbreak in a Brazilian teaching hospital. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.30, p.369-374, 2011.

MORRISON, D.; WOODFORD, N.; BARRETT, S. P.; SISSON, P.; COOKSON, B. D. DNA Banding Pattern Polymorphism in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* and Criteria for Defining Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.4, p.1084-1091, 1999.

MUNOZ-PRICE, L. S.; LOLANS, K.; QUINN, J. P. Emergence of resistance to daptomycin during treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* infection. **Clinical Infectious diseases**, v.41, n.4, p.565-566, 2005.

MURAIH, J. K.; PEARSON, A.; SILVERMAN, J.; PALMER, M. Oligomerization of daptomycin on membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1808, n.4, p.1154-1160, 2011.

NALLAPAREDDY, S. R.; SINGH, K. V.; MURRAY, B. E. Contribution of the collagen adhesin Acm to pathogenesis of *Enterococcus faecium* in experimental endocarditis. **Infection and Immunity**, v.76, p.4120-4128, 2008.

NEBRED, T.; OTEO, J.; ALDEA, C.; GARCÍA-ESTÉBANEZ, C.; GASTELU-ITURRI, J.; BAUTISTA, V.; GARCÍA-COBOS, S.; CAMPOS, J. Hospital dissemination of a clonal complex 17 vanB2-containing *Enterococcus faecium*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, n.4, p.806-807, 2007.

NOVAIS, C.; FREITAS, A. R.; SOUSA, J. C.; BAQUERO, F.; COQUE, T. M.; PEIXE, L. V. Diversity of Tn1546 and Its Role in the Dissemination of Vancomycin-Resistant Enterococci in Portugal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n.3, p.1001-1008, 2008.

NOVARTIS EUROPHARM Ltd. Cubicin (daptomycin) Summary of Product Characteristics, 2009.

NOVARTIS EUROPHARM Ltd. Cubicin (daptomycin) Summary of Product Characteristics, 2010.

OZAWA, Y.; TANIMOTO, K.; NOMURA, T.; YOSHINAGA, M.; ARAKAWA, Y.; IKE, Y. Vancomycin-resistant enterococci in humans and imported chickens in Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.6457-6461, 2002.

PALAZZO, I. C. V.; CAMARGO, I. L. B. C.; ZANELLA, R. C.; DARINI, A. L. C. Evaluation of clonality in enterococci isolated in Brazil carrying Tn1546-like elements associated with *vanA* plasmids. **Fems Microbiology Letters**, v.258, p.29-36, 2006.

PALAZZO, I. C. V.; PITONDO-SILVA, A.; LEVY, C. E.; DARINI, A. L. C. Changes in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing outbreaks in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, p.1-5, 2011.

PALEPOU, M. F.; ADEBIVI, A. M.; TREMLETT, C. H.; JENSEN, L. B.; WOODFORD, N. Molecular analysis of diverse elements mediating VanA glycopeptide resistance in enterococci. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v.42, n.5, p.605-612, 1998.

PALMER, K. L.; DANIEL, A.; HARDY, C.; SILVERMAN, J.; GILMORE, M. S. Genetic Basis for Daptomycin Resistance in Enterococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.7, p.3345-3356, 2011.

PANESSO, D.; REYES, J.; RINCÓN, S.; DÍAZ, L.; GALLOWAY-PEÑA, J.; ZURITA, J.; CARRILLO, C.; MERENTES, A.; GUZMÁN, M.; ADACHI, J. A.; MURRAY, B. E.; ARIAS, C. A. Molecular Epidemiology of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: a Prospective, Multicenter Study in South American Hospitals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.5, p.1562-1569, 2010.

PFALLER, M. A.; SADER H. S.; JONES, R. N. Evaluation of the in vitro activity of daptomycin against 19615 clinical isolates of Gram-positive cocci collected in North American hospitals (2002–2005). **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.57, p.459-465, 2007.

PITONDO-SILVA, A. **Tipagem molecular de *Escherichia coli* enteropatogênica por sequenciamento de *multilocus***. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2007. 188p.

POH, C. H.; OH, H. M. L.; TAN, A.L. Epidemiology and clinical outcome of enterococcal bacteraemia in an acute care hospital. **Journal of Infection**, v.52, p.383-6, 2006.

RICE, L. B.; CARIAS, L.; RUDIN, S.; VAEL, C.; GOOSSENS, H.; KONSTABEL, C.; KLARE, I.; NALLAPAREDDY, S. R.; HUANG, W.; MURRAY, B. E. A potential virulence gene, *hyl_{Efm}*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. **Journal Infectious Diseases**, v.187, p.508-512, 2003.

RICE, L. B.; LAKTICOV, V.; CARIAS, L.; RUDIN, S.; HUTTON, R.; MARSHALL, S. H. Transferable capacity for gastrointestinal colonization in *Enterococcus faecium* in a mouse model. **The Journal of Infectious Diseases**, v.199, p.342–349, 2009.

ROUTSI, C.; PLATSOUKA, E.; WILLEMS, R. J.; BONTEN, M. J.; PANIARA, O.; SAROGLOU, G.; ROUSSOS, C. Detection of enterococcal surface protein gene (*esp*) and amplified fragment length polymorphism typing of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* during its emergence in a Greek intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.12, p.5742-5746, 2003.

SADER, H. S.; JONES, R. N. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria isolated from US medical centers: results of the Daptomycin Surveillance Program (2007-2008). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.65, p.158-162, 2009.

SADER, H. S. ; STREIT, J. M.; FRITSCH, T. R.; JONES, R. N. Antimicrobial activity of daptomycin against multidrug-resistant Gram-positive strains collected worldwide. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.50, p.201-204, 2004.

SAHM, D. F.; KISSINGER, J.; GILMORE, M. S.; MURRAY, P. R.; MULDER, R.; SOLLIDAY, J.; CLARKE, B. In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.33, p.1588-1591, 1989.

SCHOUTEN, M. A.; WILLEMS, R. J. L.; KRAAK, W. A. G.; TOP, J.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A.; VOSS, A. Molecular Analysis of Tn1546-Like Elements in Vancomycin-Resistant Enterococci Isolated from Patients in Europe Shows Geographic Transposon Type Clustering. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.3, p.986-989, 2001.

SHANKAR, N.; BAGHDAYAN, A. S.; GILMORE, M. S. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Nature**, v.417, p.746-750, 2002.

STAMPONE, L.; DEL GROSSO, M.; BOCCIA, D.; PANTOSTI, A. Clonal Spread of a Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Strain among Bloodstream-Infecting Isolates in Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.4, p.1575-1580, 2005.

SUP OH, W. ; SOO KO, K. ; SONG, JH. ; LEE, M. Y. ; PARK, S. ; PECK, K. R. ; LEE, N. Y. ; KIM, CK. ; LEE, H. ; KIM, SW. ; CHANG, HH. ; KIM, YS. ; JUNG, SI. ; SON, J. S. ; YEOM, JS. ; KI, H. K. ; WOO, GJ. High rate of resistance to quinupristin-dalfopristin in *Enterococcus faecium* clinical isolates from Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.12, p.5176-5178, 2005.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfecciosos**. 20 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. cap.18, p.438 – 441.

TEIXEIRA, L. M. et al. Enterococci. In: MURRAY, P. R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 9th ed. Washington: ASM press, 2007. cap.30, p.430-442.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.2223-2239, 1995.

The European Antimicrobial Resistance Surveillance System. EARSS results [Datatbase on the internet]. [Cited 20.10.2008]. Available from: <http://www.rivm.nl/earss/result/>.

TITZE-DE-ALMEIDA, R.; VAN BELKUM, A.; FELIPE, M. S. S.; ZANELLA, R. C.; TOP, J.; WILLEMS, R. J. L. Multilocus Sequence Typing of Hospital-Associated *Enterococcus faecium* from Brazil Reveals Their Unique Evolutionary History. **Microbial Drug Resistance**, v.12, n.2, 2006.

TOP, J.; WILLEMS, R.; BONTEN, M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.52, p.297-308, 2008.

TREITMAN, A. N.; YARNOLD, P. R.; WARREN, J.; NOSKIN, G. A. Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002). **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.462–463, 2005.

TSAI, JC.; HSUEH, PR.; LIN, HM.; CHANG, HJ.; HO, SW.; TENG, LJ. Identification of Clinically Relevant *Enterococcus* Species by Direct Sequencing of groES and Spacer Region. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.1, p.235-241, 2005.

TURNER, K. M.; HANAGE, W. P.; FRASER, C.; CONNOR, T. R.; SPRATT, B. G. Assessing the reliability of eBURST using simulated populations with known ancestry. **BMC Microbiology**, v.7, p.30, 2007.

UTTLEY, A.H.; COLLINS, C. H.; NAIDOO, J.; GEORGE, R. C. Vancomycin resistant enterococci. **Lancet**, v.1, p.57-58, 1988.

VALDEZATE, S.; LABAYRU, C.; NAVARRO, A.; MANTECÓN, M. A.; ORTEGA, M.; COQUE, T. M.; GARCÍA, M.; SAÉZ-NIETO, J. A. Large clonal outbreak of multidrug-resistant CC17 ST17 *Enterococcus faecium* containing Tn5382 in a Spanish hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, p.17-20, 2009.

VAN BAMBEKE, F.; MINGEOT-LECLERCQ, MP.; STRUELENS, M. J.; TULKENS, P. M. The bacterial envelope as a target for novel anti-MRSA antibiotics. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.29, p.124-134, 2008.

VANKERCKHOVEN, V.; VAN AUTGAERDEN, T.; VAEL, C.; LAMMENS, C.; CHAPELLE, S.; ROSSI, R.; JABES, D.; GOOSSENS, H. Development of a multiplex PCR for the detection of *asaI*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.4473-4479, 2004.

VINH, D. C.; RUBINSTEIN, E. Linezolid: a review of safety and tolerability. **The Journal of Infection**, v.59, p.59-74, 2009.

WANG, J. L.; HSUEH, P. R. Therapeutic options for infections due to vancomycin-resistant enterococci. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v.10, p.785-96, 2009.

WERNER, G.; COQUE, T. M.; HAMMERUM, A. M.; HOPE, R.; HRYNIEWICZ, W.; JOHNSON, A.; KLARE, I.; KRISTINSSON, K. G.; LECLERCQ, R.; LESTER, C. H.; LILLIE, M.; NOVAIS, C.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PEIXE, L. V.; SADOWY, E.; SIMONSEN, G. S.; TOP, J.; VUOPIO-VARKILA, J.; WILLEMS, R. J.; WITTE, W.; WOODFORD, N. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. **Euro Surveillance**, v.13, 2008.

WERNER, G.; KLARE, I.; FLEIGE, C.; WITTE, W. Increasing rates of vancomycin resistance among *Enterococcus faecium* isolated from German hospitals between 2004 and 2006 are due to wide clonal dissemination of vancomycin-resistant enterococci and horizontal spread of *vanA* clusters. *International Journal of Medical Microbiology*, v.298, p.515-527, 2008.

WILLEMS, R. J.; BONTEN, M. J. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.20, n.4, p.384-390, 2007.

WILLEMS, R. J.; HOMAN, W.; TOP, J.; VAN SANTEN-VERHEUVEL, M.; TRIBE, D.; MANZIOROS, X.; GAILLARD, C.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; MASCINI, E. M.; VAN KREGTEN E, VAN EMBDEN JD, BONTEN MJ. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. **Lancet**, v.357, p.853-855, 2001.

WILLEMS, R. J. L.; TOP, J.; VAN DEN BRAAK, N.; VAN BELKUM, A.; MEVIUS, D. J.; HENDRIKS, G.; VAN SANTEN-VERHEUVEL, M.; VAN EMBDEN, J. D. A. Molecular Diversity and Evolutionary Relationships of Tn1546-Like Elements in Enterococci from Humans and Animals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, n.3, p.483-491, 1999.

WILLEMS, R. J.; TOP, J.; VAN SANTEN, M.; ROBINSON, D. A.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F. et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.6, p.821-828, 2005.

WOODFORD, N. Glycopeptide-resistant enterococci: a decade of experience. **Journal of Medical Microbiology**, v.47, p.849-862, 1998.

WOODFORD, N.; ADEBIYI, AM. A.; PALEPOU, MF. I.; COOKSON, B. D. Diversity of VanA Glycopeptide Resistance Elements in Enterococci from Humans and Nonhuman Sources. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, n.3, p.502-508, 1998.

WOODFORD, N.; MORRISON, D.; JOHNSON, A. P.; BRIANT, V.; GEORGE, R. C.; COOKSON, B. Application of DNA probes for rRNA and *vanA* genes to investigation of a nosocomial cluster of vancomycin-resistant enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.653-658, 1993.

XU, X.; LIN, D.; YAN, G.; YE, X.; WU, S.; GUO, Y.; ZHU, D.; HU, F.; ZHANG, Y.; WANG, F.; JACOBY, G. A.; WANG, M. *vanM*, a New Glycopeptide Resistance Gene Cluster Found in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, n.11, p.4643-4647, 2010.

ZANELLA, R. C.; BRANDILEONE M. C. C.; BOKERMANN, S.; ALMEIDA, S. C. G.; VALDETARO, F.; VITÓRIO, F.; MOREIRA, M. F. A.; VILLINS, M.; SALOMÃO, R.; PIGNATARI, A. C. C. Phenotypic and genotypic characterization of VanA *Enterococcus* isolated during the first nosocomial outbreak in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v.9, p.283-291, 2003.

ZANELLA, R. C.; VALDERATO, F.; LOVGREN, M.; TYRREL, G. J.; BOKERMANN, S.; ALMEIDA, S. C.; VIEIRA, V. S.; BRANDILEONE, M. C. First confirmed case of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with VanA phenotype from Brazil: isolation from a meningitis case in São Paulo. **Microbial Drug Resistance**, v.5, p.159-161, 1999.

ZHANEL, G. G.; DECORBY, M.; NICHOL, K. A.; WIERZBOWSKI, A.; BAUDRY, P. J.; KARLOWSKY, J. A.; LAGACÉ-WIENS, P.; WALKTY, A.; MULVEY, M. R.; HOBAN, D. J.; CANADIAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE ALLIANCE. Antimicrobial susceptibility of 3931 organisms isolated from intensive care units in Canada: Canadian National Intensive Care Unit Study, 2005/2006. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.62, p.67-80, 2008.

Apêndice

Apêndice A – Dados gerais sobre os VREs estudados

Isolados	Data coleta	Procedência ¹	Amostra clínica ²	Genes de virulência								CIM ³ (µg/mL) DPC	Tipagem molecular ⁴			Long P2/3 ⁵
													PFGE	MLST		
				acm	hyl	agg	cyLL	cylLs	cylA	esp	gel			ST	CC	
<i>E. faecium</i> HC-02	24/9/2008	HC-HEM	CV - S. anal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	0,75	L1	656	17	>i
<i>E. faecium</i> HC-03	25/9/2008	HC-HEM	CV - S. anal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	F	478	17	>i
<i>E. faecium</i> HC-04	2/10/2008	HC-HEM	CV - S. anal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1	G	478	17	>i
<i>E. faecium</i> HC-05	2/10/2008	HC-HEM	CV - S. anal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1	H	412	17	>i
<i>E. faecium</i> HC-07	16/10/2008	HC-HEM	CV - S. retal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	2	N	17	17	>i
<i>E. faecium</i> HC-09	29/1/2009	HC-HEM	CV - S. retal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	G	412	17	>i
<i>E. faecium</i> HC-10	31/3/2009	HC-HEM	CV - S. anal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1	L	412	17	>i
<i>E. faecium</i> HC-11	7/4/2009	HC-HEM	CV - S. anal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	J	657	17	>i
<i>E. faecium</i> HC-12	14/4/2009	HC-HEM	CV - S. retal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1	I	478	17	>i
<i>E. faecium</i> HC-13	14/4/2009	HC-NUT	CV - S. retal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	D			>i
<i>E. faecium</i> HC-14	14/4/2009	HC-HEM	CV - S. retal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	F	478	17	>i
<i>E. faecium</i> HC-15	23/4/2009	HC-UETDI	Urina	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	2	F			>i
<i>E. faecium</i> HC-16	12/5/2009	HC-GAM	Urina	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	I			>i
<i>E. faecium</i> HC-17	13/6/2009	HC-IMU	Urina	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	D			>i
<i>E. faecium</i> HC-18	16/6/2009	HC-HEM	CV - S. anal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	2	F			>i
<i>E. faecium</i> HC-19	23/6/2009	HC-IMU	CV - S. anal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	F			>i
<i>E. faecium</i> HC-20	23/6/2009	HC-IMU	CV - S. anal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	D	478	17	>i
<i>E. faecium</i> HC-22	Junho/2009	HC-CTI	Cav. peritonial	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	I	412	17	>i
<i>E. faecium</i> HC-24	30/6/2009	HC-GAM	CV - S. anal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	2	F			>i
<i>E. faecium</i> SCM-25	Julho/2009	SCMRP	NI	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	I1	478	17	>i
<i>E. faecium</i> HC-26	17/7/2009	HC-ORT	Músculo	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	D	478	17	>i
<i>E. faecium</i> HC-27	23/7/2009	HC-IMU	Urina	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	D			>i
<i>E. faecium</i> HC-28	Julho/09	HC-CTI	CV - S. retal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1	H	412	17	>i
<i>E. faecium</i> HC-29	30/7/2009	HC-IMU	CV - S. retal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	D			>i
<i>E. faecium</i> HC-30	30/7/2009	HC-IMU	CV - S. retal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	2	D			>i

Continua

Continuação

Isolados	Data coleta	Procedência ¹	Amostra clínica ²	Genes de virulência								CIM ³ (µg/mL) DPC	Tipagem molecular ⁴				Long P2/3 ⁵
				acm	hyl	agg	cylLL	cylLs	cylA	esp	gel		PFGE	MLST			
														ST	CC		
<i>E. faecium</i> HC-31	Agosto/2009	HC-CTI	CV - S. retal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	H			>i	
<i>E. faecium</i> HC-32	Agosto/2009	HCFMRP	NI	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	H1			>i	
<i>E. faecium</i> HC-33	13/8/2009	HC-UNE	Urina	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1	H1	412	17	>i	
<i>E. faecium</i> HC-34	26/8/2009	HC-BER	Sangue	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	H	412	17	>i	
<i>E. faecium</i> HC-35	25/8/2009	HC-IMU	CV - S. anal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	E	412	17	>i	
<i>E. faecium</i> HC-36	28/8/2009	HC-CTIP	CV - S. retal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1	H			>i	
<i>E. faecium</i> HC-37	21/8/2009	HCFMRP	Urina	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	2	G			>i	
<i>E. faecium</i> SCM-38	Setembro/2009	SCMRP	Urina	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	H1	412	17	>i	
<i>E. faecium</i> SCM-39	Setembro/2009	SCMRP	Bile	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	H1			>i	
<i>E. faecium</i> HC-40	20/10/2009	HC-HEM	CV - S. anal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	2	K	658	-	>i	
<i>E. faecium</i> HC-41	18/11/2009	HC-CTIP	CV - S. anal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	0,064	H			>i	
<i>E. faecium</i> HC-42	30/11/2009	HC-TMO	CV - S. retal	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	I2	478	17	>i	
<i>E. faecium</i> HC-43	Julho/2010	HCFMRP	Sangue	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1	B	412	17	>i	
<i>E. faecium</i> HC-47	20/7/2010	HC-CLM	Otite média	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	1,5	A			>i	
<i>E. faecium</i> HC-48	29/7/2010	HC-HEM	CV - S. anal	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	2	A1	478	17	>i	
<i>E. faecium</i> HC-49	29/7/2010	HC-TMO	CV - S. anal	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	1,5	A			>i	
<i>E. faecium</i> HC-51	30/7/2010	HC-HEM	CV - S. anal	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	1,5	ND			>i	
<i>E. faecium</i> HC-52	30/7/2010	HC-UPOTV	CV - S. anal	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	1,5	A			>i	
<i>E. faecium</i> HC-53	30/7/2010	HC-NUT	CV - S. anal	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	0,5	A	412	17	>i	
<i>E. faecium</i> HC-54	30/7/2010	HC-ORT	Fragmt. (prt. mole)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	1,5	A			>i	
<i>E. faecium</i> HC-55	Agosto/2010	HCFMRP	Sangue	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	2	A			>i	
<i>E. faecium</i> SCM-56	Agosto/2010	SCMRP	Urina	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	1,5	A	412	17	>i	
<i>E. faecium</i> SCM-57	Agosto/2010	SCMRP	Sec. abdominal	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	2	C	478	17	>i	

Continua

Continuação

Isolados	Data coleta	Procedência ¹	Amostra clínica ²	Genes de virulência								CIM ³ (µg/mL) DPC	Tipagem molecular ⁴			Long P2/3 ⁵
													PFGE	MLST		
														ST	CC	
				<i>acm</i>	<i>hyl</i>	<i>agg</i>	<i>cylLL</i>	<i>cylLS</i>	<i>cylA</i>	<i>esp</i>	<i>gel</i>					
<i>E. faecium</i> HC02MI-61	Meados 2005/2006	HCFMRP	NI	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	2	M1	78	17	i
<i>E. faecium</i> HC10F-62	Meados 2005/2006	HCFMRP	NI	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	2	M2	659	17	i
<i>E. faecium</i> HC46F-63	Meados 2005/2006	HCFMRP	NI	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	2	M	660	17	i
<i>E. faecium</i> HC930U-64	Meados 2005/2006	HCFMRP	NI	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	M1	78	17	i
<i>E. faecium</i> HCVRE-65	Meados 2005/2006	HCFMRP	NI	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	1,5	M	78	17	i

¹ HC, HCFMRP, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; HEM, Hematologia; UETDI: Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas; GAM: Gastroenterologia; IMU: Imunologia; CTI: Centro de Terapia Intensiva; SCMRP: Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto; ORT: Ortopedia; BER: Berçário; CTIP: Centro de Terapia Intensiva Pediátrico; TMO: Transplante de medula óssea.

² CV- S. retal: Cultura de vigilância-Suabe retal; NI: Não informado; CV- S. anal: Cultura de vigilância-Suabe anal; Fragmt. (prt. mole): fragmento (partes moles); Sec. Abdominal: Secreção abdominal.

³ CIM: Concentração Inibitória Mínima; DPC: Daptomicina.

⁴ PFGE: Eletroforese em campos pulsados; MLST:Seqüenciamento de ; ST: *sequence type*; CC: complexo clonal; ND: não determinado.

⁵ i: transposon Tn 1546 intacto; >i: fragmento do grupamento gênico *RSHAX* >4,4kb.