UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização molecular de elementos VanA em enterococos com
genótipo e fenótipo discrepantes relativos à resistência aos
glicopeptídeos**

PRISCILA MORAES HENRIQUE

Ribeirão Preto
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização molecular de elementos VanA em enterococos com
genótipo e fenótipo discrepantes relativos à resistência aos
glicopeptídeos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia, para obtenção do título
de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia
- Área de concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientada: Priscila Moraes Henrique
Orientadora: Prof^a. Dr^a Ana Lúcia da Costa
Darini

Ribeirão Preto
2007

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Henrique, Priscila; Moraes

Caracterização molecular de elementos VanA em enterococos com genótipo e fenótipo discrepantes relativos à resistência aos glicopeptídeos. Ribeirão Preto, 2007.

70 p. : il. ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Darini, Ana Lúcia da Costa

1.VRE; 2.genótipo *vanA*; 3. fenótipo VanB

Autor (a): Priscila Moraes Henrique

Título: Caracterização molecular de elementos VanA em enterococos com genótipo e fenótipo discrepantes relativos à resistência aos glicopeptídeos.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia
Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lucia 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 (LEBEM) do Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas (DACTB) da FCFRP-USP.

Instituto Adolfo Lutz (IAL) - São Paulo, onde foi detectado incongruência entre os fenótipos e genótipos das respectivas linhagens e posteriormente foram enviadas ao LEBEM.

Laboratório de Genômica e Biologia Molecular Bacteriana - FMRP, onde foram realizados os experimentos de sequenciamento coordenado *pelo Prof. Dr. Marcelo Brocchi*, atualmente professor doutor do Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP.

Apoio financeiro: Fapesp e Capes

“Não há nada de nobre em sermos superiores ao próximo. A verdadeira nobreza consiste em sermos superiores ao que éramos antes”.

(Autor desconhecido)

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais; Paulo, Gildete e meus irmãos; Paula e Mateus.

Em especial, à Izabel Cristina Palazzo,

Gostaria de agradecer não só pela valiosa contribuição para meu crescimento científico, como também pela companhia nos melhores e nos piores momentos. Obrigada pelo seu apoio nas horas difíceis, pela sua alegria contagiante, pelo incentivo nos momentos de desânimo.

Não sei se um dia poderei retribuir tudo que me proporcionou, mas queria ao menos dizer que você além de ser uma profissional excepcional, é uma pessoa especial e muito querida!

Obrigada, Cris!!!!

À minha orientadora prof. Ana Lúcia da Costa Darini, que aceitou prontamente conduzir-me neste trabalho, com seus ensinamentos e paciência, tornando possível a realização de um sonho. Minha eterna gratidão.

Aos meus colegas pós-graduandos e de iniciação científica, Amanda, André, Eduardo, Leonardo, Luciene e Natália que diretamente e indiretamente, muito contribuíram para realização deste trabalho. A todos sou imensamente grata.

À Joseane, pela colaboração nos experimentos e pela amizade.

Ao Rubens, pela preparação e lavagens dos materiais utilizados nos experimentos.

Aos meus amigos (as), Cristina, Lisandra, Thiago e Tony por terem sido tão companheiros e atenciosos. É com carinho que sempre lembrarei dos momentos agradáveis que passamos juntos.

Ao Bruno e Gabriel, meus primos queridos, pelo carinho.

Às minhas amigas Gisele e Jacqueline, pela companhia que tornou os dias em Ribeirão Preto menos solitários.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo financiamento do projeto

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa concedida.

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas	i
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	vi
Resumo	vii
Abstract	ix
1. Introdução	1
1.1. O gênero <i>Enterococcus</i>	2
1.2. Enterococos resistentes aos glicopeptídeos	4
1.2.1. Mecanismo de ação dos glicopeptídeos	6
1.2.2. Mecanismo de resistência aos glicopeptídeos	8
1.3. Importância do estudo do elemento VanA	14
2. Objetivos	16
3. Materiais e métodos	18
3.1. Linhagens bacterianas	19
3.2. Identificação e confirmação do genótipo <i>vanA</i>	19
3.3. Determinação da concentração inibitória mínima	22
3.4. Extração de DNA genômico bacteriano	22
3.5. Eletroforese de campo pulsado	23
3.6. Reações de <i>Long</i> -PCR 1 e 2	25
3.6.1. Digestão do elemento VanA	29
3.6.2. Digestão do grupamento <i>vanRSHAX</i>	29
3.7. Reações de amplificação por sobreposição	29
3.8. Análise de plasmídeos	30

3.9. Digestão do DNA com I– <i>CeuI</i>	32
3.10. Obtenção de sonda genética	32
3.11. Reação de hibridação	33
3.12. Seqüenciamento dos produtos de PCR	34
3.13. Investigação da presença de região promotora entre os <i>vanX</i> e <i>vanY</i>	35
4. Resultados	40
4.1. Confirmação da espécie e do gene <i>vanA</i>	41
4.2. Concentração inibitória mínima	41
4.3. Eletroforese de campo pulsado	42
4.4. Amplificação do elemento VanA	42
4.5. Amplificação por sobreposição de primers	45
4.6. Análise de plasmídeos	47
4.7. Digestão do DNA com I- <i>CeuI</i> , seguido por PFGE e hibridação com sondas <i>vanA</i> e 16S rRNA	48
4.8. Seqüenciamento	48
4.9. Estudo da região promotora	49
5. Discussão	50
6. Conclusões	60
8. Referências	62

Lista de abreviaturas e siglas

A - Adenina

BCIP – Cloreto de p-nitro azul tetrazólico

C - Citosina

CIM - concentração inibitória mínima

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

D-ala-D-ala - D-alanina-D-alanina

D-ala-D-lac - D-alanina-D-lactato

D-ala-D-ser – D-alanina- D-serina

DNA - ácido desoxiribonucleico

dNTP - desoxinucleotídeo trifosfatado

EDTA - ácido etileno diamino tetracético

et al – e colaboradores

FCFRP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

G - Guanina

GES - solução de tiocianato de guanidina, EDTA e sarcosil (sarcosinato lauril sódio)

GlcNac- N- acetilglucosamina

IR_L - região invertida e repetida da esquerda

IR_R – região invertida e repetida da direita

IS - seqüência de inserção ou elemento de inserção

Kb - Kilobases

KCl- cloreto de potássio

LEBEM – Laboratório de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular

L-PCR - *Long*-PCR

mg – micrograma (s)

mL – mililitro (s)

mM - milimolar

MurNac – N- acetilmurâmico

NaCl – cloreto de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

NBT – Fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indol dissódico

NCTC - *National Collection of Type Cultures*

ng - nanograma

nm - nanômetros

ORF - *open reading frame*

Pb – par de base

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PFGE - *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*

pH - potencial de hidrogênio iônico

pmol - picomol

PYR – L-pirrolidonil- β -naftilamida

RNA - ácido ribonucleico

rpm - rotações por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

T - Timina

TBE – solução de tris , EDTA e ácido bórico

TE – solução de Tris, EDTA

Tn – transposon

TP- Teicoplanina

Tris – hidroximetil amino metano

U - unidade

UDP - uridina-difosfato

VA - Vancomicina

VRE – *Vancomycin Resistant Enterococci*

β - beta

μL – microlitro (s)

Lista de figuras

	Pg
Figura 1. Síntese do peptidoglicano e mecanismo de ação dos glicopeptídeos ...	8
Figura 2. Esquema do mecanismo de resistência à vancomicina	9
Figura 3. Esquematização do mecanismo de resistência aos glicopeptídeos codificado pelo <i>Tn1546</i>	12
Figura 4. Representação do elemento VanA e localização dos 19 primers sobrepostos	30
Figura 5. Vetor pKK 232-8, utilizado nos experimentos de clonagem para verificação da existência de promotor na região entre os genes <i>vanX</i> e <i>vanY</i>	37
Figura 6. Produto da amplificação do gene <i>vanA</i> , após eletroforese em gel de agarose a 1%	41
Figura 7. Padrão de macrorestrição do DNA cromossômico de enterococos após digestão com enzima <i>SmaI</i> e PFGE	42
Figura 8. Produto da reação de LPCR 2/3, seguido de eletroforese em gel de agarose a 0,8%	43
Figura 9A. Representação dos sítios de restrição da enzima <i>DdeI</i> na região RSHAX do <i>Tn1546</i> e os respectivos tamanhos de fragmentos obtidos após a digestão	44
Figura 9 B. Produto da digestão da reação de L-PCR 2/3 com enzima <i>DdeI</i> , seguido de eletroforese em gel de agarose a 2%	44
Figura 10. Representação esquemática do <i>Tn1546 like-elements</i> dos respectivos enterococos, a posição dos pares de primers utilizados no <i>overlapping</i> PCR e CIM de teicoplanina (TP) e vancomicina (VA) ...	46
Figura 11. (A) Perfil plasmideal após extração plasmideal por lise alcalina e eletroforese em gel de agarose a 1 %, seguido por (B) Southern blot e hibridação com sonda <i>vanA</i>	47

Figura 12.	Perfil de macrorestrição do DNA após digestão com enzima <i>I-CeuI</i> seguido por PFGE	48
Figura 13.	Produto da digestão do vetor pKK 232-8 com enzima <i>Hind</i> III, após eletroforese em gel de agarose a 1%	49
Figura 14.	Produto da amplificação da região intergênica <i>vanXY</i> após eletroforese em gel de agarose a 1%.	49

Lista de tabelas

Tabela 1-	Seqüências iniciadoras utilizadas nas reações de amplificação	Pg 20
Tabela 2-	Primers e respectivos genes a serem amplificados por PCR	28
Tabela 3-	Primers utilizados para amplificação da região intergênica <i>vanXY</i>	35
Tabela 4-	Caracterização do elemento VanA por <i>Overlapping</i> PCR	45

Resumo

Henrique, P. M. **Caracterização molecular de elemento VanA em enterococos com genótipo e fenótipo discrepantes relativos à resistência aos glicopeptídeos**. 2007. 70 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Enterococos resistentes aos glicopeptídeos representam, atualmente, importantes patógenos causadores de infecção nosocomial, sendo isolados em várias regiões do mundo, inclusive no Brasil. Dos fenótipos de resistência descritos até o momento, VanA e VanB são os mais encontrados. O fenótipo VanA é caracterizado por linhagens resistentes a altos níveis de vancomicina e teicoplanina, enquanto VanB é representado por linhagens com altos níveis de resistência à vancomicina, mas com sensibilidade à teicoplanina. O fenótipo VanA é codificado por um grupamento de genes (*vanRSHXYZ*) localizados em um elemento genético móvel denominado Tn1546 ou elemento VanA, freqüentemente inserido em plasmídeo conjugativo. Quatro linhagens de enterococos resistentes à vancomicina e sensíveis à teicoplanina que apresentaram genótipo *vanA* e fenótipo VanB foram estudadas com objetivo de se determinar qual o mecanismo responsável por esta incongruência. A identificação das espécies foi realizada por multiplex PCR, sendo três linhagens identificadas como *Enterococcus faecalis* e uma linhagem *Enterococcus faecium*. Todas confirmaram a presença do gene *vanA* por PCR e, no entanto, apresentaram sensibilidade à teicoplanina, determinada por Etest, condizente com o fenótipo VanB. Reações de *Long-PCR* e *overlapping PCR* foram realizadas para amplificação e caracterização do elemento VanA. O elemento VanA das linhagens de *E. faecalis* mostrou deleção da extremidade direita, correspondente à perda dos genes *vanY* e *vanZ*. Na linhagem de *E. faecium* foi detectada a inserção da *ISEfa5* na região intergênica *vanXY*, como reportado em estudo prévio. A tipagem molecular das linhagens foi realizada pelo perfil de PFGE após macrorestrição do DNA com enzima *SmaI* e indicou que duas linhagens de *E. faecalis* pertenciam ao mesmo clone, enquanto a outra era geneticamente não relacionada. Estudos de hibridação com sonda para localização do gene *vanA* indicaram que este gene estava associado a um plasmídeo de 70Kb. Para verificar a presença de eventuais mutações no gene *vanS*, relatadas em alguns estudos como causa da perda da sensibilidade à teicoplanina, os elementos VanA das linhagens foram seqüenciados, contudo nenhuma mutação foi encontrada. Os experimentos de clonagem para analisar a possível presença de uma região promotora entre os genes *vanY* e *vanZ* indicaram a

não existência de um promotor nesta região. A presença de elemento VanA com a mesma característica, sendo carregado por plasmídeos de mesmo tamanho em linhagens de *E. faecalis* com perfil de PFGE diferentes, sugere que este elemento foi transferido horizontalmente. O estudo molecular deste elemento de resistência gerou informações sobre a epidemiologia e eventos genéticos no elemento VanA que estão ocorrendo nas linhagens de VRE isoladas no Brasil.

Palavras-chave: VRE, genótipo *vanA*, fenótipo VanB

Abstract

Henrique, P. M. **Molecular characterization of the VanA element in enterococci with incongruent genotype and phenotypes relative to glycopeptide resistance.** 2007. 70 p. Master Dissertation – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Vancomycin-resistant enterococci (VRE) have emerged worldwide including in Brazil as important nosocomial pathogens. The most prevalent phenotypes described among glycopeptide resistant enterococci are VanA and VanB. VanA phenotype is characterized by induced high-level resistance both to vancomycin and teicoplanin, whereas VanB-resistant strains show inducible resistance to vancomycin and retained susceptibility to teicoplanin. The *vanA* gene cluster (*vanRSHAXYZ*) is located in a mobile genetic element called Tn1546 or VanA element, which is often carried by conjugative plasmids. Four VRE showing VanB phenotype and *vanA* genotype isolated in a Brazilian hospital were investigated to better understand the molecular mechanisms underlying this incongruence. Multiplex PCR was performed for species identification. Three strains were identified as *Enterococcus faecalis* and the fourth as *Enterococcus faecium*. All VRE strains harboured gene *vanA* but showed VanB phenotype as determined by the Etest. Long PCR and PCR amplification of internal regions were employed for Tn1546 structural analysis. Three *E. faecalis* showed deletion of *vanYZ* genes corresponding to the inverted repeated right terminal of Tn1546 and *E. faecium* showed insertion of an IS element, ISEFa5, between *vanX* and *vanY* genes, as previously reported. These genetic rearrangements were associated to loss of resistance to teicoplanin. PFGE performed after *Sma*I digestion of DNA revealed that two *E. faecalis* were genetically related but the third one was unrelated. Plasmid analysis followed by Southern blotting and hybridization with *vanA* probe were performed for localization of VanA element. Results indicated that *E. faecalis* isolates showed the same structure of VanA element and plasmid profile with *vanA* located into plasmid. Thus, horizontal dissemination of this genetic element was suggested. VanA elements in all isolates were sequenced to detect point mutations in *vanS*, previously observed in VanB-phenotype-*vanA*-genotype VRE isolates. However, no mutation was found. Assays to detect the presence of a promoter between *vanX* and *vanY* genes were negative for this region. Molecular characterization of these VRE furnished additional important information about VanA element epidemiological and evolutionary events in Brazilian isolates.

Key words: VRE, *vanA* genotype, VanB phenotype

1. Introdução

1.1. O gênero *Enterococcus*

O nome “enterococos” é derivado da palavra francesa “enterócoque” que foi usada para designar a origem entérica destes cocos Gram-positivos. Em meados de 1930, os enterococos eram classificados como *Streptococcus*, sendo as espécies mais comuns *Streptococcus faecalis* seguida pela *Streptococcus faecium* (MURRAY, 2000). Em 1980, baseado em diferenças genéticas, os enterococos deixaram de pertencer ao gênero *Streptococcus* e foram designados como *Enterococcus* (SCHLEIFER; KLIPPER-BALZ, 1984).

O gênero *Enterococcus* é constituído por cocos Gram-positivos que podem se apresentar como cocos únicos, aos pares ou em cadeias curtas. São anaeróbios facultativos e crescem em temperaturas que variam de 10 a 45°C, podem ser cultivados na presença de NaCl (6,5%) e pH 9,6. São capazes de hidrolisar esculina em presença de 40% de bile e produzir pirrolidonil arilamidase (PYR) (TEIXEIRA; FACKLAM, 2004). Atualmente, dezessete espécies de *Enterococcus* são conhecidas e entre estas, duas são responsáveis pela maioria das infecções humanas: *Enterococcus faecalis* representando de 80 a 90% das amostras clínicas e *Enterococcus faecium* de 5 a 15%. Outras espécies tais como *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. avium* e *E. raffinosus* são isoladas menos freqüentemente, e correspondem a menos que 5 % das amostras clínicas (FACKLAM et al., 1999; CENTINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000; MASCHIETO et al., 2004).

Enterococos estão presentes na microbiota comensal intestinal de animais e humanos, e no entanto, causam infecção principalmente em pacientes com algum comprometimento da imunidade. A infecção enterocócica humana mais comum é do trato urinário, seguida pela infecção intra-abdominal e pélvica, bacteremia, endocardite e infecção neonatal (FACKLAM et al., 1999). Em meados de 1970, esta bactéria começou a ser reconhecida como causa de infecções nosocomiais. Possivelmente, este fato está relacionado

ao aumento do uso de antibióticos de 3ª geração como as cefalosporinas, aos quais os enterococos são naturalmente resistentes (MURRAY, 1990).

A incidência de enterococo como patógeno nosocomial tem aumentado, e atualmente, é considerado o segundo microorganismo mais isolado em infecções nosocomiais urinárias e de feridas e o terceiro mais comum causador de bacteremia adquirida em hospitais nos Estados Unidos (CENTINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000).

Uma das principais razões da persistência destes microorganismos em ambiente hospitalar é a resistência intrínseca a vários antibióticos comumente utilizados, como β -lactâmicos, clindamicinas, fluoroquinolonas. Também, pela sua habilidade em adquirir resistência a outros antibióticos como os aminoglicosídeos e glicopeptídeos, através da aquisição de material genético por da transferência de plasmídeos e transposons (CLEVEL, 1990; CHANG et al., 2003). Estes fatos induziram às constantes alterações na terapia das infecções causadas por enterococos que normalmente envolve a combinação de um antibiótico que atua sobre a parede celular, como por exemplo, a penicilina, ampicilina, vancomicina e um inibidor de síntese protéica como o aminoglicosídeo gentamicina (SIMJEE et al., 2002). O efeito sinérgico bactericida entre aminoglicosídeos e beta-lactâmicos ou glicopeptídeos é ineficaz se houver elevados níveis de resistência para uma das classes da droga utilizada.

Resistência a elevadas concentrações de aminoglicosídeos devido à presença de enzimas modificadoras destes antibióticos, é extremamente difundida entre os enterococos. Muitas linhagens de *E. faecium* são altamente resistentes às penicilinas devido à presença de proteínas fixadoras de penicilinas (PBPs) modificadas, que apresentam baixa afinidade por beta-lactâmicos. Sendo assim, restam poucas opções terapêuticas para tratamento das infecções enterocócicas e a vancomicina é um dos antibióticos de escolha (CENTINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000). Entretanto, a partir de 1988 quando foi relatado o primeiro

enterococo resistente à vancomicina, este antibiótico não pôde mais ser usado como opção terapêutica em muitos locais onde ocorreram surtos de enterococos resistentes à vancomicina (VRE, do inglês, “*vancomycin-resistant enterococci*”) e que posteriormente se tornaram endêmicos (UTTLEY et al., 1988).

1.2. Enterococos resistentes aos glicopeptídeos

A vancomicina é um antibiótico glicopeptídeo, extraído de culturas de *Streptomyces orientalis*, que apresenta atividade contra os microorganismos Gram-positivos e alguns poucos anaeróbios. É indicada, especificamente, no tratamento de infecções estafilocócicas graves causadas por estafilococos resistentes à meticilina e em pacientes alérgicos à penicilina e cefalosporinas; também é indicada no tratamento de infecções causadas por enterococos e pneumococos resistentes à penicilina e colites causadas por *Clostridium difficile*. A teicoplanina também é um antibiótico glicopeptídeo, obtido a partir de *Actinoplanes teichomyceticus* e apresenta mecanismo de ação semelhante à vancomicina, diferenciando-se desta apenas por apresentar meia vida mais longa e menor toxicidade (TAVARES, 1996; REYNOLDS, 1989).

VRE representa, atualmente, um sério problema de saúde pública. Desde o primeiro relato em 1988 (UTTLEY et al., 1988), outros isolados foram relatados e a situação atual indica que este microorganismo resistente está presente em hospitais do mundo todo (DEMERTZ et al., 2001; KAWALEC; GNIADKOWSKI; HRYNIEWICZ, 2000, KAWALEC et al., 2001b, KURIYAMA et al, 2003). VRE tem sido detectado como causa de surtos hospitalares ou de forma endêmica também no Brasil (ZANELLA et al., 2003).

Como enterococo compõe a microbiota humana, a transmissão nosocomial de VRE pode ocorrer diretamente entre os pacientes ou indiretamente pelas mãos dos funcionários dos hospitais ou por contaminação ambiental. Os fatores de riscos para aquisição de VRE incluem

tempo de internação prolongado, doença severa, proximidade com outro paciente com VRE e tratamento com múltiplos antibióticos (MOELLERING et al., 1998).

Em um levantamento realizado pelo SENTRY “*Antimicrobial Resistance Surveillance Program*”, entre 1997 e 2000, foi avaliado o perfil de sensibilidade entre enterococos isolados em centro médicos de diversas regiões do mundo. Este estudo mostrou uma prevalência de VRE de 10-13% na América do Norte, 1-3% na América Latina, 1-3% na Europa e 1% na Ásia (MUTNICK; BIEDENBACH; JONES, 2003).

As origens dos genes de resistência associados à vancomicina nos enterococos são desconhecidas. A vancomicina foi licenciada primeiramente nos Estados Unidos em 1958; entretanto, apenas nos anos 80 foram isolados os primeiros enterococos resistentes à vancomicina. O aparecimento de VRE na década de 80 sugere que estes genes de resistência foram transferidos aos enterococos, antes ou naquele tempo, e selecionados devido ao uso aumentado da vancomicina na prática clínica e dos glicopeptídeos, avoparcina e orienticina como promotores de crescimento animal. Antes de 1970, havia pouco uso clínico da vancomicina nos Estados Unidos; depois disso, entretanto, com a identificação do *Clostridium difficile* como uma causa de diarreia e com o surgimento de estafilococos resistentes à meticilina, houve aumento drástico no uso deste antibiótico, contribuindo, provavelmente, para o aparecimento de VRE especialmente nos Estados Unidos (PATEL, 2000).

Na Europa, a origem de VRE parece estar relacionada a animais alimentados com rações suplementadas com avoparcina. A exposição dos enterococos a este antibiótico no trato gastrointestinal destes animais selecionaram as cepas resistentes aos glicopeptídeos que foram transmitidas para a população pela cadeia alimentar (PATEL, 2000; COQUE et al., 1996). Nos Estados Unidos, onde os glicopeptídeos nunca foram usados na alimentação de animais, a alta incidência de infecções por VRE é atribuída ao uso extensivo de vancomicina nos hospitais (COQUE et al., 1996). Estes fatos podem explicar as diferenças epidemiológicas

das infecções por VRE na Europa e nos Estados Unidos, sendo que em hospitais europeus são raras e a colonização da comunidade é freqüente, enquanto nos Estados Unidos, aproximadamente 12% de todas as infecções nosocomias são causadas por enterococos (EDMOND et al., 1999; GOOSSENS, 1998).

O primeiro enterococo resistente à vancomicina isolado no Brasil foi *E. faecium* em 1996 (DALLA-COSTA et al., 1998), posteriormente caracterizado como genótipo *vanD* (DALLA-COSTA et al., 2000). Estudos sugerem que enterococos resistentes à vancomicina no Brasil tiveram origem nos hospitais, devido ao uso inapropriado deste antibiótico. O uso de avoparcina como promotor de crescimento animal é proibido, no Brasil, desde 1998, mas são necessários mais estudos para elucidar o impacto do uso deste glicopeptídeo na disseminação da resistência, já que não foram relatados VRE de origem animal no Brasil (LEME et al., 2000).

1.2.1. Mecanismo de ação dos glicopeptídeos

A atividade da vancomicina e de outros glicopeptídeos resulta na inibição da síntese da parede celular da bactéria. A parede celular bacteriana consiste de peptidoglicano, que é um polímero constituído por monômeros formados de açúcar aminados N-acetilmurâmico (MurNac) e N-acetilglucosamina (GlcNac), ligados por pontes de aminoácidos, que se dispõem de forma alternada, formando longas cadeias peptídicas que se entrecruzam (REYNOLDS, 1989).

O primeiro passo na síntese de peptidoglicano é a formação do ácido N – acetilmurâmico. Na etapa seguinte, os aminoácidos formadores do mucopeptídeo (L-alanina, ácido glutâmico, lisina ou ácido diaminopimélico, D-alanina, D-alanina) ligam-se ao ácido UDP-N-acetilmurâmico, formando uma molécula do derivado do ácido murâmico com um

pentapeptídeo (UDP-N-acetilmurâmico-pentapeptídeo). Este, então é transferido para um receptor fosfolipídico da membrana citoplasmática (Figura 1).

Sobre a molécula UDP-pentapeptídeo ligada ao receptor vem se juntar o N-acetilglicosamina, formando um monômero dissacarídico-pentapeptídico. Esta subunidade é transportada pela molécula fosfolipídica para fora da membrana, onde os pares de N-acetilmurâmico-pentapeptídeo e N-acetilglicosamina sofrem os processos de polimerização (transglicosilação), pelo qual as subunidades vão sendo ligadas para formar a longa cadeia polissacarídica. Em seguida, ocorre a etapa de transpeptidação caracterizada pela ligação entrecruzada das cadeias peptídicas de uma molécula com a outra, intermediada por uma pentaglicina, o que proporciona rigidez à parede celular (ELIOPOULOS, 1997; REYNOLDS, 1989).

Os antibióticos glicopeptídeos interferem na formação da parede celular, se ligando ao terminal D-alanina-D-alanina (D-ala-D-ala) dos precursores do peptidoglicano com alta afinidade. A formação de um complexo entre o antibiótico e o precursor da cadeia de peptidoglicano impede a ação das enzimas envolvidas nas reações de transglicosilação e transpeptidação na síntese da parede celular bacteriana (Figura 1 e 2) (REYNOLDS, 1989).

Figura 1. Síntese do peptidoglicano e mecanismo de ação dos glicopeptídeos. Ligação do antibiótico ao C-terminal D-ala-D-ala do precursor do peptidoglicano que impede as reações de transglicosilação e transpeptidação. Adaptado de Courvalin (2006).

1.2.2. Mecanismo de resistência aos glicopeptídeos

A resistência aos glicopeptídeos em enterococos é baseada na alteração do alvo de atuação destes antibióticos, o terminal D-alanina-D-alanina do peptidoglicano que é modificado para D-alanina-D-lactato (D-ala-D-lac) nos fenótipos VanA, B e D e D-serina (D-ser) nos fenótipos VanC, E e G, nos quais os glicopeptídeos se ligam com baixa afinidade (Figura 2) (BUGG et al., 1991; ARTHUR; REYNOLDS; COURVALIN, 1996; COURVALIN, 2005).

Figura 2. Esquema do mecanismo de resistência à vancomicina. Adaptado de Murray (2000).

Foram descritos 6 fenótipos de resistência aos glicopeptídeos, dois destes denominados VanA e VanB representam os fenótipos de resistência adquirida de maior importância (COURVALIN, 2006). O fenótipo VanA é caracterizado por linhagens que apresentam altos níveis de resistência à vancomicina e teicoplanina devido à expressão de genes contidos em um transposon não-conjugativo da família Tn3, Tn1546 (ARTHUR et al., 1993).

O fenótipo VanB é composto por linhagens com variados níveis de resistência à vancomicina e sensibilidade à teicoplanina (ARTHUR; REYNOLDS, COURVALIN, 1996). O grupamento de genes responsáveis pela expressão deste fenótipo é geralmente carregado por um transposon de 64Kb conhecido como Tn1547. Contudo, outros transposons também têm sido descritos como Tn1549 e Tn5382 (QUINTILIANI; COURVALIN, 1996, CARIAS et al., 1998; GARNIER et al., 2000).

O fenótipo VanC é caracterizado por linhagens que apresentam resistência intrínseca à vancomicina (baixo nível de resistência) e sensibilidade à teicoplanina. Os genes que codificam este fenótipo são específicos para cada uma das espécies *E. gallinarum* *vanC-1* e *E. casseliflavus*/ *E. flavescens* *vanC-2/vanC-3*, respectivamente (NAVARRO; COURVALIN, 1994).

Outros fenótipos de resistência adquirida, como VanD, VanE e VanG também já foram descritos, entretanto, ocorrem com menor frequência (DEPARDIEU; REYNOLDS; COURVALIN, 2003; ABADIA; COURVALIN; PERICHON, 2000; DERPADIÉU et al., 2003). O grupamento de genes *vanD* e *vanE* estão localizados exclusivamente no cromossomo e não são transferíveis para outros enterococos por conjugação (ABADIA, COURVALIN, PERICHON, 2000; DEPARDIEU; REYNOLDS; COURVALIN, 2003), sendo que o fenótipo VanD (resistência à vancomicina e sensibilidade à teicoplanina) não pode ser distinguido do fenótipo VanB por teste de sensibilidade (PERICHÓN; REYNOLDS; COURVALIN, 1997).

O fenótipo VanE é caracterizado por baixo nível de resistência à vancomicina e sensibilidade à teicoplanina e o fenótipo VanG, cujo grupamento de genes pode ser transferido por conjugação, é caracterizado por baixo nível de resistência à vancomicina e sensibilidade à teicoplanina (ABADIA; COURVALIN; PERICHON, 2000; DERPADIÉU et al, 2003).

No Brasil, o fenótipo VanA é predominante entre os enterococos resistentes aos glicopeptídeos isolados até o momento e pode ser caracterizado pela presença do Tn1546, transposon com 10.851 pb que é carregado por plasmídeo conjugativo (PALAZZO et al., 2006). O Tn1546 contém o grupamento de genes que codifica resistência aos glicopeptídeos e está intacto na maioria das linhagens de VRE isoladas no Brasil (CAMARGO et al., 2005). Alterações no Tn1546 de algumas linhagens (CAMARGO et al., 2004) foram detectadas

sendo adequado denominá-los *Tn1546-like elements* ou elementos VanA, uma vez que estas alterações os diferenciam do protótipo inicialmente descrito.

O *Tn1546* presente em linhagens de enterococos com fenótipo VanA apresenta o agrupamento de genes necessários e suficientes para a expressão de resistência aos glicopeptídeos. O entendimento da função de cada um dos genes presentes neste transposon se faz necessário para que as alterações provenientes de deleções ou mutações neste agrupamento de genes sejam compreendidas. A esquematização deste mecanismo de resistência está demonstrada na Figura 3, com explicação detalhada a seguir.

Figura 3. Esquematização do mecanismo de resistência aos glicopeptídeos codificado pelo Tn/546. Adaptado de Arthur et al. (1996).

Os genes *vanRS* são responsáveis pela regulação da resposta à presença dos antibióticos glicopeptídicos e, portanto, pela ativação dos demais genes que codificam alterações compatíveis com a resistência propriamente dita (ARTHUR; REYNOLDS; COURVALIN, 1996; CENTINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000; DEPARDIEU; COURVALIN; MSADEK, 2003). O gene *vanS* codifica uma proteína sensora, transmembrana e que têm dois domínios; um domínio externo que é capaz de captar a presença do antibiótico glicopeptídico e o outro, citoplasmático, responsável pela fosforilação da proteína VanR. A proteína VanR fosforilada é capaz de ativar os promotores R e H, responsáveis pela ativação da transcrição dos genes *vanRS* e *vanHAXYZ*, respectivamente (CENTINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000; DEPARDIEU; COURVALIN; MSADEK, 2003).

O gene *vanH* codifica a produção de uma proteína (D-hidroxi ácido desidrogenase) que é responsável pela produção de D-lactato a partir de piruvato, sendo que este D-lactato será incorporado no lugar de D-ala no peptídeo que compõe a parede celular das bactérias que apresentam este mecanismo de resistência (ARTHUR; REYNOLDS; COURVALIN, 1996; CENTINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000).

O gene *vanA* codifica a produção de uma ligase de especificidade alterada, responsável pela produção do radical D-ala-D-lac em lugar de D-ala-D-ala, normalmente codificado pelo gene *ddl* presente no cromossomo da bactéria (ARTHUR; REYNOLDS; COURVALIN, 1996; CENTINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000).

O gene *vanX* codifica a produção de uma D,D-dipeptidase que cliva os radicais D-ala-D-ala para a incorporação dos radicais D-ala-D-lac, o qual apresenta baixa afinidade pelo antibiótico glicopeptídico (ARTHUR; REYNOLDS; COURVALIN, 1996; CENTINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000).

O gene *vanY* codifica a produção de uma D,D-carboxipeptidase que também cliva o radical D-ala-D-ala sintetizado durante o metabolismo normal da bactéria e que não foi

clivado pela proteína VanX (ARTHUR; REYNOLDS; COURVALIN, 1996; CENTINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000).

A função do gene *vanZ* ainda não está totalmente definida, entretanto, sabe-se que a deleção deste gene provoca diminuição na resistência à teicoplanina em linhagens que apresentam fenótipo VanA (ARTHUR; REYNOLDS; COURVALIN, 1996; ARTHUR et al., 1995; COURVALIN, 2005).

1.3. Importância do estudo do elemento VanA

Alterações no elemento VanA têm sido descritas com frequência durante a ocorrência de surtos de infecção hospitalar ou entre linhagens endêmicas, fato que caracteriza a evolução genética do transposon. Os polimorfismos descritos são consequências de inserções de seqüências de inserção (IS), como *IS1216V*, *IS1251*, *IS1476*, *IS1542*, *IS1546*, *IS1678*, *ISEfa5*, (WILLEMS et al., 1999; JENSEN et al., 1998; YU; SEOL; CHO, 2003; SHOUTEN et al., 2001; CAMARGO et al., 2005) deleções de uma ou ambas as extremidades do transposon (LEE et al., 2004; SCHOUTEN et al., 2001) e mutações nos genes *vanX* e *vanS* (JENSEN et al., 1998; HASHIMOTO et al., 2000).

A manutenção da integridade deste transposon é relatada como importante no processo de disseminação da resistência entre linhagens de enterococos, ou mesmo a outros gêneros bacterianos (MANSON et al., 2003).

Os estudos envolvendo VRE realizados no Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular (LEBEM) da FCFRP-USP têm mostrado que o *Tn1546* apresenta-se intacto na maioria das linhagens isoladas de surtos de infecção hospitalar e/ou linhagens endêmicas em muitos hospitais brasileiros (CAMARGO et al., 2005; PALAZZO et al., 2006). Entretanto, foram detectadas algumas modificações no elemento VanA, como inserção de elementos IS e deleções (DARINI et al., 2000; CAMARGO et al., 2004; CAMARGO, 2005;

PALAZZO et al., 2006).

A detecção destas alterações pode permitir a caracterização da transferência de elementos de resistência entre linhagens de enterococos geneticamente não relacionadas ou entre diferentes gêneros bacterianos (MANSON et al., 2003; OPREA et al., 2004). Modificações fenóticas na expressão da resistência, em decorrência destas alterações genéticas, podem levar a erros no processo de identificação do elemento de resistência envolvido e na conduta terapêutica.

Durante estudos conduzidos no Laboratório de Epidemiologia e Bacteriologia Molecular (LEBEM), foram detectados enterococos resistentes à vancomicina, que têm o gene *vanA*, porém que apresentam sensibilidade à teicoplanina. Estas linhagens seriam caracterizadas como fenótipo VanB, entretanto, apresentam genótipo *vanA* (ZANELLA et al., 2006). Este tipo de alteração foi descrito no Japão (HASHIMOTO et al., 2000; OZAWA; TANIMOTO; NOMURA, 2002), na China (TANIMOTO et al., 2005), Taiwan (LAUDERDALE et al., 2002) e Coréia (EOM et al., 2004; LEE et al., 2004 e KO et al., 2005; SONG et al., 2006), como resultado de mutações no gene *vanS*, nos três primeiros países e rearranjos e mutações no grupamento de genes presentes em elementos VanA, na Coréia. A sensibilidade à teicoplanina nestas linhagens pode estar relacionada com alterações na proteína VanS (HASHIMOTO et al., 2000), responsável pelo reconhecimento do antibiótico e fosforilação da proteína VanR, como explicado anteriormente; ou a perda da resistência à teicoplanina em linhagens com genótipo *vanA* pode ser resultado da deleção dos genes *vanY-vanZ*, localizados na extremidade direita do Tn1546.

O estudo molecular do elemento VanA destas linhagens possui importância no esclarecimento do mecanismo que resultou na discrepância entre genótipo e fenótipo a fim de obter maiores informações sobre a epidemiologia e eventos genéticos no elemento VanA que estão ocorrendo nas linhagens de VRE isoladas no Brasil.

2. Objetivos

- Estudar detalhadamente o elemento VanA em três linhagens de *E. faecalis* resistentes à vancomicina e sensíveis à teicoplanina e em uma linhagem de *E. faecium* resistente à vancomicina e com nível de resistência intermediária à teicoplanina, isoladas em hospitais de São Paulo.
- Relacionar epidemiologicamente as linhagens de enterococos do estudo.
- Analisar a possível presença de uma região promotora entre os genes *vanX* e *vanY*.

3. Material e Métodos

3.1. Linhagens bacterianas

Foram estudadas 4 linhagens de enterococos resistentes à vancomicina (VRE); *E. faecalis* 28 isolada de um paciente durante um surto de infecção hospitalar por VRE ocorrido em 1998, na Casa de Saúde Santa Marcelina (SP); *E. faecalis* 211 e *E. faecalis* 217 isoladas de pacientes colonizados por VRE internados na Casa de Saúde Santa Marcelina em 2004 e identificados durante um programa de vigilância. Estas bactérias foram enviadas ao LEBEM da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo onde, em estudo prévio, foi constatado que as mesmas apresentavam genótipo *vanA* e fenótipo VanB.

A linhagem *E. faecium* 172 foi isolada durante o mesmo surto, ocorrido em 1998, na Casa de Saúde Santa Marcelina e enviada ao LEBEM, onde Camargo e colaboradores constataram a inserção de um novo elemento nesta linhagem, o qual foi denominado ISEfa5, inserido na região intergênica *vanXY*, no nucleotídeo 9006. Este elemento foi seqüenciado, e está disponível em (<http://www-is.biotoul.fr/> e www.ncbi.nlm.nih.gov, acesso- AY495588) (CAMARGO et al., 2005). Esta linhagem apresentou discrepância entre genótipo e fenótipo e, por este motivo, foi incluída neste estudo.

A linhagem *Enterococcus faecium* BM 4147, que possui o Tn1546 intacto, foi utilizada como controle, gentilmente cedida pelo Dr. Neil Woodford.

3.2. Identificação da espécie e confirmação do genótipo *vanA*

Foi utilizada reação da polimerase em cadeia (PCR, do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”) com objetivo de se determinar a espécie e confirmar a presença do gene *vanA* nessas linhagens.

O preparo da PCR foi realizado em um volume de 25 µL para identificação das espécies de enterococos: água duplamente processada “Qualidade PCR” (W-3500 SIGMA),

solução tamponante de reação 10x diluída para uma concentração final 1x (Tris 20mM e KCl 50mM), 2 mM de cloreto de magnésio, 0,625U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), os 4 nucleotídeos (dNTP) (Invitrogen) na concentração de 0,2 Mm cada um. Foram utilizados 21 pmol dos primers para amplificação do gene *vanA* e 25 pmol dos primers para amplificação do gene *ddl* (DUTKA-MALEN et al.,1995) (Tabela 1) e 2µL de DNA de uma suspensão obtida a partir de duas colônias de cada bactéria em 100µl de água ultra-pura (SIGMA), agitadas e centrifugadas por 15 segundos a 13.000 rpm.. O termociclador utilizado foi *Mastercycler Gardient* (Eppendorf).

Tabela 1 - Sequências iniciadoras utilizadas nas reações de amplificação

Gene amplificado	Primers	Sequências de Nucleotídeos (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)	Referência
<i>vanA</i>	A ₁ A ₂	+ ATG GCA AGT CAG GTG AAG ATG G - TCC ACC TCG CCA ACA ACT AAC G	399	WOODFORD et al., 1993
<i>ddl</i> <i>E. faecium</i>	EFE-1 EFE-2	+GCA AGG CTT CTT CTT AGA GA -CAT CGT GTA AGC TAA CTT C	550	DUKTA-MALEN et al., 1995
<i>ddl</i> <i>E. faecalis</i>	EFS-A EFS-B	+ATC AAG TAC AGT TAG TCT T -ACG ATT CAA AGC TAA CTG	941	DUKTA-MALEN et al., 1995
<i>vanC1</i> (<i>E. gallinarum</i>)	<i>vanC- 1A</i> <i>vanC- 1B</i>	+GGT ATC AAG GAA ACC TC -CTT CCG CCA TCA TAG CT	822	DUKTA-MALEN et al., 1995
<i>vanC2</i> (<i>E. casseliflavus</i>)	<i>vanC-2/3A</i>	+ CTC CATA CGA TTC TCT TG	439	DUKTA-MALEN et al., 1995
<i>VanC3</i> (<i>E. flavescens</i>)	<i>vanC-2/3B</i>	-CGA GCA CGA CCT TTA AG		

Observações: + sense, -anti-sense

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

Para detecção das espécies, foi utilizado o protocolo de amplificação, descrito por Dukta-Malen et al. (1995):

1 ciclo de:

94°C ----- 2 minutos

30 ciclos de:

94°C ----- 60 segundos

54°C ----- 60 segundos

72°C ----- 60 segundos

Extensão final:

72°C ----- 10 minutos

A detecção do gene *vanA* foi realizada utilizando o protocolo descrito por Woodford et al (1993):

1 ciclo de:

94°C ----- 5 minutos

30 ciclos de:

94°C ----- 25 segundos

52°C ----- 40 segundos

72°C ----- 50 segundos

Extensão final:

72°C ----- 10 minutos

Após a amplificação do gene *vanA* e dos fragmentos que determinam as espécies, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1%, com 10µL de uma solução contendo azul de bromofenol adicionada ao produto da PCR. O marcador do peso molecular utilizado foi GeneRuler 100 bp DNA ladder (Fermentas).

3.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) para vancomicina e teicoplanina foi determinada pelo Etest[®] (AB BIODISK), segundo recomendações do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI, 2005). O CLSI estabelece que a resistência para vancomicina ocorre quando há inibição do crescimento bacteriano em concentrações maiores ou iguais a 32 µg/mL e sensibilidade quando esta inibição ocorre em concentrações menores ou iguais a 4 µg/mL. Para teicoplanina a bactéria é considerada sensível quando ocorre inibição do crescimento bacteriano em concentrações do antibiótico menores ou iguais a 8 µg/mL e resistente quando a inibição do crescimento bacteriano acontece em concentrações maiores ou iguais a 32 µg/mL.

A partir de um crescimento bacteriano de 18 h em placas de ágar Mueller Hinton (OXOID) acrescido de sangue de carneiro 5%, denominado ágar sangue, foi preparado um inóculo bacteriano em solução fisiológica esterilizada, equivalente a 0,5 da escala Mac Farland (1×10^8 UFC/mL). A suspensão bacteriana foi posteriormente semeada, por esgotamento, em Ágar Mueller Hinton. 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 37° C. Foi realizada a leitura após 24 horas de incubação.

3.4. Extração de DNA genômico bacteriano

O DNA genômico das linhagens utilizado como molde nas reações de amplificação, foi extraído pelo método descrito por Pitcher; Sanders; Owen, (1989). As colônias bacterianas utilizadas na extração foram retiradas de culturas em ágar sangue a 5% após incubação por 24 horas a 37°C. Com auxílio de uma alça de semeadura com capacidade para 10 µL, o crescido bacteriano foi transferido para uma solução tamponante TE (10 mM Tris, 1mM EDTA) pH 8,0, contendo sacarose a 25% e 50 mg/mL de lisozima e incubado a 37°C por 30 minutos.

Após incubação foram adicionados, ao tubo, 500 µL de GES (5 M tiocianato de guanidina, 0,1 M de EDTA e 0,5% de sarcosinato lauril sódio).

Ao lisado bacteriano, foram adicionados 250 µL de acetato de amônio a 7,5 M, misturados e incubados por 10 minutos no gelo. A seguir, foram adicionados ao tubo 500 µL de clorofórmio/2-pentanol, e o mesmo foi agitado vigorosamente por 10 minutos. Posteriormente o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm.

O sobrenadante (700 µL) foi transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 875 µL de etanol absoluto (armazenado a -20°C) e o tubo foi homogeneizado por inversão e mantido a -20°C por 18-24 h.

Após esta incubação, o tubo foi centrifugado por 3 minutos a 13.000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 100 µL de acetato de amônio/etanol, processo seguido de centrifugação sob as mesmas condições descritas anteriormente. Desprezado o sobrenadante, foi adicionado etanol absoluto (armazenado a -20°C) ao DNA contido no tubo e novamente centrifugado. Finalmente, o sobrenadante foi desprezado e o tubo contendo o DNA mantido em câmara de fluxo laminar para secagem. Após secagem, o DNA foi suspenso em 100 µL de solução tamponante TE 1x (10 mM Tris, 1 mM EDTA) pH 8,0 e incubado 18-24h a 4°C. A quantificação do DNA foi realizada no “GeneQuant pro RNA/DNA calculator” (Amersham Pharmacia Biotech) de acordo com os seguintes parâmetros: concentração de DNA (µg/mL), absorbância em 230nm, 260nm (quantificação de RNA e DNA, respectivamente), 280nm (quantificação de proteínas).

3.5. Eletroforese de campo pulsado

As linhagens bacterianas foram submetidas à tipagem molecular pela comparação dos fragmentos de DNA cromossômico obtidos pela macrorestrição pela enzima *Sma*I¹ após

¹ Sítio de restrição- 5'-CCCGGG-3'

eletroforese em campo pulsado (PFGE, do inglês “Pulsed Field Gel Electrophoresis”) seguindo protocolo descrito por Kaulfmann (1998). As linhagens bacterianas foram cultivadas em ágar sangue carneiro 5% a 37° C durante 18 horas. Uma colônia do crescimento bacteriano foi transferida para 5 mL de caldo BHI e incubada a 37° C por 18 horas. O volume de 1,5 mL da suspensão bacteriana foi transferido para tubo tipo eppendorf e centrifugado a 12 000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado com solução I (10 mM Tris, 10 M NaCl, pH 8,0), sendo centrifugado novamente. Repetiu-se novamente este procedimento e o sobrenadante foi desprezado. O sedimento obtido foi suspenso com 200 µL da solução I. Esta solução foi utilizada para confecção dos blocos de agarose, adicionando-se à mesma 150 µL de agarose ultra-pura (1,5 %) à temperatura de 45° C. Os blocos de agarose confeccionados foram transferidos para tubos cônicos contendo 1 mL de solução de lise (6mM Tris pH 8,0, 1 mM NaCl, 100 mM EDTA pH 8,0, 0,2 % deoxicolato de sódio, 0,5 % de laurilsarcosinato de sódio, 0,5 % Brij 58), 1 mg/mL de lisozima e 20 µg/ mL de solução de Rnase), incubados por 4 horas a 37 °C. Esta solução foi desprezada dos tubos e foram adicionados aos mesmos 1 mL de solução de ES (125 mM EDTA pH 9,0, 8,5 mM sarcosil) acrescido de 1 mg/ mL de proteinase K. Os tubos foram incubados a 50°C por 18 horas. A solução de ES foi removida dos tubos e os blocos de agarose lavados por 30 minutos, com tampão TE (10mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8,0). Este procedimento foi repetido 5 vezes. Os blocos de agarose foram armazenados em 1 mL de tampão TE a 4° C. Para o procedimento de digestão foi utilizado um único bloco de agarose para cada linhagem, utilizando-se 27 U da enzima de restrição *Sma*I. A reação foi incubada durante 18 horas a 25°C.

Os blocos de agarose foram aplicados em gel de agarose 1 % (Ultrapure- Gibco), e em seguida foi realizada PFGE utilizando o equipamento *Gene Navigator* (Amersham Biosciences) a 180 V por 25 h a 8 °C. O equipamento foi ajustado em pulsos de 20 s por 10 h,

8 s por 10 h e 3 s por 5 h. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio [1 µg/mL] e analisado.

Os perfis eletroforéticos foram analisados visualmente mediante a comparação dos fragmentos de DNA de cada linhagem. A interpretação do padrão de bandas geradas foi descrito por Tenover e colaboradores (1995). Segundo estes autores, as amostras que apresentarem mesmo perfil eletroforético são consideradas pertencentes à mesma linhagem, as linhagens que apresentarem padrão eletroforético com diferença entre 2 a 3 bandas são consideradas intimamente relacionadas, com diferença entre 4 a 6 bandas, possivelmente relacionadas e finalmente, com diferença maior que 7 bandas linhagens geneticamente não relacionadas (TENOVER et al., 1995).

3.6. Reações de *Long-PCR* 1 e 2

A reação de *Long-PCR* 1 foi utilizada para amplificação dos elementos VanA utilizando-se primer P1 (Tabela 2), complementar às extremidades invertidas e repetidas do transposon. Esta reação tem a finalidade de amplificar longas seqüências (> 5.000 pb), e para tal foi utilizado o kit comercial - “Expand™ Long Template PCR System” (Boehringer Mannheim) que contém uma mistura de solução tamponante e de duas polimerases, *Taq* polimerase e uma polimerase de alta fidelidade, *Pwo*, com atividade de 3'-exonuclease.

Foi preparada uma “mistura A-1” contendo dNTP (10mM cada), primer LP1 (600 pmol) e água purificada. Para cada amostra foi realizada uma “mistura B” em tubo tipo eppendorf, contendo solução tamponante disponível no kit (10x concentrada), as enzimas *Taq* e *Pwo* polimerases, 125 ng do DNA, completando o volume final para 12,5 µL. Foram adicionados, no mesmo tubo, 12,5 µL da “mistura A-1” e 12,5 µL da “mistura B” obtendo-se um volume de 25 µL.

Protocolo de amplificação da L-PCR1:

94°C ----- 2 minutos

10 ciclos de

94°C ----- 10 segundos

65°C ----- 30 segundos

68°C ----- 10 minutos

20 ciclos de:

94°C ----- 10 segundos

65°C ----- 30 segundos

68°C ----- 10 minutos*

*Aumentar o tempo de elongação em 20 segundos a cada ciclo

Um ciclo final de:

72°C ----- 6 minutos

A reação de *Long-PCR 2* foi utilizada para amplificação dos genes *vanRSHAX*, um fragmento de 4,4 kb que corresponde aos nucleotídeos 4101-8549 do *Tn1546* utilizando-se os primers LP2 e LP3 (Tabela 2).

Foi preparada uma mistura A-2/3, contendo os primers *Long P2* e *Long P3* (300pmol cada), dNTP e água purificada, adicionando-se 12,5 µL dessa mistura a cada tubo (0,5 mL) contendo 12,5 µL da mistura B, preparada da mesma forma que para *Long-PCR1*.

Protocolo de Amplificação do *Long PCR* 2:

94°C ----- 2 minutos

10 ciclos de :

94°C ----- 10 segundos

58,5°C ----- 10 segundos

68°C ----- 10 minutos

19 ciclos de:

94°C ----- 10 segundos

58,5°C ----- 30 segundos

68°C ----- 10 minutos*

*aumentar em 20 segundos o tempo de elongação a cada ciclo

Um ciclo final de:

68°C ----- 7 minutos

Após a amplificação, foram adicionados 4 µL de solução contendo azul de bromo fenol a 5 µl do produto amplificado (diluído 1:10) e aplicados em gel de agarose 0,8 % preparado em solução tamponante TBE 0,5x. Utilizou-se como marcador do peso molecular λ DNA/ *Hind* III” (Gibco BRL- Life Technologies). O tempo da eletroforese foi de 3 horas a 90V. O gel foi corado com brometo de etídio (1 µg/mL).

Tabela 2 - Primers e respectivos genes a serem amplificados por PCR

Primers	genes	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho do fragmento	Referência
LP1	<i>Tn1546</i>	GGAAAATGCGGATTTACAACGCTAAG	10,8 Kb	WOODFORD et al., 1997
LP2	<i>vanRSHAX</i>	AGACAAGTCTGAGATTGACCTTGCC	4,4 Kb	WOODFORD et al., 1997
LP3		ATATGCTTGAAACCACTGTTTTCC		
A1	<i>vanA</i>	ATGGCAAGTCAGGTGAAGATGG	399 pb	WOODFORD et al., 1993
A2		TCCACCTCGCCAACAACCTAACG		
P17	<i>vanYZ</i>	AATTCATCTACATTGGT	1940 pb	WOODFORD; STIGTER, 1998
P1		GGATTTACAACGCTAAG		
P1	<i>orf1</i>	GGATTTACAACGCTAAG	1309 pb	WOODFORD; STIGTER, 1998
P2		GCCTTTATCAGATGCTA		
P3	<i>orf1</i>	GGTTTTCGATTATTGGA	1132 pb	WOODFORD; STIGTER, 1998
P4		AAATAATAGAACGACTC		
P5	<i>orf2</i>	CGGAATGCATACGGCTC	1299 pb	WOODFORD; STIGTER, 1998
P6		AGCCATTACAGTAATTA		
P7	<i>orf2</i>	GGATGGACTAACACCAA	1274 pb	WOODFORD; STIGTER, 1998
P8		TTAAGTATAATTCAACC		
P9	<i>vanR</i>	GTGAAGGGATTGAATTG	1225 pb	WOODFORD; STIGTER, 1998
P10		TCCAATCCCCAAGTTTC		
P11	<i>vanS</i>	AAACGACTATTCCAAAC	1679 pb	WOODFORD; STIGTER, 1998
P12		CATAGTATAATCGGCAA		
P13	<i>vanHA</i>	GTGTGAAATATATTCT	1793 pb	WOODFORD; STIGTER, 1998
P14		TTATCACCCCTTTAACG		
P15	<i>vanX</i>	TTTGGATTTTGAAAGG	1941 pb	WOODFORD; STIGTER, 1998
P16		GGATTACTATTATCAC		
P17	<i>vanY</i>	AATTCATCTACATTGGT	1584 pb	WOODFORD; STIGTER, 1998
P18		TCAGTCCAAGAAAGCCT		
P19	<i>vanZ</i>	TATCTTCGCTATTGGAG	428 pb	WOODFORD; STIGTER, 1998
P1		GGATTTACAACGCTAAG		
RNAr- 1	16S rRNA	GGAATTCAAA(T/G)GAATTGACGGGGG	478 pb	GEHA et al., 1994
RNAr-2		CGGGATCCCAGGCCCGGAACGTATTAC		

3.6.1. Digestão do elemento VanA

O produto de L-PCR1 da linhagem *E. faecium* 172 que apresentou um perfil diferente do protótipo Tn1546 foi submetido à digestão com a endonuclease *Cla*I, seguindo o protocolo descrito por Palepou et al. (1998): 5 µL do DNA, 2 µL de *Cla*I, 11 µL de H₂O ultra pura e 2 µL de solução tamponante.

O tubo contendo a reação foi incubado a 34°C por 18h e posteriormente foram adicionados 5 µL de solução de azul de bromofenol (50mM EDTA pH 8,0, 25% Fico II, 0,25% de azul de bromofenol) e o produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2% .

3.6.2. Digestão do grupamento *vanRSHAX*

Foi realizada a digestão do grupamento gênico *vanRSHAX* em todas as linhagens com a enzima de restrição *Dde* I, de acordo com protocolo descrito por Palepou et al. (1998): 3 µL de DNA (produto de L-PCR 2/3), 1 µL endonuclease *Dde* I , 5 µL H₂O ultra-pura e 1 µL tampão específico para *Dde* I.

A reação foi incubada por 4h30min a 37°C, posteriormente foram adicionados 5 µL de solução de azul de bromofenol (50mM EDTA pH 8,0, 25% Fico II, 0,25% de azul de bromofenol) e aplicados em gel de agarose a 2%.

3.7. Reações de amplificação por sobreposição de primers

Foram utilizados dezenove primers combinados aos pares e com regiões de sobreposição (descritos na Tabela 2 e Figura 4) segundo Woodford; Stigter (1998), em várias reações de amplificação (*overlapping* PCR) para a caracterização dos elementos VanA das linhagens envolvidas no estudo. Os tamanhos dos fragmentos obtidos foram comparados aos obtidos na linhagem controle *E. faecium* BM 4147, que contém o Tn1546 intacto.

As condições para amplificação no *overlapping* PCR foram:

1 ciclo de:

94°C ----- 5 minutos

30 ciclos de:

94°C ----- 25 segundos

52°C ----- 40 segundos

72°C ----- 50 segundos

Extensão final:

72°C ----- 10 minutos

Os produtos das reações foram analisados após eletroforese em gel de agarose a 1% e corados com brometo de etídio (1 µg/mL). Para auxiliar na determinação dos tamanhos dos fragmentos obtidos foi utilizado como marcador do peso molecular “Gene Ruler T^M 100pb Ladder” (Fermentas).

Figura 4. Representação do elemento VanA e localização dos 19 primers sobrepostos utilizados no *overlapping* PCR.

3.8. Análise de plasmídeos

Os plasmídeos das linhagens dos enterococos estudados, bem como das linhagens *Escherichia coli* V517 (NCTC 50193) e *Escherichia coli* 39R861 (NCTC 50192) foram extraídos por lise alcalina, segundo Birnboim; Doly (1979).

Este procedimento foi realizado adicionando-se uma alça de capacidade para 10µL de crescimento bacteriano, obtido após cultivo de ágar sangue a 37°C por 24h, em tubos tipo ependorf contendo 100 µL de solução I (solução tamponante TRIS-EDTA-TE) contendo 25% de sacarose e 10 mg/mL de lisozima. Os tubos foram incubados por 30 minutos a 37°C.

Seguindo o protocolo, foi realizada a lise da membrana plasmática das bactérias adicionando-se 200 µL de solução II (NaOH 2M, SDS 1%) aos tubos ependorfs. Posteriormente, foram adicionados 150 µL de solução III (acetato de potássio 3M, pH 4,8) e os tubos centrifugados por 10 minutos a 13.200 rpm.

O sobrenadante de cada tubo foi transferido para um novo tubo, aos quais foram adicionados 400 µL de fenol-clorofórmio. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 13.200 rpm e da fase superior de cada um foram removidos 200 µL, transferidos para um novo tubo. Foram adicionados 400 µL de etanol absoluto aos tubos e os mesmos foram homogeneizados por inversão e mantidos em freezer a -20°C por 18-24 h.

Após incubação, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 13.200 rpm e o sobrenadante foi desprezado. Os tubos foram mantidos em câmara de fluxo laminar para secagem. O sedimento foi suspenso em água ultra pura e foi adicionado 1 µL de solução de Rnase [1mg/ µL].

Foram adicionados 10 µL de solução de azul de bromofenol a cada extração plasmideal e o conteúdo de cada tubo foi aplicado em gel de agarose 1%. A corrida eletroforética foi realizada a 90 V durante 5 horas.

A detecção do tamanho dos plasmídeos extraídos foi realizada pela medida de sua mobilidade no gel de agarose, após corrida eletroforética, e analisada em gráfico semi-logarítmico. O gráfico foi construído utilizando-se *E. coli* V517 (NCTC 50193) e *E. coli* 39R861 (NCTC 50192) que possuem plasmídeos de tamanhos conhecidos. A medida da mobilidade dos plasmídeos nestas linhagens foi realizada utilizando-se o mesmo

procedimento para extração dos plasmídeos das linhagens estudadas e sob as mesmas condições eletroforéticas.

Após a eletroforese, o produto da extração contido no gel de agarose foi transferido para membrana de náilon (Hybond N+, Amersham) utilizando o aparelho VacuGene Pump (Pharmacia Biotech). A membrana foi utilizada posteriormente em estudos de hibridação para determinação da localização do gene *vanA*.

3.9. Digestão do DNA com I-Ceu I

O elemento VanA já foi descrito associado a plasmídeos conjugativos, bem como inserido no DNA cromossômico. Nas linhagens de enterococos estudadas foram conduzidos experimentos com o objetivo de se estabelecer a localização dos elementos VanA. Portanto, reações de hibridação com sondas para o gene *vanA* e 16S rRNA foram realizadas.

O DNA das linhagens bacterianas estudadas foi digerido utilizando-se a enzima de restrição de cortes raros I-Ceu I² (Biolabs) e, posteriormente, submetido à eletroforese de campo pulsado da mesma forma como foi descrito no item 3.5. O DNA contido nos géis de agarose, feitos em duplicatas, foi transferido para membranas de náilon (Hybond N+, Amersham) e as mesmas foram utilizadas em experimentos de hibridação com as sondas mencionadas anteriormente. Um resultado indicativo da presença do elemento VanA no cromossomo bacteriano seria fornecido pela co-localização dos genes *vanA* e 16S rRNA, evidenciado pela hibridação positiva nas duas membranas no mesmo ponto.

3.10. Obtenção de sonda genética

A construção das sondas genéticas *vanA* e 16S rRNA foi realizada por PCR utilizando-se primers descritos na Tabela 2. O produto desta primeira PCR (1 µL) foi usado

² Sito de restrição: CTAA

como molde em uma nova reação de amplificação. Essa nova PCR foi realizada para um volume de 50 μ L, sendo que o volume do nucleotídeo dTTP (10mM) foi reduzido acrescentando-se o nucleotídeo marcado com digoxigenina-dig-11-dUTP (1mM) (Roche), numa proporção de 2:1, respectivamente. O produto amplificado foi analisado em gel de agarose 1 %, para constatação da incorporação do nucleotídeo marcado na segunda PCR que deve apresentar um fragmento de maior peso molecular que o do produto da amplificação do gene *vanA* e 16S rRNA sem marcação com digoxigenina.

3.11. Reação de hibridação

Foi realizada reação de hibridação utilizando “Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I” (Roche) e a sonda marcada com digoxigenina para localização do elemento VanA nas linhagens de enterococos.

Primeiramente, as membranas de náilon contendo produto da extração plasmideal e os fragmentos de DNA resultantes da digestão com I-*CeuI*, previamente fixados, foram colocadas em garrafas de hibridação. Em cada garrafa foram adicionados 20 mL da solução de pré-hibridação (5 X SSC; 0,1%; 0,2% de SDS; 1% de solução bloqueadora) e as mesmas foram colocadas no forno de hibridação a 68°C, por 1 hora. Após a pré-hibridação, a solução de pré-hibridação foi desprezada e adicionados 5 mL da solução de hibridação a cada garrafa de hibridação. A esta solução foram adicionadas 12,5 μ L da sonda previamente desnaturada à temperatura de 95°C. As garrafas de hibridação foram colocadas no forno de hibridação a 68°C por 18 horas.

Terminada esta incubação, a mistura da sonda com a solução de hibridação foi removida de cada garrafa e as membranas foram submetidas a lavagens de estringência com 2X SSC/0,1% SDS e 1X SSC/ 0,1% SDS. Posteriormente, as membranas foram lavadas por 1 minuto em solução tamponante I (Tris 100 mM, NaCl 50mM, pH 7,5) e incubadas durante 30

minutos em 100 mL de tampão II (água destilada, tampão de ácido maleico 1:10 e solução bloqueadora 1:10). As membranas foram novamente lavadas com solução tamponante I.

Em seguida, as membranas foram incubadas por 30 minutos com anticorpo anti-digoxigenina ligado a fosfatase alcalina, diluído em solução bloqueadora (4 µL do anticorpo em 20 mL de solução bloqueadora). As membranas foram lavadas duas vezes com solução tamponante I durante 15 minutos e por 3 minutos com solução tamponante III (Tris 100 mM, NaCl 100mM, MgCl₂ 50 mM, pH 9,5).

Após as lavagens, as membranas foram transferidas para garrafas de hibridação às quais foram adicionados 200 µL do reagente de cor (NBT/BCIP) diluídos em 10 ml de solução tamponante III. As membranas foram incubadas ao abrigo da luz.

Quando as bandas se tornaram visíveis, as membranas foram removidas das garrafas de hibridação e lavadas com solução tamponante TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0).

3.12. Seqüenciamento dos produtos de PCR

O elemento VanA das linhagens *E. faecalis* 28, *E. faecalis* 211, *E. faecalis* 217, *E. faecium* 172 foram seqüenciados para detecção mutação no gene *vanS* ou eventuais deleções e inserções.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o Kit GFX (Amersham Biosciences). Em 1 µL de cada um destes produtos foram adicionados 0,8 µl do iniciador, 4 µL de solução do kit DYEnamic™ ET DYE Terminator (Amersham Biosciences) e água ultra pura (SIGMA) suficientes para um volume de 10 µL, depositados nas cavidades de microplacas de 96 poços. As placas foram transferidas para o termociclador, programado para executar os seguintes ciclos:

1 ciclo de
 95°C 2 segundos
 35 ciclos de
 95°C 10 segundos
 51°C 15 segundos
 60°C 1 minuto

Posteriormente, foi realizada a reação de precipitação, seguindo o protocolo do kit de sequenciamento e, as amostras foram seqüenciadas no MegaBACE™.

As seqüências foram analisadas através do programa ChromasPro (version 1.33).

3.13. Investigação da presença de região promotora entre os *vanX* e *vanY*

A região intergênica *vanXY* foi amplificada por PCR, utilizando primers descritos na Tabela 3. Estes primers possuem sítio para as enzimas de restrição *BamHI* (Invitrogen) e *SalI* (Invitrogen), estratégia que foi utilizada para direcionamento da inserção do fragmento no vetor de clonagem.

Tabela 3- Primers utilizados para amplificação da região intergênica *vanXY*

Nome do Primer	Seqüências de Nucleotídeos (5'-3')	Tamanho do fragmento
	<i>BamHI</i>	
Pz1	GGATCCGCTATTTTGATTTCCTCGTT	428 pb
Pz2	GTCGACCCTAAGTATATTAAGAATAAC	
	<i>SalI</i>	

Programa de amplificação

1 ciclo de:

94°C ----- 5 minutos

30 ciclos de:

94°C ----- 25 segundos

54°C ----- 40 segundos

72°C ----- 50 segundos

Extensão final:

72°C ----- 10 minutos

O vetor utilizado na clonagem foi o pKK232-8 (Pharmacia) (Figura 5) que contém o gene *cat* que codifica a enzima cloranfenicol acetiltransferase, porém, desprovido de promotor. A região intergênica *vanXY* foi inserida “upstream” ao gene *cat*, com objetivo de verificar a existência de um promotor que se presente, faria a indução da transcrição do gene *cat*.

Figura 5. Vetor pKK 232-8, utilizado nos experimentos de clonagem para verificação da existência de promotor na região entre os genes *vanX* e *vanY*.

O produto de PCR da região intergênica *vanXY* e o vetor pKK232-8 foram digeridos com as enzimas *BamHI* e *SalI*. Estas enzimas possuem um único sítio de restrição no vetor e estes sítios estão localizados exatamente onde o fragmento *vanXY* deveria ser inserido (Figura 5).

Cada enzima utilizada necessita de um tipo de tampão, portanto, as digestões foram realizadas separadamente e as reações foram purificadas após cada digestão. Em um tubo de 1,5 mL foram adicionados 3 µL do vetor, 2 µL do tampão, 14 µL de água ultra pura e 1 µL da enzima *BamHI*, em outro tubo foram adicionados 3 µL do produto de PCR, 2 µL do tampão, 14 µL de água ultra pura (SIGMA) e 1 µL da enzima *BamHI*. As reações foram incubadas a 37°C por 18 horas. Para certificar que houve digestão, os produtos foram aplicados em gel de eletroforese a 1%, 90V por 1,5 horas e utilizado o vetor pKK232-8 sem digerir como controle.

Observada a digestão dos produtos, os mesmos foram purificados. O volume do produto de cada digestão foi adicionado em novos tubos e foi acrescentado fenol/clorofórmio em uma concentração 1:1, os tubos foram homogeneizados e em seguida, foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. A fase superior do conteúdo de cada tubo foi transferida para um novo tubo e foi adicionado clorofórmio (1:1). Após a homogeneização, os tubos foram centrifugados por cinco minutos a 14.000 rpm. Novamente, a fase superior foi transferida para um novo tubo e adicionados 2,5 x do volume de álcool 100% e 0,1 x do volume de acetato de sódio 3M. Os tubos foram homogeneizados e incubados a -80°C por 18 horas.

Após as 18 horas de incubação, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 14.000 rpm. Posteriormente, foi desprezado o conteúdo de cada tubo, acrescentados 100 µL de etanol 70% e submetidos a uma nova centrifugação por 1 minuto a 14000 rpm. O álcool foi retirado com pipeta e depois de secos, os sedimentos formados foram eluídos em 10 µL água ultra pura.

A digestão com enzima *SalI* foi realizada adicionando os 10 µL de cada produto digerido com *BamHI* e purificado (vetor e produto de PCR), 2 µL do tampão, 1 µL da enzima

SalI e o volume completado com 7 µL de água ultra pura e incubados por 18 horas a 37 °C. O procedimento de purificação foi realizado novamente.

Após o vetor e o inserto terem sido digeridos e purificados, foi realizada a reação de ligação entre os mesmos. Em um tubo de 1,5 mL, foram adicionados 4,5 µL de água ultra pura, 8 µL do inserto, 4 µL do vetor, 1 µL da enzima T4 ligase (Invitrogen) e 2,5 µL do tampão. O produto da ligação foi dialisado para retirada de sal da reação, utilizando uma membrana de éster de celulose com 0,025 µm e 25 mm de diâmetro (MILLIPORE) colocada em água ultra pura (SIGMA), em recipiente esterilizado, à qual foram adicionados 20 µL da reação e a mesma foi incubada por uma hora. Posteriormente, 10 µL da reação dialisada foi submetida à eletroporação utilizando-se células eletrocompetentes de *Escherichia coli* DH10B. As células eletrotransformadas foram incubadas em caldo “Luria-Bertani” (LB) por 1 hora a 37°C e em seguida semeadas em placas de ágar Mueller Hinton acrescido de cloranfenicol (10 mg/mL).

Com o objetivo de se verificar a inserção do fragmento *vanXY* no vetor de clonagem, foi feita extração plasmideal com o Kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) e o DNA plasmideal foi digerido com a enzima de restrição *Hind* III³ (único sítio no nucleotídeo 207 do vetor) . A inserção do fragmento no vetor foi também verificada por PCR, com os primers Pz1 e Pz2, descritos na Tabela 3.

Protocolo de digestão com *Hind* III:

A reação foi preparada em tubo de 1,5 µL, no qual foram adicionados 5 µL do DNA plasmideal, 2 µL do tampão da enzima, 1 µL da enzima *Hind* III e o volume completado com 12 µL de água ultra pura , para um volume total de 20 µL. Foi realizada uma reação controle utilizando vetor pKK 232-8 sem o inserto.

As reações foram incubadas a 37°C por 18 horas. Os produtos foram aplicados em gel de agarose a 1%, 90V por 1,5 horas. Foi utilizado o marcador λ DNA/ *Hind* III” (Gibco).

³ Sítio de restrição: 5'-AAGCTT-3'

4.Resultados

4.1. Confirmação da espécie e do gene *vanA*

Dentre as quatro linhagens estudadas, três amplificaram com os primers específicos para *E. faecalis*: 28, 211, 217 e uma com o primer específico para *E. faecium*:172 e todas confirmaram a presença do gene *vanA* (Figura 6).

Figura 6. Produto da amplificação do gene *vanA*, após eletroforese em gel de agarose a 1%. Canaletas: 1. Marcador GeneRuler 100 bp DNA ladder (Fermentas), 2. *E. faecium* BM4147, 3. *E. faecalis* 28, 4. *E. faecalis* 211, 5. *E. faecalis* 217, 6. *E. faecium* 172.

4.2. Concentração inibitória mínima

As linhagens *E. faecalis* 28; *E. faecalis* 211; *E. faecalis* 217 e *E. faecium* 172, apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) de 256 µg/mL para vancomicina e, portanto, resistentes a este antibiótico. Com relação à teicoplanina, foram inibidas na concentração de 2 , 3 , 6 e 12 µg/mL, respectivamente, exibindo fenótipos de sensibilidade para as três primeiras e resistência intermediária para a última linhagem.

4.3. Eletroforese de campo pulsado

A comparação dos perfis eletroforéticos obtidos após macrorestrição com enzima *SmaI* e PFGE, permitiu constatar que *E. faecalis* 211 e *E. faecium* 217 são geneticamente relacionadas enquanto *E. faecalis* 28, que apresentou uma diferença maior que sete bandas no perfil eletroforético em relação às demais, é uma linhagem geneticamente não relacionada (Figura 7).

Figura 7. Padrão de macrorestrição do DNA cromossômico de enterococos após digestão com enzima *SmaI* e PFGE. Canaletas: 1. Marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker (Biolabs), 2. *E. faecalis* vanA; 3. *E. faecalis* 28, 4. *E. faecalis* 211, 5. *E. faecalis* 217.

4.4. Amplificação do elemento VanA

A caracterização dos elementos VanA das linhagens estudadas foi realizada pelas reações de *Long-PCR* 1 e 2 e *overlapping PCR* (citados nos itens 3.6 e 3.7).

Para avaliação da integridade do transposon foi utilizado a *Long-PCR1*, sendo que apenas a linhagem *E. faecium* 172 apresentou produto de amplificação com este primer. Entretanto, o fragmento amplificado desta linhagem foi maior que os 10.851 pb obtidos para o protótipo Tn1546 e o mesmo foi submetido a digestão com a enzima de restrição *Cla* I. O resultado desta digestão mostrou padrão diferente do protótipo, e esta alteração ocorreu pela inserção do elemento *ISEFa5* entre os genes *vanY* e *vanZ*, tal como foi descrito por Camargo et al. (2005).

A análise dos genes *RSHAX* pela reação de *Long-PCR2/3*, revelou que esta região do transposon estava intacta em todas as linhagens estudadas (Figura 8), fato confirmado após a digestão do produto da *Long-PCR2/3* com a enzima *Dde* I (Figura 9B). A Figura 9A representa os sítios de restrição da enzima de restrição *Dde*I na região RSHAX.

Figura 8. Produto da reação de LPCR 2/3, seguido de eletroforese em gel de agarose a 0,8 %. Canaletas: 1. Marcador de peso molecular λ DNA/ *Hind* III” (Gibco BRL- Life Technologies), 2. *E. faecium* BM4147, 3. *E. faecalis* 28, 4. *E. faecalis* 211, 5. *E. faecalis* 217, 6. *E. faecium* 172.

Figura 9A. Representação dos sítios de restrição da enzima *DdeI* na região RSHAX do Tn1546 e os respectivos tamanhos de fragmentos obtidos após a digestão.

Figura 9B. Produto da digestão da reação de L-PCR 2/3 com enzima *DdeI*, seguido de eletroforese em gel de agarose a 2%. Canaletas: 1. Marcador 100 bp DNA Ladder (Invitrogen), 2. *E. faecium* BM4147, 3. *E. faecalis* 28, 4. *E. faecalis* 211, 5. *E. faecalis* 217, 6. *E. faecium* 172.

4.5. Amplificação por sobreposição de primers

Apenas com os primers 17/18 e 19/1, que correspondem as regiões dos genes *vanY* e *vanZ*, respectivamente, não houve produto de amplificação para as linhagens *E. faecalis* 28, *E. faecalis* 211 e *E. faecalis* 217. Para a linhagem *E. faecium* 172/98, foi obtido produto de amplificação com os 10 pares de primers utilizados no *overlapping*, no entanto, o fragmento obtido pela amplificação com os primers p17/p18 foi maior que o apresentado pelo protótipo Tn1546 (CAMARGO et al., 2005) (Tabela 4 e Figura 10).

Tabela 4- Caracterização do elemento VanA por *Overlapping* PCR

Linhagens	Par de prime	P1/P2	P3/P4	P5/P6	P7/P8	P9/P10	P11/P12	P13/P14	P15/P16	P17/P18	P19/P1
	Genes	ORF-1	ORF-1	ORF-2	ORF-2	<i>vanR</i>	<i>vanS</i>	<i>vanHA</i>	<i>vanX</i>	<i>vanYZ</i>	<i>vanZ</i>
	Tamanho do fragmento	1309pb	1132pb	1299	1274pb	1223pb	1679pb	1793pb	1941pb	1584pb	423pb
<i>E. faecium</i> BM4147		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i> 211		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>E. faecalis</i> 217		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>E. faecalis</i> 28		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>E. faecium</i> 172		+	+	+	+	+	+	+	+	++	+

+, fragmento indistinguível do protótipo; ++, fragmento maior que o protótipo; -, nenhum fragmento.

Figura 10. Representação esquemática do Tn1546 like-elements dos respectivos enterococos. Posição dos pares de primers utilizados no *overlapping* PCR e da inserção da ISEfa5. CIM de teicoplanina (TP) e vancomicina (VA).

4.6. Análise de plasmídeos

Todas as linhagens apresentaram um único plasmídeo de aproximadamente 70Kb, cujo tamanho foi detectado como descrito no item 3.8 (Figura 11 A).

Figura 11: (A) Perfil plasmideal após extração plasmideal por lise alcalina e eletroforese em gel de agarose a 1 %, seguido por (B) Southern blot e hibridação com sonda *vanA* . Canaletas: 1. *E. coli* 39R861; 2. *E. coli* V517, 3. *E. faecalis* 28; 4. *E. faecalis* 211; 5. *E. faecalis* 217; 6. *E. faecium* 172.

As linhagens *E. faecalis* 28, *E. faecalis* 211 e *E. faecalis* 217 apresentaram hibridação com sonda *vanA* nas bandas correspondentes à migração do DNA plasmideal e do DNA cromossômico e na linhagem *E. faecium* 172 houve hibridação somente com o fragmento correspondente ao plasmídeo (Figura 11 B).

4.7. Digestão do DNA com I-CeuI, seguido por PFGE e hibridação com sondas *vanA* e 16S rRNA

Os fragmentos resultantes da digestão do DNA com I-CeuI, seguido por PFGE das linhagens *E. faecalis* 28, *E. faecalis* 211 e *E. faecalis* 217, estão demonstrados na Figura 12.

Figura 12. Perfil de macrorestrição do DNA após digestão com enzima I-CeuI seguido por PFGE. Canaletas: 1. Marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker (Biolabs), 2. *E. faecalis* 28, 4. *E. faecalis* 211, 5. *E. faecalis* 217.

Foi observado hibridação positiva dos fragmentos de DNA obtidos após restrição com I-CeuI apenas com a sonda 16S rRNA.

4.8. Seqüenciamento

Mediante a utilização do programa ChromasPro foi possível analisar as seqüências do elemento VanA de cada uma das linhagens e compará-las à seqüência do protótipo Tn1546 depositada no GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, acesso nº M97297). Nenhuma das linhagens estudadas apresentou mutações em *vanS*, outras deleções ou inserções, além das mencionadas anteriormente.

4.9. Estudo da região promotora

Após clonagem do fragmento da região intergênica *vanXY* no vetor pKK232-8, não houve expressão do gene *cat*, fato esperado caso houvesse região promotora entre os gene *vanX* e *vanY*. As Figuras 13 e 14 correspondem os experimentos realizados para verificar a inserção do fragmento de DNA no vetor pKK 232-8.

Figura 13. Produto da digestão do vetor pKK 232-8 com enzima *Hind* III, após eletroforese em gel de agarose a 1%. Canaletas: 1. Macador λ DNA/ *Hind* III” (Gibco BRL- Life Technologies); 2. Vetor PKK232-8 com inserto; 4. vetor PKK232-8 sem inserto (controle).

Figura 14. Produto da amplificação da região intergênica *vanXY*, após eletroforese em gel de agarose a 1 %. Canaletas: 1. marcador 123pb (Difco); 2;3;4:*E.coli* DH10B eletrotransformadas.

5. Discussão

Enterococos resistentes à vancomicina estão entre os principais patógenos causadores de infecção hospitalar em todo mundo (PATEL, 2003; WOODFORD, 1998). No Brasil, foi isolado pela primeira vez em 1996 (DALLA COSTA et al., 1998), e desde então, tem sido detectado como causa de surtos hospitalares ou de forma endêmica (ZANELLA et al., 2003; FURTADO et al., 2005).

A resistência à vancomicina pode ser classificada em seis fenótipos, sendo os fenótipos VanA e VanB os mais comumente encontrados (COURVALIN, 2005). Enterococos que possuem o genótipo *vanA* geralmente expressam o fenótipo VanA, caracterizado por resistência à vancomicina e teicoplanina, enquanto o fenótipo VanB é caracterizado por resistência à vancomicina e sensibilidade à teicoplanina (ARTHUR; REYNOLDS; COURVALIN, 1996).

Neste estudo, quatro linhagens de enterococos isoladas de amostras clínicas, pertencentes às espécies *E. faecalis* e *E. faecium* foram analisadas fenotipicamente e molecularmente, a fim de investigar o mecanismo responsável pela discrepância encontrada entre genótipo e fenótipo (genótipo *vanA* e fenótipo VanB). Discrepâncias similares foram descritas no Japão, Coréia e Taiwan (EOM et al., 2004; HASHIMOTO et al., 2000; LEE et al., 2004; OZAWA; TANIMOTO; NOMURA, 2002; TANIMOTO et al., 2005 e KO et al., 2005).

Duas das linhagens, *E. faecalis* 211 e *E. faecalis* 217, as quais foram isoladas de pacientes colonizados durante um programa de vigilância realizada em 2004, na Casa de Saúde Santa Marcelina, apresentaram 100% de similaridade pela análise dos fragmentos de DNA cromossômico obtidos após digestão com enzima de restrição e eletroforese em campo pulsado (PFGE); enquanto a linhagem *E. faecalis* 28, isolada de surto de infecção hospitalar por VRE em 1998 no mesmo hospital, apresentou padrão diferente das demais. Assim, foi possível sugerir que o elemento VanA foi adquirido horizontalmente, uma vez que essas linhagens apresentaram o elemento VanA com as mesmas alterações, perfil plasmideal

indistinguível e padrão de PFGE distintos. Estudos sugerem que a transferência horizontal destes genes pode ser mais importante que a disseminação clonal da resistência à vancomicina, uma vez que enterococos são caracterizados pelo acúmulo de DNA exógeno em seu genoma (PAULSEN et al., 2003). Estes dados epidemiológicos são de grande importância, pois poderão dar suporte para prevenção e controle de VRE (DUTKA-MALEN; EVERS; COURVALIN, 1995; HANDWERGER; SKOBLE, 1995; VAN DEN BOGAARD; JENSEN; STOBBERINGH, 1997).

Dados epidemiológicos importantes sobre VRE isolados no Brasil foram produzidos em um estudo realizado com 51 VREs isolados de várias regiões do país. Foi observado que a aquisição dos genes de resistência à vancomicina por transferência horizontal ocorreu mais freqüentemente em *E. faecium* que em *E. faecalis*. Também foi verificado que a maioria dos Tn1546 estavam íntegros e inseridos em plasmídeos conjugativos. A integridade do transposon nas linhagens de enterococos circulantes no Brasil e a resistência aos glicopeptídeos mediada elementos genéticos móveis facilita a disseminação entre os enterococos e mesmo entre outros gêneros bacterianos (PALAZZO et al., 2006).

Como mencionado anteriormente, dados obtidos em estudos epidemiológicos são de grande importância para o controle da disseminação de patógenos, sendo que a técnica de PFGE é tida padrão-ouro para análise epidemiológica de muitas bactérias, incluindo os enterococos. Esta técnica é adequada para a análise de linhagens isoladas em um curto período de tempo, portanto, podem existir algumas falhas no critério para interpretação dos padrões eletroforéticos, particularmente quando se comparam perfis de PFGE de bactérias isoladas durante um período de tempo longo. Neste estudo, foi observado que a bactéria *E. faecalis* 28, isolada no ano de 1998, parece ser geneticamente diferente das isoladas em 2004 no mesmo hospital. Morrison e colaboradores (1999) propuseram em um estudo que, uma bactéria pode distinguir-se de seu clone de origem apresentando um perfil de PFGE com até

sete bandas de diferença, para um período de estudo de 11 meses (MORRISON et al., 1999). A linhagem *E. faecalis* 28 difere no padrão de PFGE das linhagens *E. faecalis* 211 e *E. faecalis* 217 em 10 bandas, porém o tempo de isolamento entre elas foi de 6 anos. Uma outra característica importante a ser levada em consideração é a mobilidade genômica entre bactérias do gênero *Enterococcus*, constatada em diversos estudos (CAMARGO et al., 2005; PAULSEN et al., 2003). Sendo assim, seria necessária uma nova proposta para interpretar os padrões de PFGE de enterococos isolados por um longo período de tempo.

Os elementos VanA das quatro linhagens estudadas estão localizados em plasmídeos. Os primeiros experimentos de extração plasmideal, seguidos por Southern blotting e hibridação com sonda *vanA*, indicaram que poderia haver uma cópia do gene *vanA* no plasmídeo e no cromossomo, uma vez que houve hibridação na região correspondente à migração do DNA cromossômico e plasmideal no gel de agarose. Entretanto, outros experimentos baseados na digestão do DNA com *I-CeuI*, seguido por PFGE, Southern blotting e hibridação com sonda *vanA* e 16S rRNA não confirmaram estes dados iniciais. O resultado esperado, como a co-localização do fragmento correspondente ao gene *vanA* e 16S rRNA não foi obtido. Provavelmente, a hibridação com a sonda *vanA* na região do DNA cromossômico foi resultado da presença de DNA plasmideal linearizado que se sobrepôs à banda correspondente ao cromossomo. A localização precisa do gene *vanA* e, conseqüentemente do elemento VanA exige que vários ensaios sejam realizados, uma vez que somente da extração plasmideal seguida por hibridação com sonda específica pode levar a erros de interpretação.

Como enfatizado anteriormente, a localização cromossômica do Tn1546 relatada em alguns trabalhos (LEE et al. 2004; TREMLETT, BROWN; WOODFORD, 1999; PAPELOU et al., 1998;) requer investigações adicionais, considerando que este transposon é membro da família Tn3, e, portanto, trata-se de um transposon que não pode ser transferido por si só,

havendo a necessidade de estar inserido em plasmídeo conjugativo. O elemento VanA pode encontrar-se realmente inserido no cromossomo como descrito por Handwerger e Skoble (1995). Estes pesquisadores relataram que em algumas linhagens de *E. faecium*, Tn1546 like-element era carregado por elemento móvel inserido no cromossomo da bactéria, designado Tn5482. Contudo, desconhecem o mecanismo pelo qual o Tn5482 é transferido intercelularmente e sugeriram que este pode ser transferido independentemente, representando um transposon com características estruturais atípicas ou que o Tn5482 pode ser um transposon não conjugativo, mobilizado por um elemento conjugativo ainda não detectado. Ressaltaram ainda que elementos similares ao Tn5482, localizados no cromossomo, podem estar envolvidos na disseminação da resistência à vancomicina (HANDWERGER; SKOBLE, 1995).

O conhecimento da estrutura do elemento VanA fornece tanto dados importantes para os estudos epidemiológicos da disseminação da resistência, quanto para o conhecimento da evolução deste elemento de resistência. Analisando os elementos VanA das linhagens envolvidas no presente estudo, primeiramente por Long-PCR1, foi observado que apenas a linhagem *E. faecium* 172 apresentou produto de amplificação com o primer utilizado, constatando que as demais bactérias haviam perdido ambas ou uma das extremidades repetidas e invertidas do transposon, contudo foi observado a integridade dos genes *vanRSHAX* pela Long-PCR2/3 para todas as linhagens.

A linhagem *E. faecium* 172 confirmou apresentar um produto de amplificação com o primer L-PCR1, com tamanho maior que o protótipo Tn1546 pela inserção da *ISEfa5* na região intergênica *vanXY* (CAMARGO et al., 2005). Este fato poderia justificar o nível de resistência intermediária à teicoplanina nesta linhagem se nesta região existisse um promotor que também fosse ativado pela proteína VanR fosforilada, o qual poderia ter sido prejudicado pela inserção da IS. Dados publicados por Lee e colaboradores (2004) indicaram que esta

possibilidade era viável, pois linhagens que apresentavam parte do gene *vanY* e gene *vanZ* intacto, porém que haviam perdido parte da região entre estes os genes *vanX* e *vanY*, apresentavam sensibilidade à teicoplanina. Estas mesmas linhagens não apresentam alterações na região *vanR* e *vanS*, portanto, as proteínas VanR e VanS estavam sendo codificadas por seus respectivos genes (LEE et al., 2004). No presente estudo, como não houve a expressão do gene *cat* após a inserção da região intergênica *vanXY* no vetor pKK232-8, é possível que não haja a presença de promotor nesta região. Recentemente, Jung e colaboradores (2006) caracterizaram várias linhagens de VRE com genótipo *vanA* que apresentavam a *IS1216V* inserida entre os genes *vanX* e *vanY*, mas que eram resistentes à teicoplanina (JUNG et al., 2006), desse modo pode-se descartar realmente a existência de promotor localizado nesta região e, portanto, a resistência intermediária à teicoplanina na linhagem *E. faecium* 172 pode estar relacionada a outro fato. Uma outra possibilidade seria a ocorrência de deleções ocorridas nos genes *vanX* e *vanY*, localizados nas proximidades da inserção. No entanto, estes genes estavam intactos nesta linhagem. Assim, ainda não ficou claro porque a inserção da *ISEfa5* prejudicou a expressão da resistência à teicoplanina na linhagem de *E. faecium* 172, sendo necessários outros estudos para esclarecer esta questão.

Por não ter havido amplificação de DNA correspondente às regiões dos genes *vanY* e *vanZ* nas linhagens *E. faecalis* 28, *E. faecalis* 211, *E. faecalis* 217, foi possível constatar a perda da extremidade direita do transposon, com conseqüente perda dos genes *vanY* e *vanZ*. A perda destes genes pode ser a causa da sensibilidade à teicoplanina apresentada por estas linhagens, assim como foi relatado em algumas linhagens que apresentavam genótipo *vanA* e fenótipo VanB (KO et al., 2005; LAUDERDALE et al, 2002; ARTHUR et al.,1995).

Rearranjos genéticos em *vanY* e *vanZ*, deleção parcial ou completa de um ou ambos os genes, seguida pela inserção da *IS1216V* são comuns em enterococos com genótipo *vanA* e fenótipo VanB na Coréia. A prevalência deste tipo de transposon está aumentando entre cepas

de VRE que podem estar sendo reportadas, erroneamente, como VanB após testes fenotípicos (LEE et al., 2004).

Arthur e colaboradores (1995; 1996) relataram que *vanY* e *vanZ* são somente necessários para conferir resistência à teicoplanina quando há pentapeptídeo acumulado no citoplasma. Portanto, estas duas proteínas não são necessárias quando o nível de produção de VanH, VanA e VanX é alto, e isto ocorre quando os genes que codificam estas proteínas estão em múltiplas cópias (ARTHUR et al.1995, ARTHUR; REYNOLDS; COURVALIN, 1996). Como o Tn1546 é carregado por um plasmídeo grande, é provável que não haja grande número de cópias do mesmo na bactéria. Então, é possível aceitar a hipótese de que nas linhagens *E. faecalis* 28, *E. faecalis* 211, *E. faecalis* 217 a produção do precursor alterado pentadepsipeptídeo não foi suficiente para conferir resistência à teicoplanina na ausência dos genes *vanY* e *vanZ*.

Linhagens estudadas por Lee e colaboradores (2004), que apresentavam genótipo *vanA* e fenótipo VanB, possuíam inserção da IS1216V na região intergênica *vanXY* associada com deleção de parte do gene *vanY*. O estudo revelou que o nível de atividade D,D carboxipeptidase foi significativamente alterado e que, além da baixa atividade desta enzima, houve o comprometimento da transcrição do gene *vanZ*, resultando em sensibilidade à teicoplanina (LEE et al., 2004).

Muitos autores relatam que os genes *vanRSHAX* são suficientes para promover todas as alterações na parede celular, compatíveis com a resistência aos glicopeptídeos, porém como foi visto neste trabalho, a ausência dos genes *vanY* e *vanZ* provocou sensibilidade à teicoplanina. Desse modo, estes genes codificam proteínas que são importantes para o mecanismo de resistência e a denominação “proteínas acessórias”, citada na maioria dos trabalhos, torna-se inadequada, uma vez considerada as observações realizadas no presente estudo.

O entendimento da sensibilidade à teicoplanina nas linhagens *E. faecalis* 28, *E. faecalis* 211, *E. faecalis* 217 que perderam o gene *vanZ* poderá ocorrer pela determinação da função da proteína VanZ, a fim de esclarecer a participação do produto do gene no mecanismo de resistência. Os dados disponíveis até o momento indicam que esta proteína não é responsável pela síntese do precursor do peptidoglicano alterado D-ala-D-lac (ARTHUR et al., 1995).

Song e colaboradores (2006) relataram recentemente alta frequência de VRE com genótipo *vanA* e fenótipo VanB na Coreia, porém não discutiram a respeito do mecanismo responsável pela perda da resistência à teicoplanina nestas linhagens, apenas caracterizaram os rearranjos genéticos ocorridos nos elementos VanA, tais como deleção parcial no gene *vanY*, deleção total do gene *vanZ*, inserção da *IS1216V* entre os genes *vanX* e *vanY* e inserção da *IS1542* na extremidade esquerda do transposon (SONG et al., 2006).

Inserções de IS podem resultar em deleções parciais ou totais de genes que se localizam próximos à inserção. Recentemente, foram descritas linhagens de *E. faecium* que apresentam genótipo *vanA* e fenótipo VanD, cuja característica foi associada com a inserção do elemento *IS16* no gene *vanY*, inserção não reportada anteriormente no elemento VanA (NAAS et al., 2005). A inserção no gene *vanY* provavelmente resultou em menor nível de atividade da enzima codificada pelo mesmo, a D, D-carboxipeptidase (MACKINNON; DEBROT; TYRREL, 1997) que cliva os resquícios de D-ala, o que pode ter prejudicado o mecanismo de resistência aos glicopeptídeos. Segundo Arthur e colaboradores (1995), a teicoplanina é mais ativa sobre D-ala-D-ala que a vancomicina, e é capaz de se ligar a estes radicais e interferir na síntese da parede celular, mesmo que precursores da parede celular com terminal D-ala-D-ala representem uma pequena porcentagem dos precursores (ARTHUR et al., 1995; ARTHUR; REYNOLDS; COURVALIN, 1996). Enfim, é necessária total eliminação de D-ala-D-ala para conferir resistência à teicoplanina.

Experimentos conduzidos por Brown e colaboradores (2001) demonstraram que, em algumas linhagens, a inserção da IS1542 na região intergênica *orf2-vanR* provocou alteração do promotor R e isto resultou em expressão constitutiva do grupamento de genes *vanA*. O interessante foi que o nível de resistência à teicoplanina nestas linhagens foi maior que o nível de resistência apresentado pelas linhagens com Tn1546 intacto. Estes autores sugeriram que esta elevação da resistência à teicoplanina pode ser reflexo da maior habilidade deste agente glicopeptídeo em agir contra o terminal D-ala-D-ala, assim como foi sugerido por Arthur e colaboradores (1995) (ARTHUR et al., 1995). Como a expressão da resistência, neste caso, é constitutiva, pode-se dizer que a quantidade de D-ala-D-ala é quase nula, aumentando desta forma o nível de resistência à teicoplanina (BROWN; TOWNSLEY; AMYES, 2001; ARTHUR; REYNOLDS; COURVALIN, 1996).

Pela análise do sequenciamento do elemento VanA foi possível constatar que nenhuma das linhagens envolvidas no presente estudo apresentaram mutações no gene *vanS*. A responsabilidade pela perda da resistência à teicoplanina em enterococos com genótipo *vanA* foi atribuída às mutações em *vanS* (três substituições de aminoácidos) em diversos trabalhos. Por sua vez, não se sabe ao certo como essas mutações alteram a proteína VanS resultando na sensibilidade à teicoplanina nestas linhagens (HASHIMOTO et al, 2000; LAUDERDALE et al, 2002; OZAWA; TANIMOTO; NOMURA, 2002; TANIMOTO et al., 2005). Hashimoto e colaboradores (2000), concluíram que as mutações no gene *vanS* resultaram na alteração da conformação do domínio externo da proteína VanS e que esta não mais reconhece a teicoplanina. O mecanismo de resistência aos glicopeptídeos, neste caso, é ativado apenas na presença de vancomicina (HASHIMOTO et al, 2000).

Clinicamente, o fato desses VRE terem perdido o gene *vanZ* pode possibilitar alternativa de tratamento, pois infecções causadas por essas bactérias são de difícil erradicação pela reduzida possibilidade terapêutica. Estudos foram realizados avaliando a

reversibilidade de resistência em enterococos pela inserção de genes, o que pode ter aplicação prática no controle das infecções causadas por esses patógenos (KAWALEC et al., 2001a; VIERA et al., 2001; CHOI et al., 2004).

A caracterização molecular dos elementos VanA nestas linhagens com características discrepantes entre fenótipo e genótipo gerou dados importantes quanto à epidemiologia dos VREs no Brasil, assim como no avanço para o entendimento desse mecanismo de resistência.

6. Conclusões

- A deleção dos genes *vanY* e *vanZ* nas linhagens de *E. faecalis* pode estar relacionada à perda da resistência à teicoplanina.
- Estudos adicionais devem ser realizados para elucidação da participação da proteína *vanZ* na resistência à teicoplanina.
- A presença de genótipo *vanA*- fenótipo VanB não está associada à mutações no gene *vanS* nas linhagens estudadas.
- O elemento *ISEfa5* presente na região intergênica *vanXY* na linhagem *E. faecium* 172 dificultou a expressão da resistência à teicoplanina por um mecanismo desconhecido.
- O elemento VanA está associado a um plasmídeo de 70 Kb.
- A disseminação do elemento VanA pode ser clonal ou horizontal entre as linhagens de *E. faecalis*.
- Não foi detectada região promotora entre os genes *vanX* e *vanY*.

9. Referências

- ABADIA, P.; COURVALIN, P.; PERICHON, B. VanE gene cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* BM4405. **Journal of bacteriology**, v. 184, p. 6457-6464, 2000.
- ARTHUR, M.; DEPARDIEU, F.; MOLINAS, C.; REYNOLDS, P.; COURVALIN, P. The *vanZ* gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM 4147 confers resistance to teicoplanin. **Gene**, v. 154, p. 87-92, 1995.
- ARTHUR, M.; DEPARDIEU, F.; REYNOLDS, P.; COURVALIN, P. Quantitative analysis of the metabolism of soluble cytoplasmic peptidoglycan precursors of glycopeptide-resistant enterococci. **Molecular Microbiology**, v. 21, p. 33-44, 1996.
- ARTHUR, M.; REYNOLDS, P. E.; COURVALIN, P. Glycopeptide resistance in enterococci. **Trends Microbiology**, v. 4, p. 401-407, 1996.
- 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, p. 117-127, 1993.
- BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, p. 1513-1523, 1979.
- BROWN, A. R.; TOWNSLEY, A. C.; AMYES, G. B. Diversity of Tn1546 elements in clinical isolates of glycopeptide-resistant enterococci from Scottish hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1309-1311, 2001.
- BUGG, T.D.H.; WRIGHT, G.D.; DUKTA-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.; ZANELLA, R. C.; BRANDILEONE, M. C.; PIGNATARI, A. C.; GOLDMAN, G. H.; WOODFORD, N.; DARINI, A. L. Occurrence of insertion sequences within the genomes and Tn1546-like elements of glycopeptide-resistant enterococci isolated in Brazil, and identification of a novel element, ISEfa5. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, p. 513-519, 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.
- CARIAS, L. L.; RUDIN, S. D.; DONSKEY, C. J.; RICE, L. B. Genetic linkage and cotransfer of a novel, *vanB*-Containing transposon (Tn5382) and a low-affinity penicillin-binding protein 5 Gene in a Clinical Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* isolate. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 4426-4434, 1998.
- CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 686-707, 2000.

CHANG, S., SIEVERT, D.M., HAGEMAN, J.C; BOULTON, M.; TENOVER, F.; POUCH DOWNES, F.; SHAH, S.; RUDRIK, J.; PUPP, G.; BROWN, W.; CARDO, D.; FRIDKIN, S. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. **New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 342- 347, 2003.

CHOI, Y. J.; CHANG H. K.; LEE, S. K.; SONG, G. Y.; KIM, M. J. Increasing vancomycin susceptibility in vancomycin resistant enterococci by in *vanH* promoter and *ddl* transformation. **Journal of Infection**, v. 48, p. 314-319, 2004.

CLEVEL, D. B. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. **European Journal of Clinical Microbiology Infection Diseases**, v. 9, p. 90-102, 1990.

CLSI- **CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 5 th ed., v. 20, Approved standard M7-A5. Wayne, Pennsylvania, 2005.

COQUE, T. M.; TOMAYAKO, J. F.; RICKE, S. C.; OKHYUSEN, P.; MURRAY, B. Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.40, p.2605-2609, 1996.

COURVALIN, P. Genetics of glycopeptide resistance in gram-positive pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, p. 479-486, 2005.

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

DALLA COSTA, L. M; SOUZA, D. C.; MARTINS, L. T; ZANELLA, R. C.; BRANDILONE, M. C.; BOOKERMANN, S.; SADER, H. S.; SOUZA, H. A. Vancomycin Resistant *Enterococcus faecim*. First case in Brazil. **Brazilian Journal of Infection Disease**, v. 2, p. 160-163, 1998.

DALLA-COSTA, L. M.; REYNOLDS, P. E. ; SOUZA, H. A. P. H. M ; MARIE, D. C. S.; SOUZA, D. C. ; PALEPOU, M. F. I. ; WOODFORD, N. Characterization of a divergent *vanD*-type resistance element from the first glycopeptide-resistant strain of *Enterococcus faecium* isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 44, p. 3444–3446, 2000.

DARINI, A. L. C.; ZANELLA, R. C.; BRANDILEONE, M. C.; PIGNATARI, A. C.; WOODFORD, N. Molecular analysis of VanA elements from strains of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated during the first outbreak of glycopeptide-resistance Enterocci (GRE) in Brazil. In: 1st International ASM conference on Enterococci: Pathogenesis, biology and Antibiotic Resistance. 71, Banff, Canada. **Abstract**. P.49-50, 2000.

DEMERTZ, E.; PAPELOU, M. F.; KAUFMANN, M. E.; AVLAMIS, A.; WOODFORD, N. Characterization of VanA and VanB elements from glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* from Greece. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 682-687, 2001.

DEPARDIEU, F.; COURVALIN, P.; MSADEK, T. A six amino acid deletion, partially overlapping the VanS_B ATP-binding motif, leads to constitutive glycopeptide resistance in VanB-type *Enterococcus faecium*. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 3, p.1069-1083, 2003.

DEPARDIEU, F; REYNOLDS, P. E.; COURVALIN, P. VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* 10/96A. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, p. 7-18, 2003.

DERPADIEU, F.; BONORA, M. G.; REYNOLDS, P. E.; COURVALIN, P. The *vanG* glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis*. **Molecular Microbiology**, v. 50, p. 931-948, 2003.

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

EDMOND, M. B. WALLACE, S. E., MCCLIS, D. K.; PAFALLER, M. A.; JONES, R. N., WENZEL, R. P. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. **Clinical Infection Disease**, v. 29, p.239-244, 1999.

ELIOPOULOS, G. M. Vancomycin-resistant enterococci: mechanism and clinical relevance. **Infectious disease clinics of North America**, v.11, p. 851-865, 1997.

EOM, J-S; HWANG, I.; HWANG, B.; LEE, J.; CHEONG, H.; PARK, Y.; PARK, S.; KIM, W. Emergence of *vanA* genotype vancomycin-resistant enterococci with low or moderate levels of teicoplanin resistance in Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1785-1786, 2004.

FACKLAN, R. R.; SAHIM, D. F.; TEIXEIRA, L. M. Enterococcus. In: Murray, P. R.; BARON E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7th ed. Washington: ASM Press, p. 297-305. 1999.

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 de. Saúde Pública**, v.39, p 41- 46, 2005.

GARNIER, F.; TAOURIT, S.; GLASER, P.; COURVALIN P.; GALIMAND M. Characterization of transposon Tn1549, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus* spp. **Microbiology**, v. 146, p. 1481-1489, 2000.

GEHA, D.; UHL, J. R.; GUSTAFERRO, C. A.; PERSING, D. H. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v.23, p. 1768-1772, 1994.

GOOSSENS, H. Spread of vancomycin-resistant enterococci: differences between the United States and European Infection. **Infection control and hospital epidemiology**, v.19, p. 546-551, 1998.

HANDWERGER, S.; SKOBLE, J. Identification of chromosomal mobile element conferring high-level vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 39, p. 2446-2453, 1995.

HASHIMOTO, Y., TANIMOTO, K., OZAWA, Y.; MURATA, T.; IKE, Y. Amino acid substitutions in the VanS sensor of the VanA-type vancomycin-resistant enterococcus strains

result in high-level vancomycin resistance and low-level teicoplanin resistance. **Fems Microbiology Letters**, v. 185, p. 147-154, 2000.

JENSEN, I. B.; AHRENS, P.; DONS, I.; JONES, R. N.; HAMMEROM, A. M.; ARESTRAP, F. Molecular analysis of Tn1546 in *Enterococcus faecium* isolated from animals and humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p. 4237-442, 1998.

JUNG, W. K.; HONG, S. K.; LIM, S. K.; KWON, N. H.; KIM, J. M.; KOO, H. C.; KIM, S. H.; SEO, K. S.; IKE, Y.; TANIMOTO, K.; PARK Y. H. Phenotypic and genetic characterization of vancomycin-resistant enterococci from hospitalized humans and from poultry in Korea. **FEMS Microbiology Letters**, v. 260, p. 193-200, 2006.

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.

KAWALEC, M.; GNIADKOWSKI, M.; HRYNIEWICZ, W. Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a hospital in Gdansk, Poland, due to horizontal transfer of different Tn1546-like elements transposon variants and clonal spread of several strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3317-3322, 2000.

KAWALEC, M.; GNIADKOWSKI, M.; KEDZIERKA, J.; SKOTNICKI, A.; FIETT J.; HRYNIEWICZ, W. Selection of teicoplanin-resistant *Enterococcus faecium* Mutant during an outbreak caused by vancomycin-resistant enterococci with VanB phenotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39.n.12, p.4274-4282, 2001a.

KAWALEC, M.; GNIADKOWSKI, M.; KEDZIERKA, J.; SKOTNICKI, A.; FIETT, J.; HRYNIEWICZ, W. Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the phenotype VanB in a hospital in Warsaw, Poland: probable transmission of the resistance determinants into an endemic vancomycin-susceptible strain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5. p. 1781-1787, 2001b.

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

KURIYAMA, T.; WILLIAMS, D. W.; PATEL, M.; LEWIS, M; JENKIS, L.; HILL, D.; HOSEIN, I. Molecular characterization of clinical and environmental isolates of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from a teaching hospital in Wales. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 821-827, 2003.

LAUDERDALE, T-L.; MCDONALDS, L. C.; SHIAU, Y. R.; CHEN, P.C; WANG, H.; LAI, F. J.; HO, M. Vancomycin-resistant enterococci from humans and retail chickens in Taiwan with unique VanB phenotype-*vanA* genotype incongruence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 525-527, 2002.

LEE, W. G.; HUH, J. Y.; CHO, S. R.; LIM, Y. A. Reduction in glycopeptide resistance in vancomycin-resistant enterococci as a result of *vanA* cluster rearrangements. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 1379-1381, 2004.

- LEME, I.; FERREIRA, A.; BOTTINO, J.; PIGNATARI, A. Glycopeptides susceptibility among enterococci isolated from a poultry farm in São Paulo, Brazil (1996/1997). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 53-57, 2000.
- MACKINNON, M. G.; DEBROT, M. A.; TYRREL, G. J. Identification and Characterization of IS1476, an insertion sequence-like elements that disrupt VanY function in a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.41, p. 1805-1807, 1997.
- MANSON, J. M.; KEIS, S.; SMITH, J. M.; COOK, G. M. A clonal lineage of VanA-Type *Enterococcus faecalis* predominates in vancomycin-resistant enterococci isolated in New Zealand. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 204-210, 2003.
- MASCHIETO, A.; MARTINEZ, R.; PALAZZO, I.C.V.; DARINI, A. L. C. Antimicrobial resistance of *Enterococcus sp.* isolated from intestinal tract of patients from a university hospital from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 763-767, 2004.
- MOELLERING R. C. J. Vancomycin resistant-enterococci. **Clinical Infection Diseases**, v, 26, p. 1196-9, 1998.
- 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, p. 1084-1091, 1999.
- MURRAY, B. E. The life e times of the enterococcus. **Clinical Microbiology Disease**, v. 3, p. 45-65, 1990.
- MURRAY, B. E. Vancomycin – Resistant Enteroccal Infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, p.710-721, 2000.
- MUTNICK, A., H.; BIEDENBACH, D., J.; JONES, R., N. Geographic variations and trends in antimicrobial resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in the SENTRY antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**, v. 46, p. 63-68, 2003.
- NASS, T.; FORTINEAU, N.; SNANOUDJ, R.; SPICQ, C.; DURRBACH, A.; NORDMANN, P. First Nosocomial Outbreak of Vancomycin- Resistant *Enterococcus faecium* Expressing a VanD-Like Phenotype Associated with a *vanA* Genotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.3642-3649, 2005.
- NAVARRO F.; COURVALIN, P. Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, p. 1788-1793, 1994.
- OPREA, S. F.; ZAIDI, N.; DONABEDIAN, S. M.; BALASUBRAMANIAM, M.; HERSHBERGER, E.; ZERVOS, M. J. Molecular and clinical epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 53, p. 626-630, 2004.

- OZAWA, Y.; TANIMOTO, K.; NOMURA, T. Vancomycin-resistant enterococci in humans and imported chicken 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.
- PALEPOU, M. F.; ADEBIYI, A. M.; TREMLETT, C. H.; JENSEN, L. B.; WOODFORD, N. Molecular analysis of diverse elements mediating VanA glycopeptide resistance in enterococci. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 42, p. 605-612, 1998.
- PATEL, R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 51, p. 13-21, 2003..
- PATEL, R. Enterococcal-type glycopeptide resistance genes in non-enterococcal organisms. **Fems Microbiology letters**, v.185, p.1-7, 2000.
- PAULSEN, I. T.; BANERJEE, L.; MYERS, G. S.A.; NELSON, K. E.; SESHADRI, R.; T.; READ, D.; FOUTS, D. E.; EISEN, J. A.; GILL, S. R.; HEIDELBERG, J. F.; TETTELIN, H.; DODSON, R. J.; UMayAM, L.; BRINKAC, L.; BEANAN, M.; DAUGHERTY, S.; DEBOY, R. T.; DURKIN, S.; KOLONAY, J.; MADUPU, R.; NELSON, W.; VAMATHEVAN, J.; TRAN, B.; UPTON, J.; HANSEN, T.; SHETTY, J.; KHOURI, H.; UTTERBACK, T.; RADUNE, D.; KETCHUM, K. A.; DOUGHERTY, B. A.; FRASER, C. M Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Science**, v. 299, p. 2071- 2074, 2003.
- PERICHÓN, B.; REYNOLDS, P.; COURVALIN, P. VanD type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* Bm4339. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.41, p.2016-18, 1997.
- PITCHER, D. G.; SANDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters Applied Microbiology**, v. 8, p. 151-156, 1989.
- QUINTILIANI, JR.; COURVALIN, P. Characterization of *Tn1547*, a composite transposon flanked by *IS16* and *IS256* like-elements, that confers vancomycin resistance in *Enterococcus faecalis* BM4281. **Gene**, v. 172, p. 1-8, 1996.
- REYNOLDS, P.E. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. **European Journal of Clinical Microbiology and Infection Disease**, v.8, p.943-950, 1989.
- SCHLEIFER, K. H.; KLIPPER- BALZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. Rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* nov. **International Journal of System Bacteriology**, v.34, p. 31-34, 1984.
- SCHOUTEN, A. A.; WILLEMS, R. J. L.; KRAAK, W. A. G.; TOP, J.; HOOGKAMP-KORDTANJE, 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, p. 986-989, 2001.

SIMJEE, S.; WHITE, D. G.; MCDERMOTT, P. F.; WAGNER, D. D.; ZERVOS, M. J.; DONABEDIAN, S. M.; ENGLISH, L. L.; HAYES, J. R.; WALKER, R. D. Characterization of Tn1546 in Vancomycin- Resistant *Enterococcus faecium* isolated from canine urinary tract infections; evidence of gene exchange between human and animal enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 4659-4665, 2002.

SONG, J. H.; KO, K. S.; OH, W. S.; PARK, S.; HEO, S. T.; KWON, K. T.; RYO, S. Y.; PECK, K. R.; LEE, N. Y. High frequency of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates with VanB phenotype and *vanA* genotype in Korean hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**, IN PRESS, 2006.

TANIMOTO, K., NOMURA, T., HAMATANI, H., XIAO, Y. H.; IKE, Y. A Vancomycin-dependent VanA-type *Enterococcus faecalis* strain isolated in Japan from chicken imported from China. **Letters Applied Microbiology**, v.41, p.157-162, 2005.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 7ª ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1996. p. 438-443.

TEIXEIRA, L & FACKLAM, R in MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A. and YOLKEN R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 8ª ed, Washington, DC: ASM Press, .p. 422, 2004.

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. 2233-2239, 1995.

TREMLET, C; BROWN, D. F. J.; WOODFORD, N. Variation in structure and location of VanA Glycopeptide resistance elements among enterococci from single patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 818-820, 1999.

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

VAN DEN BOGAARD, A. E., JENSEN, L.B; STOBBERINGH, E. E. Vancomycin – resistant enterococci in turkeys and farmers. **New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 1558-1559, 1997.

VIERA, T.C.; TSIDRAS, S.; GOLD, H. S.; COAKLEY, E P.; WENNERSTEN, C.; ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING, R. C.; INOUE, R. T. Restoration of vancomycin susceptibility in *Enterococcus faecalis* by antiresistance determinant gene transfer. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p.973-975, 2001.

WILLEMS, R. J.; TOP, J.; VAN DEN BRAAK, N.; VAN BELKUM, A.; MEVIUS, D. J.; HENDRIKS, G.; VAN SANTEN-VERHEUVEL; 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, p. 483-491, 1999.

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

WOODFORD, N.; STIGTER, L. Molecular investigation of glycopeptide resistance in Gram-positive bacteria. In: Woodford, N.; and Johnson, A. P. **Molecular bacteriology: protocols and clinical applications**. New Jersey: Humana Press, p. 579-615, 1998.

WOODFORD, N.; WATSON, A. P.; CHADWICK, P. R. Investigation by long PCR of genetic elements mediating VanA glycopeptide resistance in enterococci from uncooked meat in South Manchester. In: Hauraud, T.; Bouvet, A.; Leclercq, R., Montelos, H.; and Sicard, M. eds. **Streptococci and the host**. New York: Plenum, p. 406-412, 1997.

YU, H. S.; SEOL, S. Y.; CHO, D. T. Diversity of *Tn1546-like elements* in vancomycin-resistant enterococci isolated from humans and poultry in Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p.2641-2643, 2003.

ZANELLA, R. C.; BRANDILEONE, M. C.; BOKERMANN, S.; ALMEIDA, S. C.; VALDETARO, F.; VITORIO, F.; MOREIRA, Mde F.; VILLINS, M.; SALOMAO, R.; PIGNATARI, A. Phenotypic and genotypic characterization of VanA *Enterococcus* isolated during the first nosocomial outbreak in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 30, n. 3, p. 283-291, 2003.

ZANELLA, R. C.; LIMA, M. J. C.; TEGANI, L. S.; HITOMI, A.; BRANDILEONE, A. C.; PALAZZO, I. C.; DARINI, A. L. C. Emergence of *vanB* phenotype-*vanA* genotype in vancomycin-resistant enterococci in Brazilian hospital. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p. 117-118, 2006.

As referências foram apresentadas segundo as normas adotadas pelo Departamento Técnico do Sistema Integrado de Bibliotecas (DT/SIBI) atendendo à solicitação das Bibliotecas da Universidade de São Paulo.