

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

THAÍS PANHAN MERLO

Comparação genotípica e fenotípica de *Enterococcus faecalis*
resistentes à vancomicina isolados nos anos de 2009 e 2011 em um
hospital de Minas Gerais

São Carlos
2013

THAÍS PANHAN MERLO

Comparação genotípica e fenotípica de *Enterococcus faecalis*
resistentes à vancomicina isolados nos anos de 2009 e 2011 em um
hospital de Minas Gerais

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto
de Física de São Carlos da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ilana Lopes
Baratella da Cunha Camargo

Versão Corrigida
(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2013

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 elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Panhan Merlo, Thais

Comparação genotípica e fenotípica de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina isolados nos anos de 2009 e 2011 em um hospital de Minas Gerais / Thais Panhan Merlo; orientadora Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo - versão corrigida -- São Carlos, 2013.
97 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.

1. *Enterococcus faecalis*. 2. Resistência. 3. Vancomicina. 4. VRE. 5. Tigeciclina. I. Lopes Baratella da Cunha Camargo, Ilana, orient. II. Título.

Aos meus pais, Alexandre e Maria, pelo apoio
e dedicação durante toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ilana L. B. C. Camargo, pelos ensinamentos, paciência, suporte e auxílio nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais, Alexandre e Maria, e ao meu irmão Tiago, pelo apoio e suporte durante os anos de graduação e pós.

Ao meu namorado e sempre companheiro Matheus, pelo apoio em todas as minhas decisões, a paciência e as longas conversas.

À minha avó Alice e meus tios, Marilice, Renato e Mariângela, sem os quais minha chegada até aqui teria sido muito mais difícil. Agradeço pelo carinho e confiança.

À minha prima e amiga Fátima e minha tia Mariana, pelas conversas, conselhos e risadas.

Às minhas queridas amigas de graduação Ana Paula, Jaqueline e Mariana, que sempre me incentivaram e apoiaram.

Às minhas colegas e amigas do LEMiMo, Simoni, Jéssica e Nicoli. Obrigada por me auxiliarem quando precisei, estarem sempre dispostas a discutir todos os assuntos e dúvidas e pelas noites de descontração depois do trabalho.

Aos amigos Evandro e Paola, que passaram logos períodos comigo no laboratório, tentando resolver meus muitos problemas com proteína.

À Susana, que sempre estava disposta a me ajudar no tempo que fiquei no Laboratório de Cristalografia.

Aos funcionários da Pós-graduação, biblioteca e gráfica do IFSC, por serem sempre tão prestativos em tudo o que precisei.

À FAPESP e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Quando a gente acha que tem todas as respostas,
vem a vida e muda todas as perguntas...

Luiz Fernando Veríssimo

RESUMO

MERLO, T. P. **Comparação genotípica e fenotípica de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina isolados nos anos de 2009 e 2011 em um hospital de Minas Gerais.** 2013. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Enterococcus são cocos gram-positivos que ocorrem isolados, aos pares (diplococos) ou em cadeias e pertencem à microbiota intestinal de uma grande variedade de hospedeiros, de mamíferos a insetos. *Enterococcus* foram originalmente considerados organismos de pouca importância clínica, mas têm se revelado importantes patógenos nosocomiais. O fato dos *Enterococcus* possuírem formas de resistência intrínseca e adquirida a vários antibióticos dificulta o tratamento de infecções causadas por eles. *Enterococcus faecalis* é geralmente a espécie predominante entre os enterococos isolados, sendo de 80% a 90% das amostras clínicas. O surgimento de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE- do inglês *vancomycin resistant enterococci*) reduziu significativamente as opções de tratamento. O objetivo deste estudo foi identificar e comparar amostras de *E. faecalis* resistentes à vancomicina (VREfs) isolados em pacientes nos anos de 2009 e 2011, durante um programa de vigilância no Hospital Risoleta Tolentino Neves, em Belo Horizonte, MG. A identificação das espécies foi feita por multiplex-PCR com primers espécie-específicos e os *E. faecalis* foram selecionados para estudo. Foram realizadas a pesquisa da presença dos genes *elrA*, *cylL*, *esp* e *gelE*, a determinação do genótipo responsável pela resistência e a caracterização do transposon que contém o gene de resistência, todos por meio de PCR. Foi também realizada a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de acordo com o CLSI (2013) para vancomicina, linezolid, tigeciclina e daptomicina e testes para resistência a altas concentrações de aminoglicosídeos. Por fim, a tipagem das amostras foi feita através de eletroforese em campo pulsado (PFGE- do inglês *Pulsed Field Gel Eletroforesis*) e MLST (*Multilocus sequence typing*). Foi encontrado que 22,2% dos VRE isolados em 2009 e 61,7% dos isolados em 2011 pertencem à espécie *E. faecalis* e estes foram utilizados no estudo. Houve surgimento de resistência à tigeciclina nos isolados de 2011, sendo 10 isolados resistentes, logo após o início do uso deste antimicrobiano no hospital. Foi encontrado um isolado de 2011 com resistência intermediária à linezolid. Todos os isolados foram sensíveis à daptomicina e altamente resistentes à vancomicina, com CIM maior que 256 µg/mL. Essa

alta resistência à vancomicina é condizente com o genótipo *vanA*, encontrado em todas as amostras. O perfil de virulência prevalente nos VREfs em 2009 era *elrA⁺gelE⁺*, sendo dos pulsotipos A1 e A4 e ST103. Apenas um isolado de 2009, com pulsotipo A1 apresentou o perfil de virulência *cyl⁺elrA⁺gelE⁺*. Em 2011, o perfil de virulência prevalente foi *cyl⁺esp⁺elrA⁺gelE⁺*, sendo que os 12 isolados com esse perfil pertenciam aos pulsotipos B e C e ST6, que ocorreram somente em isolados de 2011. Onze amostras de 2011 apresentaram o perfil *elrA⁺gelE⁺* e foram classificadas no pulsotipo A e seis amostras tem perfil *cyl⁺elrA⁺gelE⁺* e são dos pulsotipos B e D. Resultados de PFGE mostram a inserção no hospital da linhagem ST6, um clone multirresistente amplamente disseminado em hospitais da Itália, Portugal, Espanha e Estados Unidos. Concluiu-se que houve mudanças no perfil de *E. faecalis* resistentes à vancomicina no hospital, ao longo dos dois anos, com aumento de resistência e linhagens mais virulentas, sendo estes motivos de preocupação.

Palavras chave: *Enterococcus faecalis*. Resistência. Vancomicina. VRE. Tigeciclina.

ABSTRACT

MERLO, T. P. **Genotypic and phenotypic comparison of vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* isolated in 2009 and 2011 in a hospital in Minas Gerais.** 2013. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Enterococci are Gram-positive cocci occurring isolated, in pairs (diplococci) or chains and belong to the intestinal tract of a wide variety of hosts, from mammalian to insect. *Enterococcus* organisms were originally considered of little clinical importance, but have proved important nosocomial pathogens. The fact that *Enterococcus* possess intrinsic and acquired resistance to multiple antibiotics complicates the treatment of infections caused by them. *Enterococcus faecalis* is usually the predominant species among enterococci isolates, with 80% to 90% of the clinical samples. The emergence of vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) significantly reduced the treatment options. The aim of this study was to identify and compare samples of vancomycin-resistant *E. faecalis* (VREfs) in patients in the years 2009 and 2011, during a surveillance program in Hospital Risoleta Tolentino Neves, Belo Horizonte, MG. Species identification was done by multiplex-PCR with primers species-specific and *E. faecalis* were selected for this study. Tests were conducted for the presence of genes *elrA*, *cyiLL*, *esp* and *gelE*, the determination of the genotype responsible for the resistance and characterization of transposon containing the resistance gene, all by PCR. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined according to the CLSI (2013) to vancomycin, linezolid, daptomycin and tigecycline and tests for resistance to high concentrations of aminoglycosides. Finally, the samples typing was performed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST). It was found that 22.2 % of VRE isolates in 2009 and 61.7 % of isolates in 2011 belong to the species *E. faecalis* and these were used in the study. There was emergence of tigecycline resistance in 2011, with 10 resistant isolates, after the introduction of this drug in the hospital. One isolate from 2011 showed intermediate resistance to linezolid. All isolates were sensitive to daptomycin and highly vancomycin resistant, with MICs greater than 256 mg / mL. This high resistance to vancomycin is consistent with the *vanA* genotype found in all samples. The virulence profile prevalent in VREfs in 2009 was *elrA*⁺*gelE*⁺, belonging to the pulsotypes A1 and A4 and

ST103. Only one isolate from 2009, presented pulsotype A1 and the virulence profile *cyl⁺elrA⁺gelE⁺*. In 2011, the prevalent virulence profile was *cyl⁺esp⁺elrA⁺gelE⁺*, and the 12 isolates with this profile belonged to pulsotypes B and C and ST6, which occurred only in 2011 isolates. Eleven isolates from 2011 have the profile *elrA⁺gelE⁺* and were classified as pulsotype A, six isolates have profile *cyl⁺elrA⁺gelE⁺* and are of pulsotypes B and D. PFGE results show the insertion of ST6 lineage in the hospital, a multiresistant clone widely disseminated in hospitals in Italy, Portugal, Spain and the United States. It was concluded that there were changes in the profile of *E. faecalis* resistant to vancomycin in the hospital over the two years, with increased resistance and more virulent strains, which are of concern.

Key words: *Enterococcus faecalis*. Resistance. Vancomycin. VRE. Tigecycline.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Síntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana. Inicialmente, no citoplasma, a N-acetilglicosamina (NAG) é ativada pela adição de uridina difosfato (UDP), formando UDP-NAG, que reage com o fosfoenolpiruvato formando UDP-NAM. Ao UDP-NAM são adicionados os resíduos L-Ala, D-Glu, L-Lys e o dipeptídeo D-Ala-D-Ala. O NAM-pentapeptídeo é transferido do UDP o bactoprenol (BP). Um resíduo de NAG é então doado pelo UDP-NAG e se liga ao NAM e cinco resíduos de glicina são adicionados à lisina do pentapeptídeo. O BP transporta o monômero para o exterior da membrana e o NAM do monômero de peptidoglicano se une ao NAG na cadeia de peptidoglicanos em crescimento. O BP é liberado e as proteínas ligadoras de penicilina (PBP), catalisam a ligação entrecruzada das cadeias polissacarídicas adjacentes. Adaptado (30)..... 29
- Figura 2- Ligações de hidrogênio entre a vancomicina e a porção terminal D-Ala-D-Ala do precursor de peptideoglicano. Adaptado (33). 30
- Figura 3 - Esquema representativo do mecanismo de resistência à vancomicina. Nos *Enterococcus* sensíveis à vancomicina ocorre a ligação de alta afinidade entre vancomicina e a região terminal D-Ala-D-Ala do pentapeptídeo dos monômeros, inibindo a síntese da parede celular. Nos enterococcus resistentes à vancomicina, a presença da droga leva a formação de precursores de baixa afinidade com a droga e a síntese de parede celular. 31
- Figura 4 - Estrutura do transposon Tn1546 com os genes associados ao genótipo de resistência vanA. IRL e IRR são as extreminidades de repetição. As setas indicam os genes. Adaptado (46) 32
- Figura 5- Ilustração do mecanismo de resistência VanA e das funções das proteínas envolvidas no processo. A proteína VanS detecta a presença do glicopeptídeo e promove a fosforilação da proteína VanR, que aumenta a transcrição dos genes de resistência. A proteína VanH produz D-Lac à partir do piruvato, o qual é utilizado pela ligase VanA para a produção de D-Ala-D-Lac, o qual é incorporado na formação dos monômeros de peptideoglicanos modificados. VanX realiza a hidrólise da ligação D-Ala-Ala, reduzindo a disponibilidade deste dipeptídeo e minimizando a síntese do peptideoglicano nativo, enquanto VanY cliva o D-Ala terminal de qualquer precursor nativo da parede celular que tenha sido produzido. Adaptado (6; 44). 34

Figura 6- Estrutura do lipopeptídeo cíclico daptomicina. Adaptado (33).....	37
Figura 7- Estrutura da tigeciclina, uma glicilciclina. Adaptado (74).....	39
Figura 8- Estrutura da linezolida, o primeiro membro da classe das oxazolidinonas. Adaptado (74).....	40
Figura 9- Locais dos primers para a detecção de mutações no transposon Tn1546.	49
Figura 10- Mudança de coloração da resazurina na presença de crescimento bacteriano com células de <i>Enterococcus faecalis</i>	53
Figura 11- Gel de Multiplex-PCR. 1- controle <i>E. casseliflavus</i> NCTC 1261, 2- controle <i>E. faecium</i> NCTC 7171, 3- controle <i>E. gallinarum</i> NCTC 12359, 4- controle <i>E. faecalis</i> NCTC 775, 5- controle negativo (sem presença de DNA), 6- marcador de peso molecular GeneRuler plus 1kb DNA Ladder (Fermentas), 7- VRE 65, 8- VRE 66, 9- VRE 67, 10- VRE 68, 11- VRE 69, 12- marcador de peso molecular GeneRuler plus 1kb DNA Ladder (Fermentas), 13- VRE 70, 14- VRE 71.....	59
Figura 12- Gel de agarose 1% do PCR para amplificação do gene <i>vanA</i> . 1- Amostra controle negativo; 2- controle positivo <i>E. faecalis vanA</i> ; 3- marcador de peso molecular GeneRuler plus 1kb DNA Ladder (Fermentas); 4- VREfs 72; 5- VREfs 94; 6- VREfs 95; 7- VREfs 96; 8- VREfs 97; 9- VREfs 98; 10- VREfs 99	61
Figura 13- Gel de agarose 1% do PCR após realização do Long-PCR 2/3. 1- Amostra controle negativo; 2- controle positivo <i>E. faecalis A</i> ; 3- marcador de peso molecular GeneRuler plus 1kb DNA Ladder (Fermentas); 4- VREfs 68; 5- VREfs 69; 6- VREfs 74; 7- VREfs 74.	62
Figura 14- Produto de amplificação dos primers P17 e P18 em gel de agarose a 1%. 1 - Controle positivo <i>E. faecalis vanA</i> ; 2 - marcador de peso molecular GeneRuler plus 1kb; 3- <i>E. faecalis</i> VREfs 15, onde nota-se a presença dos dois fragmentos de tamanhos diferentes do esperado.	63

- Figura 15- Gel de agarose 1% com algumas das amostras do PCR para a prevalência do gene *elrA*. 1- Controle negativo; 2- controle positivo *E. faecalis* OG1RF, 3- marcador de peso molecular GeneRuler plus 1kb (Fermentas), 4- VREfs 65; 5- VREfs 67; 6- VREfs 68; 7- VREfs 69; 8- VREfs 72..... 64
- Figura 16- Gel de agarose 1% com algumas das amostras do PCR para a prevalência do gene *esp*. 1- Controle negativo; 2- controle positivo *E. faecalis* MMH594, 3- marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Jena Bioscience); 4- VREfs 65; 5- VREfs 67; 6- VREfs 68; 7- VREfs 69; 8- VREfs 72. 64
- Figura 17- Gel de agarose 1% com algumas das amostras do PCR para a prevalência do gene *cyLL*. 1- Controle negativo; 2- controle positivo *E. faecalis* MMH594, 3- marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Jena Bioscience); 4- VREfs 65; 5- VREfs 67; 6- VREfs 68; 7- VREfs 69; 8- VREfs 72. 65
- Figura 18- Gel de agarose 1% com algumas das amostras do PCR para a prevalência do gene *gelE*. 1- Controle negativo; 2- controle positivo *E. faecalis* OG1RF, 3- marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Jena Bioscience); 4- VREfs 108; 5- VREfs 109; 6- VREfs 110..... 65
- Figura 19- Dendrograma dos padrões de PFGE e informações dos isolados. ST- Tipo de sequência; TIG- Tigeciclina; VAN- Vancomicina; LZD- Linezolida; DAP- Daptomicina; R- Resistente; I-Intermediário; S- sensível. 70
- Figura 20- Diagrama realizado pelo eBURST v3 representando STs registrados no banco de dados de *E. faecalis* e as relações entre eles. Os números são os STs. Linhas que unem dois pontos representam STs com variação em um locus e o tamanho do ponto é proporcional ao número de isolados no banco de dados classificados como tal ST. O círculo azul mostra o ST103 e o círculo vermelho o complexo clonal 2, com o ST6 como seu fundador..... 72
- Figura 21- Representação do CC2. O ST6 é o fundador. Os números são os STs. Linhas que unem dois pontos representam STs com variação em um locus e o tamanho do ponto é proporcional ao número de isolados no banco de dados. O ST6 é variante em três locus do ST2, que dá nome ao complexo clonal. 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequência de primers para a identificação das espécies de <i>Enterococcus</i>	45
Tabela 2- Sequência dos primers utilizados na reação de detecção do gene <i>vanA</i>	46
Tabela 3- Sequência dos primers utilizados para a caracterização do transposon <i>Tn1546</i>	47
Tabela 4- Primers para a detecção de mutação no transposon <i>Tn1546</i> através de <i>overlapping</i> PCR.	48
Tabela 5- Primers para a amplificação dos genes dos fatores de virulência.	50
Tabela 6- Parâmetros de corte para a resistência em <i>Enterococcus</i> spp.	53
Tabela 7- Primers para a realização do MLST para <i>E. faecalis</i>	56
Tabela 8- Visualização global da sensibilidade das amostras aos antimicrobianos testados...	68
Tabela 9- Resultado do MLST de cada Pulsotipo.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BP	Bactoprenol
CC	Complexo Clonal
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
Cyl	Citolisina
D-Ala	D-alanina
D-Ala-D-Ala	D-alanil-D-alanina
DAP	Ácido Diaminopimélico
D-Lac	D-Lactato
DLV	<i>Double Locus Variant</i>
DNA	Ácido Desoxirrinonucleico
D-Ser	D-Serina
ElrA	Proteína A Enterococica Rica em Leucinas
Esp	Proteína de Superfície de Enterococos
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GeI	Gelatinase
HLAR	<i>High Level Aminoglycoside Resistance</i>
HLGR	<i>High Level Gentamicin Resistance</i>
HLSR	<i>High Level Streptomycin Resistance</i>
IS	<i>Insertion Sequence</i>
MLST	<i>Multilocus Sequencing Typing</i>
MRSA	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
NAG	N-acetilglicosamina
NAM	Ácido N-acetilmurâmido
pb	Pares de Base
PBP	<i>Penicilin Binding Protein</i>

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Eletroforesis</i>
PRY	L-pirrolidonil- β -naftilamida (PYR)
RNA	Ácido Rinonucleico
RND	<i>Resistance-Nodulation-Division</i>
rRNA	RNA Ribossômico
SLV	<i>Single Locus Variant</i>
ST	<i>Sequence Type</i>
tRNA	RNA Transportador
UDP	Uridina Difosfato
VRE	<i>Vancomycin-Resistant Enterococci</i>
VREfs	<i>Enterococcus faecalis</i> resistentes à vancomicina

SUMÁRIO

1	Introdução.....	25
1.1	<i>Enterococcus</i>	25
1.2	<i>Enterococcus</i> resistentes à vancomicina	26
1.2.1	Mecanismo de ação da vancomicina	28
1.2.2	Mecanismos de resistência à vancomicina	30
1.3	Fatores de Virulência em <i>Enterococcus faecalis</i>	35
1.4	Novas alternativas para o tratamento de infecções causadas por VREs.....	36
1.4.1	Daptomicina.....	37
1.4.2	Tigeciclina	38
1.4.3	Linezolida	39
2	Objetivos	41
2.1	Objetivos específicos	41
3	Materiais e Métodos.....	43
3.1	Amostras	43
3.1.1	Extração do DNA dos isolados	44
3.1.2	Identificação das espécies.....	44
3.2	Detecção do gene <i>vanA</i>	46
3.3	Caracterização do Transposon Tn1546.....	46
3.4	Detecção de genes de virulência.....	49
3.5	Detecção da produção de hemolisina	51
3.6	Triagem para altos níveis de resistência a aminoglicosídeos.....	51
3.7	Determinação da concentração inibitória mínima	52
3.8	Tipagem Molecular.....	53
3.8.1	Tipagem por eletroforese de campo pulsado (PFGE).....	53
3.8.2	Tipagem por MLST.....	55
4	Resultados e Discussão	59
4.1	Identificação das Espécies	59
4.2	Detecção do gene <i>vanA</i>	61
4.3	Caracterização do Transposon Tn1546.....	61
4.4	Detecção de genes de fatores de virulência	63
4.5	Detecção da produção de hemolisina	66

4.6 Triagem para altos níveis de resistência a aminoglicosídeos (HLAR - <i>high level aminoglycoside resistance</i>).....	66
4.7 Determinação da concentração inibitória mínima.....	67
4.8 Tipagem Molecular.....	68
5 Conclusões.....	75
REFERÊNCIAS.....	79
Anexo I- <i>Enterococcus</i> resistentes à vancomicina isolados e sua identificação.....	91
Anexo II- Dados do estudo dos isolados de <i>E. faecalis</i>	95

1 Introdução

1.1 *Enterococcus*

O nome “entérocoque” foi utilizado inicialmente por Thiercelin na França, em 1899, em uma referência à origem intestinal de novos diplococos gram-positivos (1). Enterococos foram originalmente incluídos no gênero *Streptococcus*, sendo as espécies mais comumente encontradas *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium*. Na década de 1980, estudos genéticos indicaram diferenças entre os enterococos e as outras bactérias do gênero *Streptococcus*, levando à criação de um novo gênero, *Enterococcus*, no qual as espécies passaram a ser denominadas *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, entre outras (2-3). O gênero *Enterococcus* inclui pelo menos 37 espécies, que diferem em produção de pigmentos, motilidade e habilidade de produzir ácidos a partir de vários carboidratos (4-5).

Organismos do gênero *Enterococcus* são gram-positivos, anaeróbios facultativos e ocorrem sozinhos, aos pares ou como cadeias curtas. Possuem a capacidade de crescer a concentrações de 6,5% de cloreto de sódio (NaCl), altos pHs e, embora sua temperatura ideal de crescimento seja 35 °C, são capazes de crescer em temperaturas de 10 a 45 °C (6). Enterococos são capazes de hidrolisar bile-esculina e L-pirrolidoni-β-naftilamida (PYR) e a maioria é capaz de sobreviver à temperatura de 60 °C por 30 minutos (1;7). São bactérias comensais do intestino humano e ocasionalmente podem habitar a cavidade oral e vaginal (8).

Enterococcus foram originalmente considerados organismos de pouca importância clínica, mas têm se revelado importantes patógenos nosocomiais (7;9). Dados recentes indicam que *Enterococcus* correspondem a 12% dos isolados associados a infecções durante o tratamento de saúde nos Estados Unidos da América (EUA), sendo o terceiro patógeno nosocomial mais comum, ficando apenas atrás de *Staphylococcus coagulase negativo* e *Staphylococcus aureus* (10). No Brasil, a falta de publicações oficiais e de um laboratório de microbiologia central de referência dificulta a obtenção de dados sobre resistência bacteriana, mas sabe-se que *Enterococcus* são a oitava ou nona causa de infecção humana no Brasil e América Latina (11).

Duas espécies de *Enterococcus*- *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*- são responsáveis pela maioria das infecções humanas, sendo que outras espécies do gênero (*E.*

gallinarum, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. avium* e *E. raffinosus*) representam menos de 5% dos isolados clínicos (3).

O fato de *Enterococcus* possuírem formas de resistência intrínseca* e adquirida† a uma variedade de antibióticos faz desse gênero ponto de atenção entre os patógenos nosocomiais (1) e tem influenciado no aumento da sua prevalência nas infecções humanas (7). Entre as resistências intrínsecas apresentadas por enterococos estão resistência aos β -lactâmicos, cefalosporinas e baixos níveis de resistência aos aminoglicosídeos e clindamicina (1). Exemplos de resistência adquirida incluem altos níveis de resistência a aminoglicosídeos e glicopeptídeos (8). A capacidade de adquirir resistência a praticamente todos os antibióticos disponíveis e o fato de que podem sobreviver por longos períodos em superfícies no ambiente, como equipamentos médicos, maçanetas e grades das camas, faz com que estes organismos se encontrem disseminados em ambiente hospitalar (3;12).

Enterococcus faecalis é geralmente a espécie predominante entre os enterococos isolados, sendo de 80% a 90% das amostras clínicas (13). Assim como as outras espécies do gênero, *E. faecalis* possui resistência intrínseca à antibióticos, entre eles a penicilina, cuja concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro* é de 10 a 100 vezes maior que a maioria dos estreptococos, (1) devido a proteína ligadora de penicilina (PBP, do inglês *penicilin binding protein*) possuir afinidade baixa à penicilina. Possui ainda resistência à quinupristina-dalfopristina, uma droga aprovada em casos de resistência à vancomicina em outras bactérias do gênero (2;14). A aquisição de resistência a vancomicina, que é usada no tratamento de infecções causadas por patógenos gram-positivos resistentes à drogas, faz do *E. faecalis* um patógeno nosocomial resistente a maioria das opções terapêuticas (15).

1.2 *Enterococcus* resistentes à vancomicina

Vancomicina é um glicopeptídeo de massa molecular de aproximadamente 1450Da que é produzido pela *Streptomyces orientalis* e tem efeito bactericida na maioria dos organismos gram-positivos, mas não possui efeito contra gram-negativos (16-17).

* Resistência intrínseca é uma característica usual das espécies, presente na maioria das linhagens, normalmente presente nos cromossomos.

† Resistência adquirida resulta de mutação no DNA existente ou da aquisição de DNA novo.

A vancomicina foi aprovada para uso humano pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) em 1958. A aprovação ocorreu antes mesmo de estudos detalhados sobre sua eficácia, devido à falta de uma alternativa efetiva no tratamento de infecções causadas por estafilococos resistentes à penicilina. Pouco tempo depois da aprovação, o uso da vancomicina caiu devido a descoberta de toxicidade, sendo ela substituída por novos agentes, menos tóxicos e igualmente eficientes, e seu uso foi reservado para casos de pacientes alérgicos aos β -lactâmicos ou organismos resistentes aos novos agentes. Na década de 80 houve um grande aumento no uso da vancomicina, devido ao aumento na incidência de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA, do inglês *methicillin-resistant S. aureus*) e *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina, para os quais a vancomicina é o antibiótico indicado. O sucesso da vancomicina para tratamento de enterocolite pseudomembranosa também contribuiu para o aumento no seu uso (18).

O aumento no uso de vancomicina foi responsável, pelo menos em parte, pelo surgimento dos *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE, do inglês *vancomycin-resistant enterococci*). O uso do glicopeptídeo avoparcina como promotor de crescimento nas criações de animais também é proposto como fator na seleção das bactérias resistentes. A avoparcina foi utilizada na Europa até 1997, quando seu uso foi proibido na União Europeia devido aos estudos que documentavam a relação entre seu uso e a incidência de VRE (19). Hoje, sabe-se que a resistência à vancomicina ocorre na natureza há muito tempo e é anterior ao uso de antibióticos (20). Mecanismos muito similares aos que causam alta resistência à vancomicina nos enterococos foram relatados em bactérias do gênero *Paenibacillus* isoladas no solo, sugerindo que a resistência encontrada nesses microrganismos tenha evoluído de um ancestral comum (21).

O primeiro de surto de VRE foi relatado em 1988 e ocorreu na Inglaterra, onde 55 amostras resistentes foram isoladas, sendo 48 *E. faecium* e 7 *E. faecalis* (22). Após este primeiro relato, VRE foram isolados em outras partes mundo (13;23-25).

No Brasil, o primeiro caso de VRE ocorreu em 1996, quando uma garota de 9 anos morreu devido à sepse associada à infecção por *E. faecium* resistente à vancomicina, no estado do Paraná (26). O primeiro caso de surto no país ocorreu em São Paulo, em 1998, e a maioria das amostras clínicas e de colonização pertenciam à espécie *Enterococcus faecalis* (27).

Até os anos 90 a maioria das infecções causadas por enterococos era tratada com sucesso por uma combinação de aminoglicosídeos e vancomicina. O surgimento da resistência e prevalência dos VRE reduziu significativamente as opções de tratamento (28).

1.2.1 Mecanismo de ação da vancomicina

Vancomicina, assim como os outros antibióticos da classe dos glicopeptídeos, age inibindo a síntese de peptidoglicanos constituintes da parede celular bacteriana (29).

Os peptidoglicanos que garantem rigidez e resistência à parede celular são copolímeros lineares em que se alternam a N-acetilglicosamina (NAG) e o ácido N-acetilmurâmido (NAM) ligados por ligações peptídicas e peptídeos curtos ligados ao NAM (30). A biossíntese da parede celular bacteriana ocorre em três estágios - síntese de monômeros de peptidoglicanos, polimerização dos monômeros e ligação cruzada dos polímeros (31). A Figura 1 mostra em detalhe esse processo.

O primeiro estágio da biossíntese ocorre no citoplasma e nele ocorre a síntese dos precursores da parede celular. Inicialmente a NAG é sintetizada e ativada pela adição do nucleotídeo uridina difosfato (UDP), formando UDP-NAG, que reage com o fosfoenolpiruvato formando UDP-NAM. A seguir as peptídeo transferases MurC, MurD, MurE e MurF adicionam sequencialmente L-alanina, D-glutamato e L-lisina ou ácido diaminopimérico (DAP)* e o díptídeo D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala) ao UDP-NAM. O NAM-pentapeptídeo é então transferido do nucleotídeo de uridina para um lipídeo carreador de membrana, o bactoprenol (BP). Um resíduo de NAG é então doado pelo UDP-NAG e se liga ao NAM. Nas bactérias Gram-positivas, cinco resíduos de glicina em ligação peptídica são adicionados ao resíduo de lisina do pentapeptídeo. Assim, a síntese do monômero de peptidoglicano está completa.

No início da segunda etapa, o BP transporta o monômero para o exterior da membrana celular e as fases que se seguem ocorrem fora do citoplasma. Na segunda etapa, o NAM do monômero de peptidoglicano se une ao NAG na cadeia de peptidoglicanos em crescimento, uma reação catalisada pela transglicosilase, e o BP é liberado.

Por fim, na terceira etapa, a transpeptidase, também chamada de proteína ligadora de penicilina (PBP), catalisa a ligação entrecruzada das cadeias polissacarídicas adjacentes.

* A maioria das bactérias Gram-positivas utilizam a L-lisina, enquanto a DAP é utilizada por uma minoria das Gram-positivas e pelas bactérias Gram-negativas

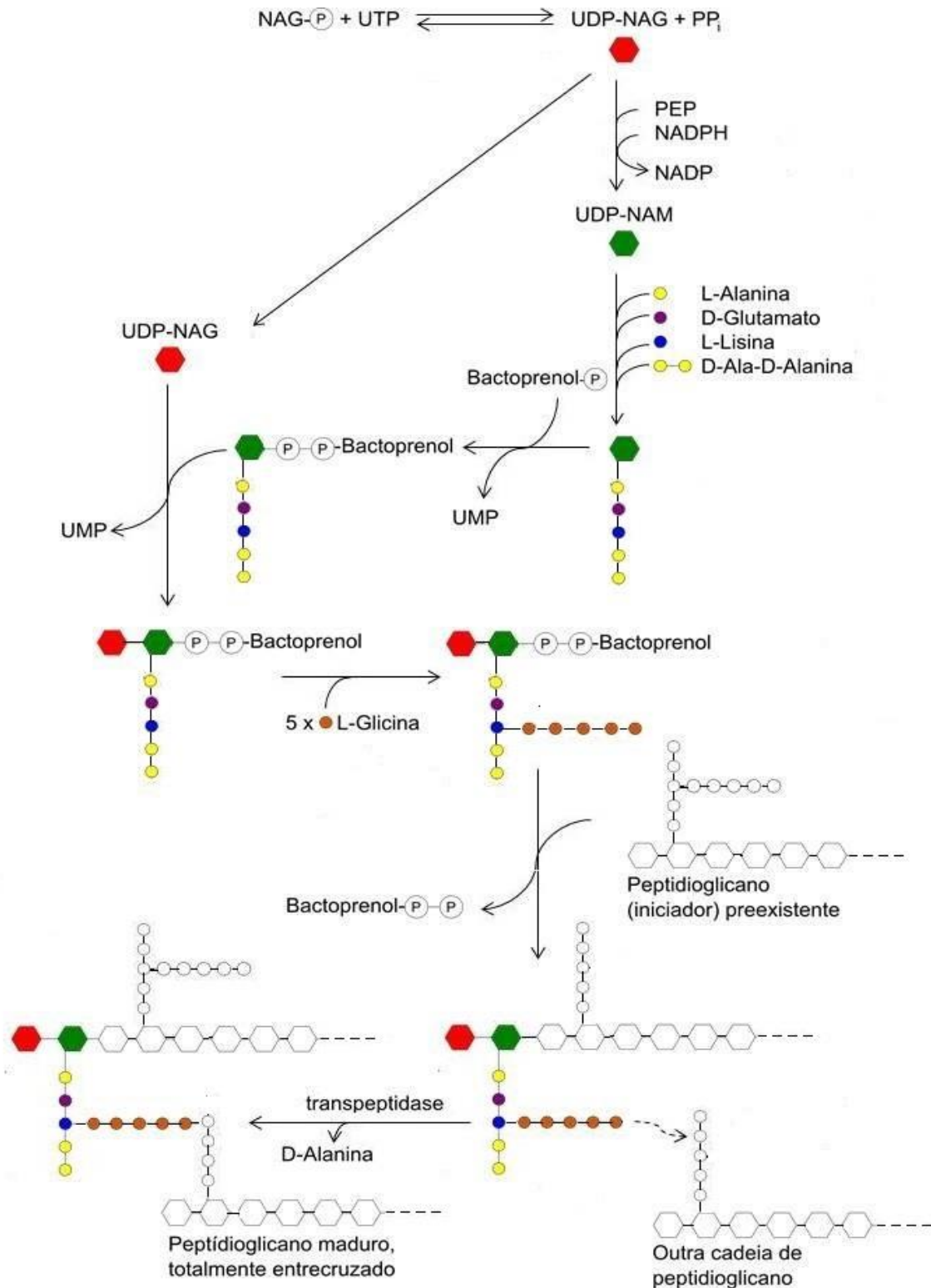


Figura 1- Síntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana. Inicialmente, no citoplasma, a N-acetilglicosamina (NAG) é ativada pela adição de uridina difosfato (UDP), formando UDP-NAG, que reage com o fosfoenolpiruvato formando UDP-NAM. Ao UDP-NAM são adicionados os resíduos L-Ala, D-Glu, L-Lys e o dipeptídeo D-Ala-D-Ala. O NAM-pentapeptídeo é transferido do UDP o bactoprenol (BP). Um resíduo de NAG é então doado pelo UDP-NAG e se liga ao NAM e cinco resíduos de glicina são adicionados à lisina do pentapeptídeo. O BP transporta o monômero para o exterior da membrana e o NAM do monômero de peptidoglicano se une ao NAG na cadeia de peptidoglicanos em crescimento. O BP é liberado e as proteínas ligadoras de penicilina (PBP), catalisam a ligação entrecruzada das cadeias polissacarídicas adjacentes. Adaptado (30).

A vancomicina age impedindo a segunda etapa da síntese da parede celular. Ao se ligar com grande afinidade à região D-Ala-D-Ala do pentapeptídeo por meio de cinco ligações de hidrogênio, como mostrado na Figura 2, a droga causa impedimento estereoquímico para a ligação da enzima transglicosilase, bloqueando a adição dos precursores à cadeia nascente de peptidoglicanos por transglicosilação e prevenindo a subsequente ligação cruzada por transpeptidação (32).

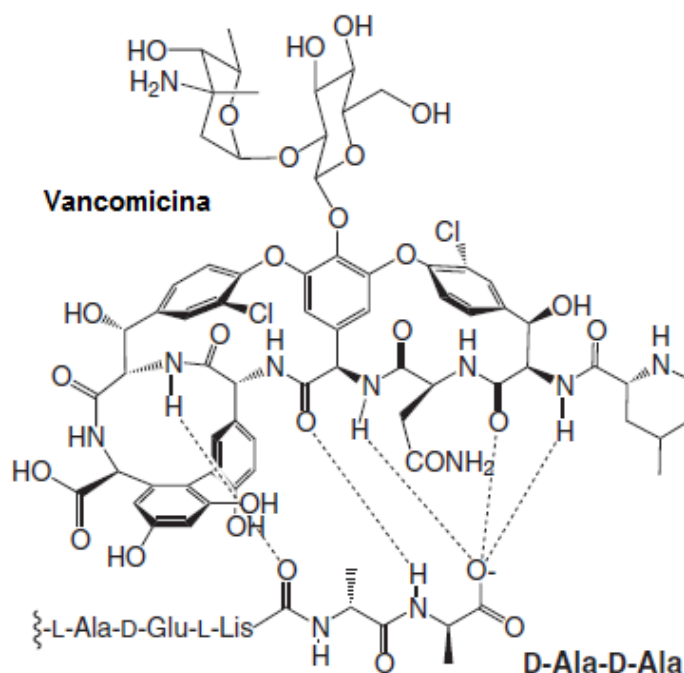


Figura 2- Ligações de hidrogênio entre a vancomicina e a porção terminal D-Ala-D-Ala do precursor de peptidoglicano. Adaptado (33).

1.2.2 Mecanismos de resistência à vancomicina

Existem pelo menos nove tipos de resistência à vancomicina descritos na literatura (7;34) e em todos eles a resistência aos glicopeptídeos ocorre devido à modificação da região de afinidade D-Ala-D-Ala nos precursores da parede celular na presença da droga, com a substituição do D-Ala terminal por D-Serina (D-Ser) ou D-Lactato (D-Lac), como mostrado na Figura 3. A modificação dos precursores faz com que glicopeptídeos se liguem a eles com uma afinidade até dez mil vezes menor que nos monômeros normais (7;12).

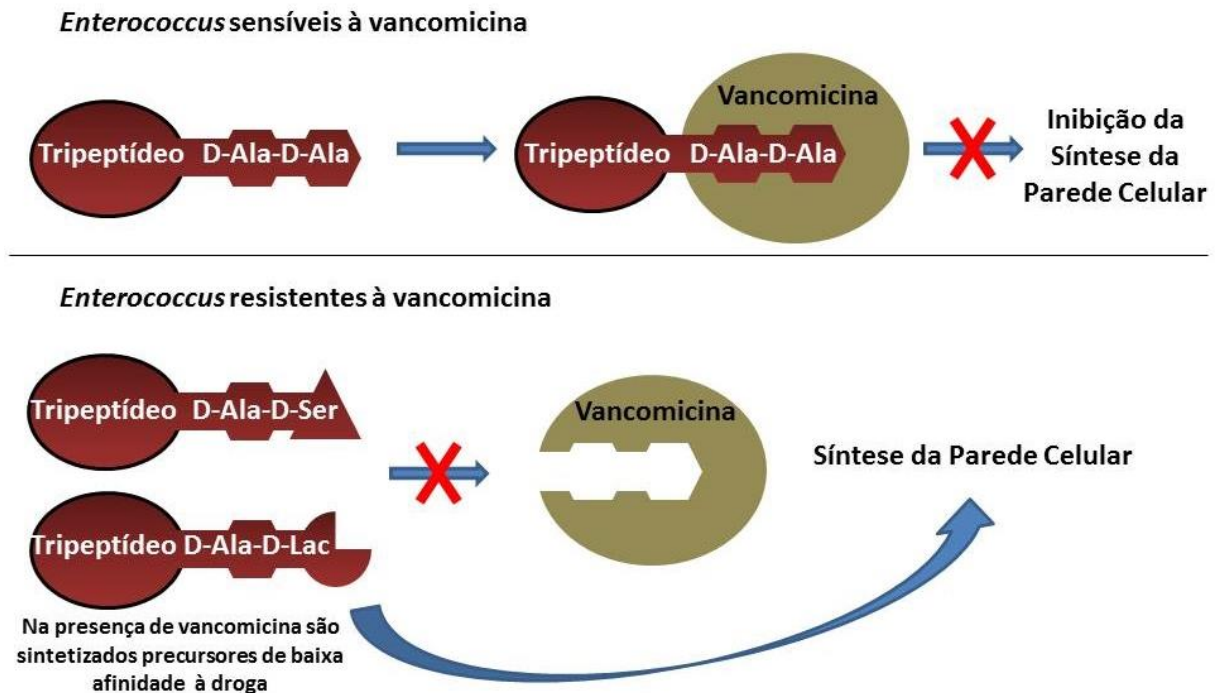


Figura 3 - Esquema representativo do mecanismo de resistência à vancomicina. Nos *Enterococcus* sensíveis à vancomicina ocorre a ligação de alta afinidade entre vancomicina e a região terminal D-Ala-D-Ala do pentapeptídeo dos monômeros, inibindo a síntese da parede celular. Nos enterococcus resistentes à vancomicina, a presença da droga leva a formação de precursores de baixa afinidade com a droga e a síntese de parede celular.

Os genes que conferem resistência estão localizados em um operon, o qual pode ou não ser transferível de uma célula para outra, podendo assim se localizar em plasmídeos ou no DNA cromossômico (32). Os operons que codificam ligases de D-Lac resultam em alta resistência, com concentração inibitória mínima (CIM) maior que 256 µg/mL, sendo estes operons VanA, VanB, VanD e VanM. Já os operons que codificam ligases de D-Ser conferem baixa resistência, com CIM entre 8 e 16 µg/mL, sendo estes VanC, VanE, VanG, VanL e VanN (7).

VanA e VanB são os operons mais prevalentes nas infecções causadas por VRE (7). No fenótipo VanA, os *Enterococcus* são resistentes a altas concentrações de vancomicina e teicoplanina e a resistência é induzida na presença de qualquer uma dessas drogas. No caso do fenótipo VanB, os organismos são resistentes à vancomicina, mas permanecem sensíveis à teicoplanina (3;35).

O fenótipo VanA é o mais estudado e modelo para entender o mecanismo molecular da resistência (8;35-36). No Brasil, o fenótipo VanA é predominante nos estudos com VRE isolados em hospitais (37-41).

O *cluster* de genes associados ao fenótipo VanA está localizado no transposon Tn1546, que possui 10851 pares base (pb) e é delimitado em ambas as extremidades por repetições imperfeitas, de 38 pb (42). Tn1546 não codifica funções conjugativas e a disseminação do transposon só pode ocorrer após sua integração em elementos de transposição, como plasmídeos e transposons conjugativos (6). O transposon codifica os genes *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY* e *vanZ*, dispostos conforme mostra a Figura 4, e é altamente conservado, exceto pela presença de sequências de inserção (IS- do inglês *insertion sequence*) em regiões intergênicas que não são essenciais para a expressão da resistência (32). Alterações no Tn1546 já foram detectadas no Brasil (37;43) e esses transposons alterados são denominados Tn1546-like elements ou elementos VanA.

O transposon Tn1546 é ocasionalmente encontrado no DNA cromossômico, como parte de elementos de conjugação maiores que ele, embora esteja comumente presente em plasmídeos (44). Ele pode ser encontrado tanto em plasmídeos conjugativos, como não conjugativos e transferido horizontalmente através dos plasmídeos conjugativos (7). Além da transferência horizontal de plasmídeos contendo o elemento VanA entre *Enterococcus*, a transferência entre *Enterococcus* e *Staphylococcus aureus* já foi detectada (45;46).

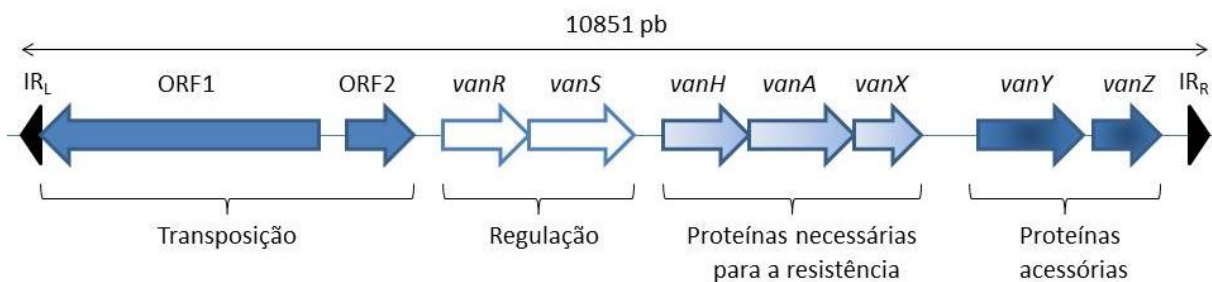


Figura 4 - Estrutura do transposon Tn1546 com os genes associados ao genótipo de resistência vanA. IRL e IRR são as extremidades de repetição. As setas indicam os genes. Adaptado (46)

O gene *vanA* codifica a proteína VanA, uma ligase de substrato alterado que produz D-Ala-D-Lac em lugar de D-Ala-D-Ala. A proteína VanA sozinha não é capaz de conferir a resistência à vancomicina, uma vez que o D-Lactato não é um componente tipicamente

encontrado no ambiente em que vivem os enterococos, nem é produzido naturalmente por eles (3;8).

A proteína VanH, codificada pelo gene *vanH*, é a D-hidroxi ácido desidrogenase responsável por produzir o D-Lactato a partir do piruvato, permitindo que a proteína VanA utilize o D-Lac como seu substrato e este seja incorporado aos monômeros de peptideoglicano que formarão a parede celular (3;47).

A proteína VanX, codificada pelo gene *vanX*, é uma D,D-dipeptidase, que possui baixa atividade contra D-Ala-D-Lac. Essa enzima realiza a hidrólise da ligação D-Ala-D-Ala, reduzindo a disponibilidade deste dipeptídeo e minimizando a síntese do peptideoglicano nativo. Na ausência do gene *vanX* a quantidade de monômeros terminados em D-Ala-D-Ala e D-Ala-D-Lac se equiparam e ela se torna sensível aos glicopeptídeos (3;47).

Análises dos precursores da parede celular em linhagens de *E. faecalis* produtores das proteínas VanA, VanH e VanX mostram que há predominantemente (98%) monômeros de peptideoglicanos terminados em D-Ala-D-Lac (47). Dessa forma os genes *vanA*, *vanX* e *vanH* são normalmente chamados de genes necessários para a resistência.

A expressão dos genes *vanHAXYZ* é regulada pelas proteínas VanR e VanS e ativada em resposta à presença do glicopeptídeo. VanS consiste de uma proteína transmembrana com dois domínios: o domínio N-terminal associado à membrana atua como sensor, detectando a presença do glicopeptídeo e o domínio citoplasmático C-terminal, que catalisa a autofosforilação da VanS na presença do antibiótico. A VanS ativada então fosforila a proteína VanR (7;48-49).

A proteína VanR fosforilada aumenta a transcrição dos genes *vanX*, *vanA*, *vanH*, *vanY* e *vanZ* através de interação com regiões promotoras específicas. VanR ainda interage com sua própria região promotora, aumentando a transcrição dos genes *vanR* e *vanS* (7).

O gene *vanY* codifica para uma D,D-carboxipeptidase, que cliva o D-Ala terminal de qualquer precursor nativo da parede celular que tenha sido produzido, contribuindo modestamente para os níveis de resistência (3).

O mecanismo de ação da proteína VanZ é ainda desconhecido, mas se sabe que ela confere baixos níveis de resistência à teicoplanina, mesmo na ausência das outras proteínas presentes codificadas pelo transposon (7;50).

ORF1 e ORF2 codificam uma resolvase e uma transposase, respectivamente, com funções na transposição (47).

A Figura 5 mostra esquematicamente a ação das proteínas na resistência, conforme foi descrito.

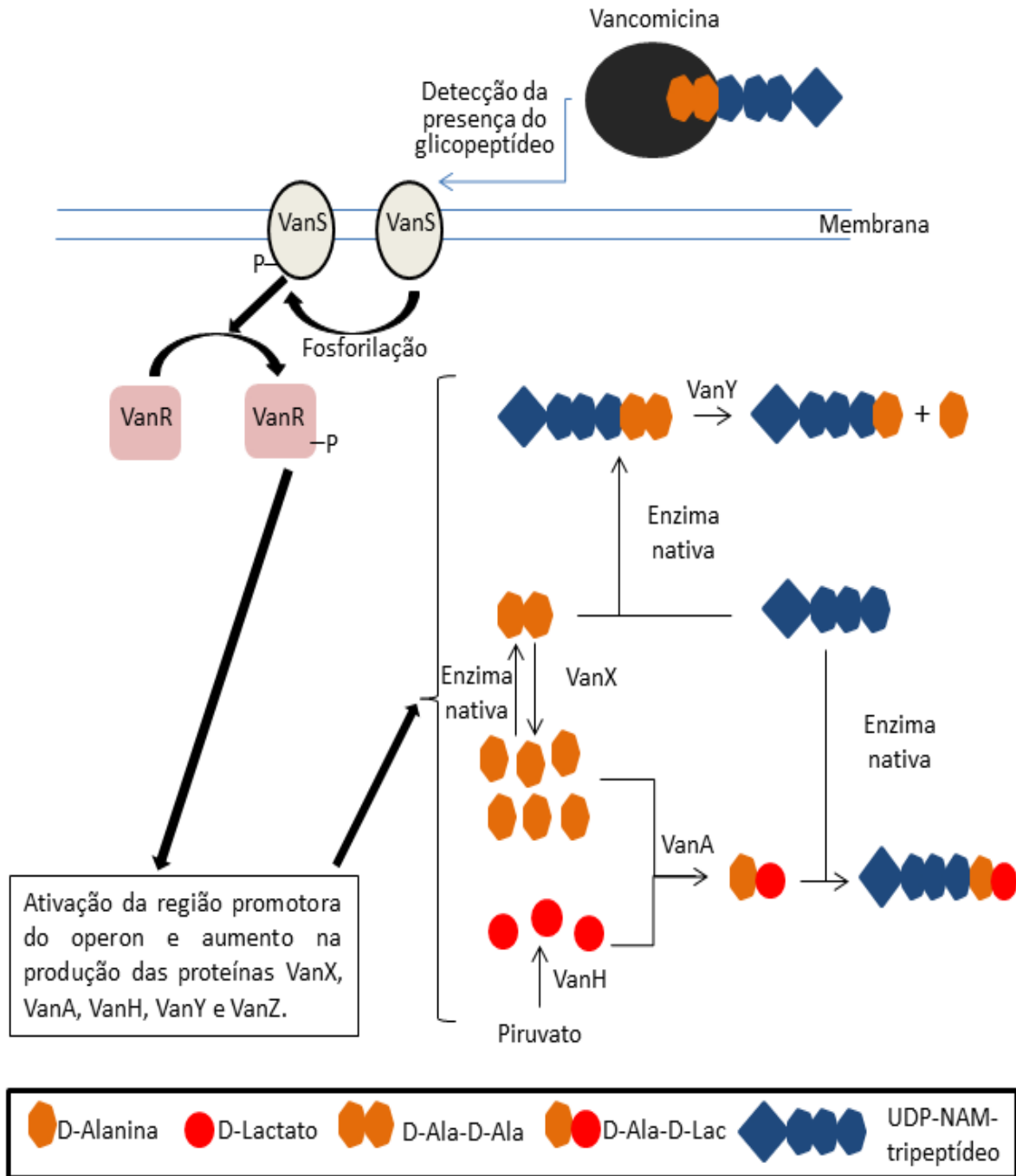


Figura 5- Ilustração do mecanismo de resistência VanA e das funções das proteínas envolvidas no processo. A proteína VanS detecta a presença do glicopeptídeo e promove a fosforilação da proteína VanR, que aumenta a transcrição dos genes de resistência. A proteína VanH produz D-Lac à partir do piruvato, o qual é utilizado pela ligase VanA para a produção de D-Ala-D-Lac, o qual é incorporado na formação dos monômeros de peptidoglicanos modificados. VanX realiza a hidrólise da ligação D-Ala-D-Ala, reduzindo a disponibilidade deste dipeptídeo e minimizando a síntese do peptidoglicano nativo, enquanto VanY cliva o D-Ala terminal de qualquer precursor nativo da parede celular que tenha sido produzido. Adaptado (6; 44).

1.3 Fatores de Virulência em *Enterococcus faecalis*

A resistência aos antibióticos é uma característica importante quando se trata de infecções por enterococos. No entanto, durante a invasão dos tecidos, os enterococos encontram um ambiente muito diferente daquele dos sítios de colonização em que habitualmente vivem. Enterococos que causam infecções são propensos a expressar genes que favorecem seu crescimento nessas condições diferentes do ambiente, permitindo aderência às células do hospedeiro, facilitando a invasão dos tecidos e causando danos através de toxinas (51). Essas substâncias que são necessárias para provocar doença, ou tem o poder de potencializar a capacidade dos microrganismos para isso, são chamadas de fatores de virulência (52).

Muitos dos fatores de virulência em enterococos residem em plasmídeos conjugativos e, dessa forma, podem ser transferidos horizontalmente entre as linhagens (51). Citolisina (*Cyl*), gelatinase (*GelE*), proteína de superfície de enterococos (*Esp*) e a proteína A enterocócica rica em leucinas (*ElrA*) estão entre os fatores de virulência de descritos em *Enterococcus faecalis* (53-54).

A citolisina é uma substância hemolítica que também possui atividade como bacteriocina, sendo letal para várias bactérias gram-positivas e tóxica para organismos superiores. Possui atividade contra várias células eucarióticas, como eritrócitos humanos, de coelhos e equinos, células retiniais e células epiteliais do intestino humano (55). A citolisina consiste em um sistema de dois componentes peptídicos, *Cyl_L* e *Cyl_S*, que são secretados para o meio extracelular. No entanto, sua expressão requer o produto de outros genes que estão organizados em um operon junto com os genes *cyl_L* e *cyl_S*. O operon da citolisina é encontrado em plasmídeos transmissíveis e também em ilhas de patogenicidade nos cromossomos de algumas linhagens de *E. faecalis* (55-56). Linhagens de *E. faecalis* expressando *cyl* são mais virulentas em modelo animal do que linhagens sem a presença do gene (57).

Gelatinase é uma zinco-metaloprotease secretada por *Enterococcus faecalis* e parece mediar a virulência através de efeitos como a degradação de tecidos do hospedeiro e modulação da resposta imune (12;58). Dados epidemiológicos e estudos em animais têm confirmado a *GelE* como um fator de virulência. O gene *gelE* é encontrado com mais frequência em isolados clínicos do que em amostras isoladas em sítios não infecciosos e a mutação desse gene leva a redução da virulência no modelo de infecção de peritônio de

camundongos (59). GelE tem capacidade de clivar uma variedade de substâncias, entre elas fragmentos insolúveis de colágeno e possui um papel importante na remoção de proteínas desenoveladas na superfície das células (53;59). Estudos ainda demonstraram que a GelE contribui na formação de biofilme (60-62).

Biofilmes são comunidades bacterianas que crescem como agregados ligados à superfície revestidas por uma matriz polimérica. Biofilmes são considerados mais resistentes à antibióticos do que as bactérias isoladas correspondentes, o que aumenta o problema de resistência microbiana. A formação dos biofilmes ainda aumenta a habilidade de *E. faecalis* em colonizar pacientes e permanecer nos sítios de infecção (62).

Assim como no caso da GelE, a proteína de superfície de enterococos, Esp, contribui para a formação de biofilme. A expressão da proteína Esp aumenta significativamente a formação de biofilme, independente do nível basal de produção de biofilme das linhagens (63). O gene *esp* parece estar presente no DNA cromossômico bacteriano, em ilhas de patogenicidade, e sua incidência é maior em amostras clínicas do que naquelas de isoladas de indivíduos saudáveis ou na água, o que demonstra seu papel na patogenicidade (64).

A proteína A enterocócica rica em leucinas, ElrA, pertence à família de proteínas com domínio WxL recém descoberta (65). O domínio WxL interage com peptidoglicano na parede celular e está relacionado com a localização da proteína na superfície da célula. A ausência no gene *elrA* não interfere no crescimento das linhagens *in vitro*, no entanto, atenua significativamente a virulência em infecções por *E. faecalis* no peritônio de camundongos. A ElrA parece também estar envolvida na resposta inflamatória, estimulando a produção da citocina Interleucina-6 (IL-6) (54). O mecanismo de ação da ElrA ainda não foi elucidado e um possível ligante para esta proteína na célula do hospedeiro ainda não foi identificado.

1.4 Novas alternativas para o tratamento de infecções causadas por VREs

Bactérias do gênero *Enterococcus* estão se tornando cada vez mais resistentes aos antibióticos tradicionais, com algumas linhagens resistentes à quase todos os antibióticos disponíveis. O tratamento de infecções causadas por VREs é extremamente problemático, pois estes organismos são resistentes a múltiplos antibióticos (3).

Entre as novas opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por VREs estão os antibióticos daptomicina, linezolida e tigeciclina.

1.4.1 Daptomicina

Daptomicina é um lipopeptídeo cíclico (Figura 6) produzido naturalmente pela *Streptomyces roseosporus* que foi descoberto em 1985, mas teve seu uso liberado apenas em 2003 nos Estados Unidos e em 2006 na Europa (66). No Brasil, a liberação para o uso ocorreu em 2008 (67).

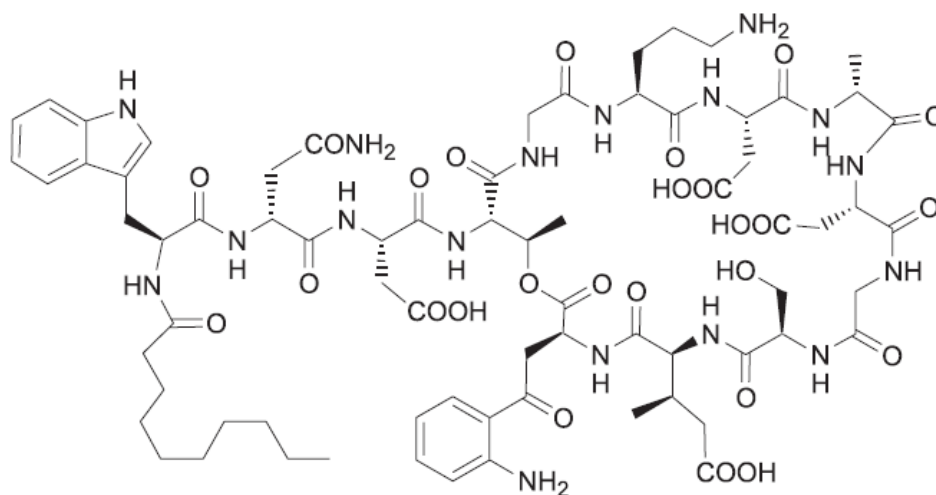


Figura 6- Estrutura do lipopeptídeo cíclico daptomicina. Adaptado (33).

A atividade antibiótica da daptomicina é estritamente dependente da presença de níveis fisiológicos de íons de cálcio livres. Na presença dos íons livres, a região hidrofóbica da molécula de daptomicina se insere na membrana citoplasmática bacteriana, onde se agrega, levando a curvatura da membrana. A descontinuidade da membrana nos sítios de inserção da daptomicina leva ao transporte de íons do meio intracelular para o extracelular, causando a despolarização da membrana. A alteração do potencial da membrana leva à incapacidade de manter as funções celulares vitais e, conseqüentemente, à morte celular, sem que ocorra a lise da célula. Há ainda indícios de que a daptomicina leve ao estresse na parede celular, porém as causas ainda para este fato permanecem desconhecidas (66;68).

A daptomicina é ativa contra uma variedade de cocos Gram-positivos, entre eles *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, mas não apresenta atividade contra bactérias Gram-negativas, por não conseguir penetrar na membrana externa destes microrganismos (66). Essa droga é indicada normalmente para o tratamento de infecções de pele e tecidos moles e bacteremia causadas por *S. aureus*, mas vem sendo utilizada no tratamento de infecções por VRE. Estudos clínicos indicam que altas doses de daptomicina ou a combinação deste agente com outras drogas, como gentamicina ou linezolida, podem ser opções de tratamento viáveis no caso de infecções na corrente sanguínea causadas por VREs (69).

A resistência à daptomicina em *Enterococcus* é rara, embora possa ocorrer devido à modificação na membrana celular (66;68). Um estudo recente comparou o genoma de duas amostras clínicas de *E. faecalis* isoladas em um paciente antes e depois da terapia com daptomicina, uma sensível e outra resistente à daptomicina, respectivamente (70). Mutações em dois genes foram necessárias e suficientes para resistência. Um gene codificava a proteína de membrana LiaF, que é membro de um sistema regulatório de três componentes de Gram-positivos envolvido na resposta do envelope celular ao estresse causado por antibióticos. O segundo gene codifica uma proteína da família das glicerofosforil-diéster-fosfodiesterases (GdpD), que parecem ter papel no metabolismo dos fosfolípidos de membrana. O isolado resistente possuía mudanças na parede celular e membrana plasmática, levando a daptomicina a ser menos efetiva na despolarização da membrana (70).

1.4.2 Tigeciclina

Tigeciclina é um análogo das tetraciclinas e o primeiro membro de uma nova classe de antibióticos, as glicilciclinas (71). A tigeciclina, cuja estrutura é mostrada na Figura 7, foi desenvolvida em 1993 e inicialmente aprovada pela FDA em 2005. A tigeciclina foi aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ainda no final de 2005 (72) e seu uso liberado na Europa em 2006 (73).

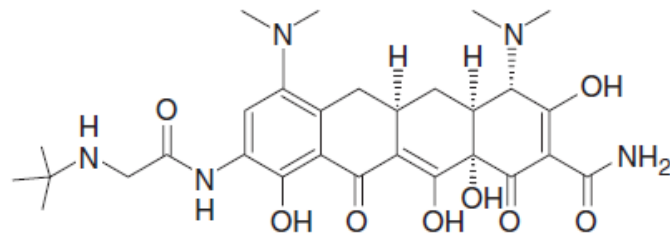


Figura 7- Estrutura da tigeciclina, uma glicilciclina. Adaptado (74)

A tigeciclina entra na célula bacteriana através de difusão e rotas de transporte ativo. No citosol, ela se liga reversivelmente a uma região de hélice (H34) na subunidade 30S do ribossomo bacteriano, impedindo a elongação da cadeias peptídicas. O crescimento bacteriano é então impedido pela inibição da biossíntese de proteínas (73;75).

A tigeciclina tem seu uso aprovado para tratamento de infecções intra-abdominais complicadas, infecções complicadas de pele e tecidos e pneumonia bacteriana adquirida na comunidade. Ela é ativa contra uma variedade de bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo bactérias resistentes, como *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina e *Enterococcus* resistentes à vancomicina. Desde sua introdução, o uso da tigeciclina tem ainda sido investigado em muitos outros casos clínicos (73).

A resistência a tigeciclina ainda é rara, embora já tenha sido relatada. A tigeciclina não parece ser substrato para as enzimas comumente envolvidas nos mecanismos usuais de resistência às tetraciclina, que incluem bombas de efluxo e proteção ribossômica (76). Os mecanismos de resistência à tigeciclina ainda não foram completamente elucidados, embora pareçam estar ligados a bomba de efluxo por transportadores da família RND (*resistance-nodulation-division*) ou modificações na molécula da tigeciclina (71).

1.4.3 Linezolida

Linezolida, cuja estrutura é mostrada na Figura 8, é o primeiro membro da classe de drogas antimicrobianas oxazolidinonas aprovado para uso, o que ocorreu nos Estados Unidos no ano de 2000 (77) e no Brasil no ano de 2005 (78).

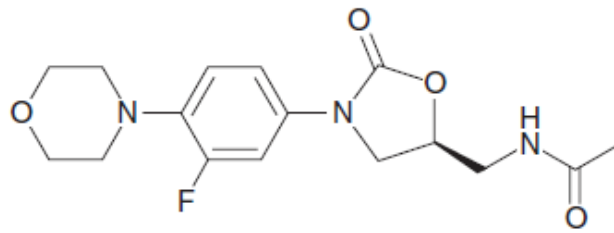


Figura 8- Estrutura da linezolida, o primeiro membro da classe das oxazolidinonas. Adaptado (74).

A linezolida é uma das duas drogas especificamente aprovadas pela FDA no caso de tratamento de VRE (12;76) e é utilizada no tratamento de infecções de pele e do trato respiratório (79).

Assim como a tigeciclina, a linezolida é uma droga bacteriostática que inibe a síntese de proteínas. A linezolida se liga ao sítio A da subunidade 50S do ribossomo bacteriano, prevenindo o tRNA de se posicionar no sítio (12;80).

A linezolida é um composto totalmente sintético e, sendo assim, acreditava-se não haver nenhum reservatório natural de resistência a ela (79). No entanto, a resistência a linezolida tem sido reportada em enterococos, até mesmo em pacientes que não foram expostos ao antibiótico (12). O mecanismo mais comum de resistência à linezolida é a mutação no gene codificante do domínio V do rRNA 23S. Tais mutações interferem no posicionamento dos nucleotídeos no sítio de ligação da linezolida a subunidade 50S do ribossomo, dificultando a interação da droga com o sítio (12;76).

2 Objetivos

O objetivo geral do estudo é comparar amostras de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina isoladas em pacientes nos anos de 2009 e 2011, durante um programa de vigilância no Hospital Risoleta Tolentino Neves, em Belo Horizonte, MG.

2.1 Objetivos específicos

- Identificar a espécie *Enterococcus faecalis* entre as amostras de VREs isoladas no hospital;
- Determinar o genótipo responsável pela resistência;
- Caracterizar o transposon envolvido na resistência;
- Determinar a concentração inibitória mínima para as drogas vancomicina, daptomicina, linezolida e tigeciclina;
- Verificar a ocorrência de resistência a altos níveis dos aminoglicosídeos estreptomicina e gentamicina;
- Verificar a existência dos genes de virulência *elrA*, *gelE*, *esp* e *cyl*.
- Tipar os isolados por gel de eletroforese em campos pulsados (PFGE- *pulsed field gel eletroforesis*);
- Realizar o *Multilocus sequencing typing* (MLST) para todos os pulsotipos encontrados.

3 Materiais e Métodos

3.1 Amostras

As amostras de VREs foram obtidas durante um programa de vigilância em pacientes do hospital Risoleta Tolentino Neves, em Belo Horizonte. Este hospital possui 310 leitos e conta com 30 leitos de UTI adulto e 5 leitos de UTI infantil, realizando uma média de 11 mil atendimentos no pronto socorro e 450 cirurgias por mês. A região de abrangência do Hospital Risoleta Tolentino Neves tem cerca de 2,4 milhões de habitantes.

As coletas foram realizadas durante um período de seis meses em 2009 e de três meses em 2011, sendo isolados de sítios de colonização (swab perianal, de colchão e axilar) e infecção (hemocultura, urina e feridas).

As amostras foram isoladas e identificadas como VRE através do Sistema Vitek® 2 (BioMérieux) no laboratório Geraldo Lustosa, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Um total de 110 isolados foram obtidos, sendo 63 em 2009 e 47 em 2011. Eles foram numerados sequencialmente, na ordem de coleta, do VRE 01 ao VRE 110. As amostras foram cultivadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI- do inglês *Brain Heart Infusion*) armazenadas a -80° C em caldo BHI suplementado com 40% de glicerol.

Apenas 7 dos 110 isolados eram amostras de infecção, sendo 3 de 2009 e 4 de 2011. Todas as outras amostras vieram de sítios de colonização.

Em alguns casos, durante o período de vigilância realizado no hospital, mais de uma amostra de VRE foi coletada do mesmo paciente. Mesmo assim, todas as amostras isoladas foram analisadas, pois estas foram isoladas em dias diferentes e poderiam ser de linhagens diferentes.

Em 2009, os 63 isolados foram provenientes de 52 pacientes. Em 2011, os 47 isolados pertenciam a 35 pacientes.

As informações específicas das amostras podem ser encontradas no Anexo I, onde o nome dos pacientes foi substituído por números, a fim de preservar sua identidade.

Este projeto foi realizado com o parecer da Comissão de Ética em Pesquisa CEP/FCFRP sob nº 178.

3.1.1 Extração do DNA dos isolados

Todos os isolados foram inicialmente cultivados em meio ágar BHI, a 37 °C, por 24 horas. Uma colônia de cada isolado foi então transferida para 10 mL de caldo BHI e incubada por 18 horas a 37 °C.

O DNA dos VRE isolados foi então extraído mecanicamente (81-82). As células dos 10 mL da cultura foram obtidas por centrifugação a 5000 rpm durante 5 minutos à 4 °C. As células foram lavadas uma vez em 10 mL de solução fisiológica e retiradas por nova centrifugação. A elas foram adicionados um volume de 200 µL de pérolas de vidro de 0,5 mm de diâmetro, previamente tratadas com solução de ácido nítrico (1:1), e 600 µL do tampão de extração (Tris-HCl 0,2 M pH 8,5; 1,5% NaCl; EDTA 25 mM pH 8; 0,5% SDS em água, armazenado a 4 °C e dissolvido a 36 °C antes do uso). A mistura foi então mantida sob agitação durante 10 minutos e 500 µL foram transferidos para um tubo limpo e um volume igual de fenol-clorofórmio foi adicionado. A mistura foi centrifugada durante 20 minutos, a 12000 rpm, 4 °C e o sobrenadante transferido para um novo tubo. O DNA foi então precipitado pela adição de álcool isopropílico na proporção 1:1 e mantido por 18 horas a -20 °C. As amostras foram centrifugadas novamente e o pellet de DNA lavado com 1 mL de etanol 70% gelado. Após nova centrifugação o DNA foi seco ao ar, diluído em 50 µL de água ultrapura e mantido à 4 °C durante 2 horas. Foi realizado então o tratamento com 1 µL de RNase (1 mg/mL) a 37 °C por 1 hora.

O DNA extraído foi quantificado utilizando-se o NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e diluído para a concentração de 100 ng/µL e estocado a -20 °C, para que se pudesse realizar as reações em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) necessárias neste estudo.

3.1.2 Identificação das espécies

As bactérias isoladas, previamente identificadas como *Enterococcus* sp. pelo laboratório Geraldo Lustosa, tiveram as espécies identificadas por multiplex-PCR (83). Os *primers* utilizados amplificam regiões específicas para as espécies *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus casseliflavus*/*E. flavescens*

e são mostrados na Tabela 1. Como amostras controle foram utilizadas as linhagens *E. faecium* NCTC 7171, *E. faecalis* NCTC 775, *E. gallinarum* NCTC 12359 e *E. casseliflavus* NCTC 1261.

Tabela 1- Sequência de primers para a identificação das espécies de Enterococcus.

Gene	Nome do Primer	Sequência de Nucleotídeos (5'-3')	Tamanho amplificado (pb)
ddl <i>E. faecium</i>	EFE-1	GCA AGG CTT CTT CTT AGA GA	550
	EFE-2	CAT CGT GTA AGC TAA CTT C	
ddl <i>E. faecalis</i>	EFE-1	GCA AGG CTT CTT CTT AGA GA	941
	EFE-2	CAT CGT GTA AGC TAA CTT C	
<i>vanC-1 E. gallinarum</i>	<i>vanC-1A</i>	GGT ATC AAG GAA ACC TC	822
	<i>vanC-1B</i>	CTT CCG CCA TCA TAG CT	
<i>vanC-2 E. casseliflavus/</i>	<i>vanC-2/3A</i>	CTC CTA CGA TTC TCT TG	439
<i>vanC-3 E. flavescens</i>	<i>vanC-2/3B</i>	CGA GCA AGA CCT TTA AG	

O preparo da reação de PCR foi realizado para um volume de 25µL contendo: cloreto de magnésio (2mM), 1x solução tamponante (Tris 20mM e KCl 50mM) (Fermentas), os 4 nucleotídeos (dNTP mix) a 0,2 mM (Fermentas), 25 pmol de cada um dos primers listados na Tabela 1, 1,25U da enzima *Taq* DNA polimerase (Fermentas), 60 ng de DNA e água deionizada e purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore Corporation) para completar o volume.

A reação foi realizada no termociclador C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) nas seguintes condições: 1 ciclo de 94 °C por 1 minuto, 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 54 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto e um ciclo final de 72 °C por 10 minutos (83).

Após a reação de amplificação foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo (1 µg/mL). O marcador do peso molecular utilizado foi GeneRuler plus 1kb DNA (Fermentas). As condições da eletroforese foram 90 V, 300 mA durante 1 hora.

A visualização do gel foi realizada no Gel Doc foto iluminador (Bio-Rad).

Após a identificação das espécies, *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina (VREfs) foram selecionados para o estudo.

3.2 Detecção do gene *vanA*

A detecção da presença ou ausência do gene *vanA* nos VREfs foi realizada por meio de PCR utilizando-se cloreto de magnésio (2mM), 1x solução tamponante (Tris 20mM e KCl 50mM) (Fermentas), 1,25U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas), dNTP mix na concentração de 0,2 mM, 100ng do DNA genômico, água Milli-Q (Millipore Corporation) para 25µL e 25 pmol dos primers para amplificação do gene.

Os primers para a amplificação do gene *vanA*, descritos por Woodford et al., 1993 (84) , são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Sequência dos primers utilizados na reação de detecção do gene *vanA*.

Gene	Nome do Primer	Sequência de Nucleotídeos (5'-3')	Tamanho amplificado (pb)
<i>vanA</i>	A1	ATGGCAAGTCAGGTGAAGATGG	399
	A2	TCCACCTCGCCAACAAC G	

A reação foi realizada no termociclador C1000 Thermal Clycler (Bio-Rad) nas seguintes condições: 1 ciclo de 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 25 segundos, 54 °C por 40 segundos e 72 °C por 50 segundos e um ciclo final de 72 °C por 10 minutos.

Após a reação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% com brometo de etídeo (1 µg/mL) e eletroforese foi realizada a 90V por 45 minutos. O marcador do peso molecular utilizado foi GeneRuler plus 1kb DNA (Fermentas) e a visualização do gel foi realizada no Gel Doc foto iluminador (Bio-Rad).

3.3 Caracterização do Transposon Tn1546

Uma vez detectada a presença do gene *vanA* nas amostras foram realizados testes para caracterizar o transposon Tn1546 que carrega esse gene.

Inicialmente realizou-se a reação de Long-PCR2/3 (85) para amplificação dos genes *vanRSHAX*, verificando-se assim a presença dos genes essenciais para a resistência, utilizando-se os primers LP2 e LP3, apresentados na Tabela 3.

Tabela 3- Sequência dos primers utilizados para a caracterização do transposon Tn1546.

Gene	Nome do Primer	Sequência de Nucleotídeos (5'-3')	Tamanho Amplificado (kb)
Tn1546	LP1	GGAAAATGCGGATTTACAACGCTAAG	10,8
<i>vanRSHAX</i>	LP2	AGACAAGTCTGAGAT TGACCTTGCC	4,4
	LP3	ATATGCTTGAAACCCACTGTTTTCC	

A reação de Long-PCR2/3 foi realizada em um volume de 20 µL contendo 1X tampão Phusion HF (New England BioLabs), dNTP mix na concentração de 0,2mM, primers LP2 e LP3 a 0,5 µM, 80 ng de DNA, 0,4U de Phusion DNA polimerase (New England BioLabs) e água Milli-Q (Millipore Corporation) para completar o volume. A reação foi realizada no termociclador C1000 Thermal Clycler (Bio-Rad) nas condições: 1 ciclo de 98 °C por 30 segundos, 30 ciclos de 98 °C por 10 segundos, 70 °C por 20 segundos e 72 °C por 90 segundos e um ciclo final de 72 °C por 10 minutos.

Foi realizado ainda o Long-PCR1, com o primer P1, descrito por Woodford et al. 1997 (85) (Tabela 3) para as extremidades de repetição do transposon, a fim de verificar se este está intacto, ou seja, se possui o tamanho de 10,8 kb.

A reação de Long-PCR1 foi preparada com 1X solução tampão *Long PCR* contendo cloreto de magnésio (1,5mM) (Thermo Scientific), os 4 nucleotídeos na concentração de 0,2 mM, primer P1 a 0,6 µM, 100 ng de DNA, 1,5U de mix de enzima *Long PCR* (Thermo Scientific) e água Milli-Q (Millipore Corporation) para 25µL.

A reação Long-PCR1 foi realizada no termociclador C1000 Thermal Clycler (Bio-Rad), nas condições: 1 ciclo de 94 °C por 3 minutos seguido de 10 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 53 °C por 30 segundos e 68 °C por 7 minutos; depois, 20 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 53 °C por 30 segundos e 68 °C por 7 minutos acrescido de mais 5 segundos por ciclo e, por fim, um ciclo de 68 °C por 10 minutos.

O controle positivo utilizado nas reações de *Long PCR* foi o *E. faecalis* A, um isolado que sabia-se conter o transposon intacto.

Na ocorrência de alterações nos tamanhos esperados para os Long-PCR realizados, o local de inserção ou deleção foi determinado utilizando-se o *overlapping* PCR, com os primers de P1 ao P19, de 17 nucleotídeos cada, conforme descrito por Arthur et al., 1993 (86). As regiões de amplificação são mostradas na Tabela 4 e na Figura 9.

Tabela 4- Primers para a detecção de inserções ou deleções no transposon Tn1546 através de *overlapping* PCR.

Pares de primers	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Bases do Tn1546	Tamanho Amplificado (pb)
P1	GGATTTACAACGCTAAG	22 – 1330	1309
P2	GCCTTTATCAGATGCTA		
P3	GGTTTTCGATTATTGGA	1222 - 2353	1132
P4	AAATAATAGAACGACTC		
P5	CGGAATGCATACGGCTC	2227 – 3525	1299
P6	AGCCATTACAGTAATTA		
P7	GGATGGACTAACACCAA	2769 – 4042	1274
P8	TTAAGTATAATTCAACC		
P9	GTGAAGGGATTGAATTG	3569 – 4793	1225
P10	TCCAATCCCCAAGTTTC		
P11	AAACGACTATTCCAAAC	4675 – 6353	1679
P12	CATAGTATAATCGGCAA		
P13	GTGTGAAATATATTTCT	6229 – 8021	1793
P14	TTATCACCCCTTTAACG		
P15	TTTGGATTTTGAAAGG	6979 – 8920	1941
P16	GGATTTACTATTATCAC		
P17	AATTCATCTACATTGGT	8890 – 10473	1584
P18	TCAGTCCAAGAAAGCCT		
P19	TATCTTCGCTATTGGAG	10403 - 10830	428
P1	GGATTTACAACGCTAAG		

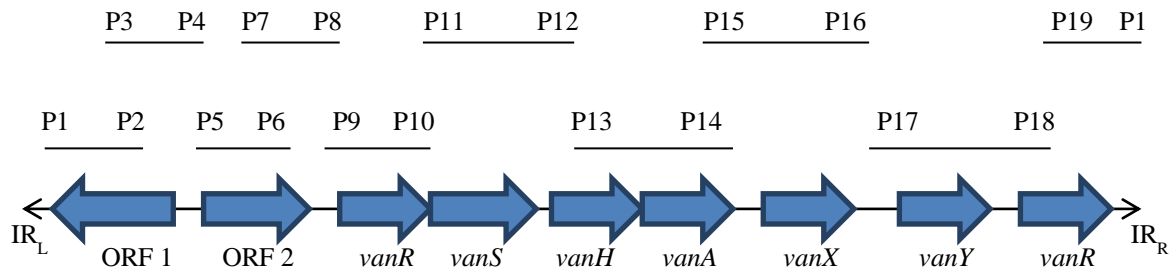


Figura 9- Locais dos primers para a detecção de inserções ou deleções no transposon Tn1546.

As reações de *overlapping* PCR foram realizadas utilizando-se cloreto de magnésio (2mM), 1x solução tamponante (Tris 20mM e KCl 50mM) (Fermentas), 1,25U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas), dNTP mix na concentração de 0,2 mM, 100ng do DNA genômico, água Milli-Q (Millipore Corporation) para 25 μ L e 12,5 pmol dos pares de primers para amplificação.

A reação foi realizada no termociclador C1000 Thermal Clycler (Bio-Rad) nas seguintes condições: 1 ciclo de 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 25 segundos, 50 °C por 40 segundos e 72 °C por 50 segundos e um ciclo final de 72 °C por 6 minutos.

As amostras de Long-PCR e de *overlapping* PCR foram analisadas em gel de agarose 1% com brometo de etídeo (1 μ g/mL) e eletroforese foi realizada a 90 V, 300 mA por 1 hora. O marcador do peso molecular utilizado foi GeneRuler plus 1kb DNA (Fermentas) e a visualização do gel foi realizada no Gel Doc foto iluminador (Bio-Rad).

3.4. Detecção de genes de virulência

A detecção dos fatores de virulência foi realizada através de PCR para os genes *elrA*, *esp*, *cylL* e *gelE*, utilizando-se primers específicos para cada um dos genes, descritos na Tabela 5.

Tabela 5- Primers para a amplificação dos genes dos fatores de virulência.

Gene	Nome do Primer	Sequência de Nucleotídeos (5'-3')	Tamanho Amplificado (pb)	Referência
Citolisina (<i>cylL_L</i>)	<i>cylL_L</i> F <i>cylL_L</i> R	AACTAAGTGTTGAGGAAA AAAGACACAACACTACAGTTAC	159	(87)
Proteína de superfície de enterococos (<i>esp</i>)	<i>Esp</i> 14F <i>Esp</i> 12R	AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG AATTGATTCTTTAGCATCTGG	500	N. Shankar, College of Pharmacy, OK, USA
Gelatinase (<i>gelE</i>)	<i>gelE</i> F <i>gelE</i> R	AATTGCTTTACACGGAACGG GAGCCATGGTTTCTGGTTGT	548	(87)
Proteína A enterococica rica em leucinas (<i>elrA</i>)	OEF8 F OEF2 R	AAACGACCGAAACAATCGC CTATTTTGCACACTGCCATCAGG	2094	(54)

Como linhagens controle positivo para a presença dos genes foram utilizados *E. faecalis* MMH594 para os genes *cylL_L* e *esp* e *E. faecalis* OG1RF para os genes *gelE* e *elrA*.

O preparo do PCR para cada gene foi realizado em um volume de 25µL contendo: água deionizada e purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore Corporation), cloreto de magnésio (2mM), 1x solução tamponante (Tris 20mM e KCl 50mM), 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas), os 4 nucleotídeos (dNTP mix a 0,2 mM) (Fermentas), 100 ng do DNA bacteriano e 20 pmol dos *primers*.

As reações de PCR foram realizadas no termociclador C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad). As condições de temperatura no termociclador foram de 1 ciclo desnaturação de 94°C por 3 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, temperatura de anelamento específica de cada primer por 60 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos e a extensão final a 72°C por 10 minutos. As temperaturas de anelamento usadas foram 52°C para os primers dos genes *cyl* e *gelE*, 50 °C para os primers do gene *esp* e 51 °C para os primers do gene *elrA*.

Após a amplificação da PCR contendo os fragmentos que determinam os fatores, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (1 µg/mL), durante 1 hora, a 90 V e 300 mA. Como marcador do peso molecular foram utilizados o GeneRuler plus 1kb DNA ladder (Fermentas) e o 100 bp DNA Ladder (Jena Bioscience). A visualização do gel foi realizada no Gel Doc foto iluminador (Bio-Rad).

3.5 Detecção da produção de hemolisina

Para a detecção da produção de hemolisina, as bactérias foram cultivadas em meio BHI ágar suplementando com 5% de sangue humano. O meio foi encubado a 37 °C durante 24 horas. Após esse período as placas foram analisadas visualmente.

A existência de β -hemólise é caracterizada pela lise completa das hemácias ao redor das colônias, com a formação de uma zona transparente ao redor das colônias. A α -hemólise é a hemólise parcial das hemácias, com a formação de alos verde-acinzentados ao redor das colônias. A ausência de hemólise é chamada de γ -hemólise.

Zonas claras ao redor das colônias indicam produção de hemolisina (88) e a β -hemólise é indicação da produção de citolisina nos *Enterococcus*.

3.6 Triagem para altos níveis de resistência a aminoglicosídeos

A triagem para altos níveis de resistência a aminoglicosídeos (HLAR- *high level aminoglycoside resistance*) foi realizada para gentamicina e estreptomicina, conforme descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* (89).

Gentamicina e estreptomicina são usadas como parâmetro para determinar altos níveis de resistência para toda a classe de aminoglicosídeos, pois alta resistência à gentamicina é normalmente associada ao gene que codifica uma enzima modificadora de aminoglicosídeos, denominada AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia, que confere resistência a todos os aminoglicosídeos disponíveis comercialmente, exceto estreptomicina (12;90). A resistência à estreptomicina normalmente resulta de modificações ribossomais (12).

Inicialmente foram preparadas placas de meio ágar BHI com gentamicina (Sigma-Aldrich) a 500 μ g/mL e placas de meio ágar BHI com estreptomicina (Sigma-Aldrich) a 2000 μ g/mL.

As amostras de VREfs foram semeadas em meio BHI-ágar e cultivadas a 37 °C durante 24 horas. Colônias de cada amostra foram suspensas em tubos com solução fisiológica 0,85% até atingirem a turbidez da escala 0,5 de McFarland no Densimat (Biomerieux) e, em seguida, uma gota de 10 μ L de cada solução foi semeada nas placas contendo os antibióticos. Após a gota secar por completo, as placas foram incubadas à 36°C.

Para a determinação do alto nível de resistência à gentamicina (HLGR – *high level gentamicin resistance* $\geq 500\mu\text{g/mL}$) foi observada a existência de uma ou mais colônias após 24 horas de incubação.

Para a determinação do alto nível de resistência à estreptomicina (HLSR – *high level streptomycin resistance* $\geq 2000\mu\text{g/mL}$) foi observada a existência de uma ou mais colônias após 24 ou 48 horas de incubação.

3.7 Determinação da concentração inibitória mínima

Os testes para a determinação de concentração inibitória mínima (CIM) foram realizados por microdiluição com vancomicina (Sigma-Aldrich), daptomicina (Novartis Biociências), linezolida (Pfizer) e tigeciclina (Pfizer), de acordo com a metodologia descrita pelo CLSI (89). Como amostra controle foi utilizada a linhagem *Staphylococcus aureus* ATCC29213.

As amostras de VREfs e a amostra controle foram cultivadas em meio BHI-ágar à 36°C, por um período de 18 horas. Colônias de cada amostra foram suspensas em tubos com solução fisiológica 0,85% até atingirem a turbidez da escala 0,5 de McFarland no Densimat (Biomérieux). Em seguida, a suspensão foi diluída 1:10 em Caldo Mueller-Hinton (vancomicina, linezolida e tigeciclina) ou Caldo Mueller-Hinton cátion ajustado com 50mg/L de cálcio (daptomicina). Então, 5 μL da suspensão de células bacterianas em caldo foram adicionados em cada um dos poços de uma microplaca de 96 poços, já contendo 100 μL de diluições seriadas, em Caldo Mueller-Hinton (vancomicina, linezolida e tigeciclina) ou Caldo Mueller-Hinton cátion ajustado com 50mg/L de cálcio (daptomicina), da droga a ser testada. Os testes foram realizados em duplicata.

As diluições seriadas foram feitas nas seguintes concentrações: daptomicina- 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,06 $\mu\text{g/mL}$; linezolida- 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 e 0,125 $\mu\text{g/mL}$; vancomicina- 256, 128, 64, 32, 16 e 8 $\mu\text{g/mL}$ e tigeciclina- 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,06 $\mu\text{g/mL}$.

Após a inoculação as microplacas foram incubadas à 36 °C, o crescimento celular analisado em 24 e 48 horas e a CIM (primeira concentração em que não ocorre crescimento) determinada. Para facilitar a visualização do crescimento celular, após o período de incubação as placas foram coradas com 30 μL de resazurina (Sigma-Aldrich) 0,01%. A resazurina passa

da coloração azul para rosada no caso de crescimento bacteriano (Figura 10), devido a sua redução na presença de células viáveis (91).

A fim de avaliar a resistência das amostras foram utilizados os parâmetros de corte disponíveis para *E. faecalis* no CLSI (89) para vancomicina, linezolida e daptomicina e no *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (92) para tigeciclina. Os parâmetros de corte são apresentados na Tabela 6.

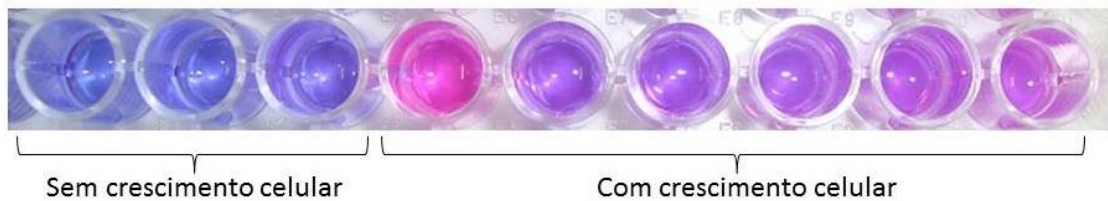


Figura 10- Mudança de coloração da resazurina na presença de crescimento bacteriano com células de *Enterococcus faecalis*.

Tabela 6- Parâmetros de corte para a resistência em *Enterococcus* spp.

Antibiótico	Sensível ($\mu\text{g/mL}$)	Intermediário ($\mu\text{g/mL}$)	Resistente ($\mu\text{g/mL}$)
Vancomicina	≤ 4	8-16	≥ 32
Linezolida	≤ 2	4	≥ 8
Daptomicina	≤ 4	-	-
Tigeciclina	$\leq 0,25$	-	$>0,5$

3.8 Tipagem Molecular

3.8.1 Tipagem por eletroforese de campo pulsado (PFGE)

A análise da macro restrição do DNA cromossômico após PFGE (do inglês *Pulsed Field Gel Eletroforesis*), que foi utilizada para análise de epidemiologia molecular das linhagens, envolve a incorporação dos organismos em agarose, a lise celular *in situ* e a digestão do DNA

cromossômico com endonucleases de restrição que clivam com pouca frequência. Fatias contendo os fragmentos clivados de DNA cromossômico são inseridas no gel de agarose e, após a eletroforese de campo pulsado, forma-se um padrão de bandas discretas, que é utilizado na comparação entre os isolados e a determinação de sua relação.

Uma única colônia de amostras de VREfs e a amostra controle foram cultivadas em caldo BHI a 36 °C durante 24 horas. A cultura foi centrifugada e o sedimento lavado com o tampão T10E50 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 50 mM, pH 8). O sedimento foi ressuspensionado em T10E50 ao qual foi adicionado agarose Low Melting 2% a aproximadamente 45 °C. Após homogeneizada, a solução contendo as células bacterianas foi colocada em moldes até a solidificação dos blocos, os quais foram lisados com o tampão de lise (6 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA pH 8, 1 M NaCl, 0,5% N-lauril sarcosina, 0,5% Brij 58, 0,2% Desoxicolato de sódio) e lisozima em incubação a 37 °C por 4 horas. Solução de Proteinase K foi adicionada a cada tudo a uma concentração final de 0,8 mg/mL e incubados a 50 °C. Após a remoção da solução os blocos foram armazenados a 4 °C em tampão T10E1 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Os blocos foram então cortados no tamanho ideal para os plugues do gel de eletroforese em campo pulsado, adicionados a um novo tubo de 1,5 mL contendo PMSF a uma concentração final de 1 mM em T10E1 e incubados por 30 minutos a 50 °C. Após a incubação, o tampão foi retirado e substituído por apenas T10E1, e os tubos mantidos em gelo, sob agitação, durante 20 minutos. Esse procedimento foi repetido três vezes e o plugue transferido para um novo tubo de 1,5 mL, onde foi realizada a digestão com 40U da enzima de restrição *SmaI** (Bio-Labs), no tampão indicado pelo fabricante, a 30 °C, por 18 horas. Após esse período, mais 16U da enzima foram adicionados e nova incubação realizada a 30 °C durante duas horas. Após esse período, proteinase K foi adicionada a uma concentração final de 1 mM. e incubou-se por uma hora a 37 °C. Após a incubação, o tampão foi retirado e substituído por T10E1, e os tubos mantidos em gelo, sob agitação, durante 30 minutos. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes.

Os plugues foram secos e transferidos para o gel de agarose *Pulsed Field Certified* (Bio-Rad) 1,2% em tampão TBE 0,5X (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM e EDTA 1mM). A eletroforese foi realizada no equipamento CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System (Bio-Rad), durante 26 horas, em gradiente de 6 V/cm, ângulo de 120°, com pulsos de 5 a 35 segundos, em rampeamento linear.

* O sítio de restrição da enzima *SmaI* é 5'-CCCGGG-3'

O gel foi corado utilizando-se o corante *Syber Safe* (Invitrogen) e visualizado no Gel Doc foto iluminador (Bio-Rad).

A análise dos géis foi realizada no *software Bionumerics* (*Applied Maths NV*, Bélgica), utilizando-se os parâmetros de otimização e tolerância em 1,5%, e a separação dos pulsotipos realizada de acordo com o descrito por Tenover et al. (93), onde se consideram pulsotipos diferentes mais de seis bandas de diferença no padrão do gel.

3.8.2 Tipagem por MLST

Multilocus sequencing typing (MLST) é um procedimento para caracterização de isolados de determinada espécie de bactéria, de forma não ambígua, usando o sequenciamento de sete genes *housekeeping*. Fragmentos internos de aproximadamente 450 pb de cada gene são sequenciados. Para cada fragmento do gene *housekeeping*, cada sequência única apresentada é designada como um alelo diferente, caracterizado por um número. Para cada um dos isolados, a combinação dos alelos de cada um dos sete *loci* define o perfil alélico ou tipo de sequência (ST- do inglês *sequence type*) (94).

A MLST traz a vantagem de oferecer comparação global entre isolados, independente das diferenças que ocorrem entre laboratórios, o que pode ser um problema nas comparações entre os géis do PFGE (95). Além disso, os genes *housekeeping* não estão sujeitos a pressões seletivas incomuns e se diversificam vagarosamente, através da acumulação de variações neutras aleatórias, o que torna os dados confiáveis para se determinar o tipo de sequência e as relações entre isolados (94-95).

Para a realização do MLST em *E. faecalis* são utilizados fragmentos internos dos genes *housekeeping*: *gdh* (*glucose-6-phosphate dehydrogenase*), *gyd* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), *pstS* (*phosphate ATP binding cassette transporter*), *gki* (*glucokinase*), *aroE* (*shikimate 5-dehydrogenase*), *xpt* (*xanthine phosphoribosyltransferase*) e *yqiL* (*acetyl-coenzyme A acetyltransferase*).

Os genes foram amplificados por PCR, com os primers da Tabela 7, descritos por Ruiz-Garbajosa et al (2006) (96).

O preparo da PCR para cada gene foi realizado em um volume de 50 μ L contendo: água deionizada e purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore Corporation), cloreto de magnésio (2mM), 1x solução tamponante (Tris 20mM e KCl 50mM), 1,25 U de *Taq* DNA polimerase

(Fermentas), os 4 nucleotídeos (dNTP mix a 0,25 mM) (Fermentas), 100 ng do DNA bacteriano e 30 pmol dos *primers*.

As PCR foram realizadas no termociclador C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad). As condições de temperatura no termociclador foram de 1 ciclo desnaturação de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento 52°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos e a extensão final a 72°C por 7 minutos.

Tabela 7- Primers para a realização do MLST para *E. faecalis*.

Gene (alelo)	Nome do Primer	Sequência de Nucleotídeos (5'-3')	Tamanho Amplificado (pb)
<i>gdh</i>	<i>gdh-1</i>	GGCGCACTAAAAGATATGGT	530
	<i>gdh-2</i>	CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	
<i>gyd</i>	<i>gyd-1</i>	CAAAGTCTTAGCTCCAATGGC	395
	<i>gyd-2</i>	CATTTCGTTGTCATACCAAGC	
<i>pstS</i>	<i>pstS-1</i>	CGGAACAGGACTTTTCGC	583
	<i>pstS-2</i>	ATTTACATCACGTTCTACTTGC	
<i>gki</i>	<i>gki-1</i>	GATTTTGTGGGAATTGGTATGG	438
	<i>gki-2</i>	ACCATTAAGCAAAATGATCGC	
<i>aroE</i>	<i>aroE-1</i>	TGGAAAACCTTTACGGAGACAGC	459
	<i>aroE-2</i>	GTCCTGTCCATTGTTCAAAGC	
<i>xpt</i>	<i>xpt-1</i>	AAAATGATGGCCGTGTATTAGG	456
	<i>xpt-2</i>	AACGTCACCGTTCCTTCACTTA	
<i>yqiL</i>	<i>yqiL-1</i>	CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG	436
	<i>yqiL-2</i>	GAATATCCCTTCTGCTTGTGCT	

A amplificação e pureza dos fragmentos foram verificadas através da presença de bandas após a eletroforese (90 V, 300 mA, 45 min) em gel de agarose 1% corado com *Syber Safe* (Invitrogen) e visualizado no Gel Doc foto iluminador (Bio-Rad).

Os fragmentos foram purificados à partir do produto do PCR utilizando-se o PCR Purification Kit (Jena Bioscience) e quantificados no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

O sequenciamento dos fragmentos de DNA foi realizado no equipamento Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies), utilizando-se os mesmos *primers* da reação de PCR (Tabela 7).

As sequências foram então analisadas no programa ContigExpress, que faz parte do Vector NTI Advance 11.0 (Life Technologies), no qual foi realizada a análise da qualidade do sequenciamento e realizados o alinhamento dos pares de sequências e formação de *contigs*. Os *contigs* foram formados com auxílio das sequências para cada um dos genes, que foram retiradas do banco de dados para *E. faecalis* do site *Multilocus Sequence Typing* (97).

Após a formação e análise dos *contigs*, cada sequência foi classificada de acordo com o banco de dados (97) e o alelo numerado. O conjunto dos 7 números dos alelos foi utilizado para determinar o ST das amostras analisadas.

Por fim, foi realizada a análise dos STs no algoritmo eBURSTv3 (98), para se verificar a relação genética entre os STs encontrados e com aqueles cadastrados.

4. Resultados e Discussão

4.1 Identificação das Espécies

As amostras e sua identificação estão agrupadas no Anexo I. A Figura 11 mostra a identificação realizada para algumas das amostras e a amplificação dos controles utilizados.

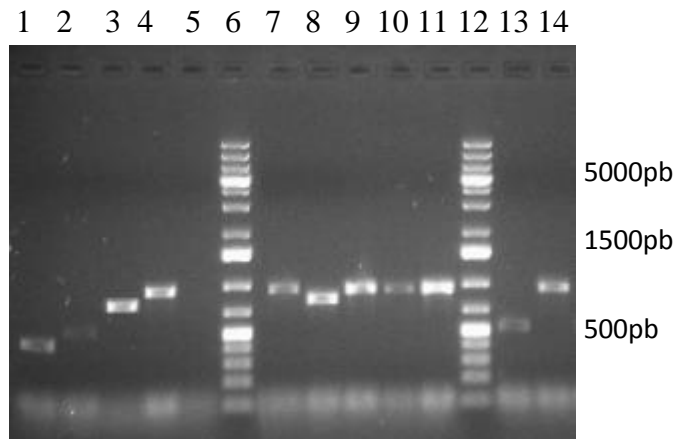


Figura 11- Gel de Multiplex-PCR. 1- controle *E. casseliflavus* NCTC 1261, 2- controle *E. faecium* NCTC 7171, 3- controle *E. gallinarum* NCTC 12359, 4- controle *E. faecalis* NCTC 775, 5- controle negativo (sem presença de DNA), 6- marcador de peso molecular GeneRuler plus 1kb DNA Ladder (Fermentas), 7- VRE 65, 8- VRE 66, 9- VRE 67, 10- VRE 68, 11- VRE 69, 12- marcador de peso molecular GeneRuler plus 1kb DNA Ladder (Fermentas), 13- VRE 70, 14- VRE 71.

Para as amostras isoladas em 2009, a identificação das espécies demonstrou que das 63 amostras de VRE estudadas, a maioria, ou seja, 47 (74,6%), pertencem à espécie *E. faecium*; 14 (22,2%) delas pertencem à espécie *E. faecalis* e 1 (1,6%) pertence à espécie *E. gallinarum*. Uma das amostras, a VRE 48, não foi identificada como nenhuma das espécies envolvidas na identificação por este multiplex-PCR. Esta amostra foi identificada por nosso grupo posteriormente como sendo *E. raffinosus* através do sequenciamento do gene *rpoA* (99). Para as amostras isoladas em 2011, a identificação das espécies demonstrou que, das 47 VRE estudadas, 29 pertencem à espécie *E. faecalis* (61,7%), 17 delas pertencem à espécie *E. faecium* (36,2%) e 1 pertence à espécie *E. gallinarum*.

Os 14 isolados de VREs de 2009 são de 13 pacientes diferentes e as 29 de 2011 pertencem a 22 pacientes diferentes.

Após a identificação das amostras, pode-se verificar que, dentre os três isolados de infecção no ano de 2009, dois VRE pertencem à espécie *E. faecalis* (isolados em dois pacientes diferentes) e um pertence a espécie *E. faecium*. Os quatro casos de infecção por VRE em 2011 foram causados pela espécie *E. faecalis*.

Em 2009, quatro pacientes foram colonizados por duas espécies durante sua internação, embora a dupla colonização não tenha ocorrido em uma mesma data de isolamento, sendo elas *E. faecalis* e *E. faecium* e em 2011 a colonização por duas espécies ocorreu em três pacientes, sendo que dois deles foram colonizados por *E. faecalis* e *E. faecium* e o outro por *E. faecalis* e *E. gallinarum*. A colonização por mais de uma espécie simultaneamente pode favorecer a transmissão de genes de resistência e de fatores de virulência entre as espécies, uma vez que plasmídeos podem ser transmitidos horizontalmente entre elas (7).

Nota-se neste hospital uma inversão na espécie prevalente nos pacientes de *Enterococcus faecium* em 2009 para *Enterococcus faecalis* em 2011. O primeiro surto de VRE registrado no Brasil tinha uma prevalência de isolados da espécie *E. faecalis* (27). Por se tratar de um único hospital e de um número reduzido de amostras disponíveis, tais flutuações podem ocorrer.

Nos Estados Unidos ocorreu uma grande mudança na relação entre isolados de *E. faecalis* e *E. faecium*, associado ao uso de vancomicina e antibióticos de amplo espectro. Enquanto no passado a grande maioria dos isolados pertencia a espécie *E. faecalis*, atualmente *E. faecium* é quase tão comum como causa de infecções nosocomiais quanto *E. faecalis* e apresenta resistência à vancomicina com muito mais frequência (12). Um estudo realizado na América Latina (Colômbia, Peru, Equador e Venezuela) não mostra tal mudança no cenário, sendo os *E. faecalis* ainda a espécie predominante entre os *Enterococcus* isolados em sítios infecção (razão de *E. faecalis* para *E. faecium* de 5:1), embora a resistência à vancomicina seja encontrada com muito mais frequência em *E. faecium* (100). No Brasil, a resistência à vancomicina tem ocorrido com mais frequência em *E. faecalis* (11), fato condizente com a grande porcentagem de amostras da espécies neste estudo.

Após realizada a identificação, os VRE isolados de *E. faecalis* de 2009 e 2011 foram selecionados para as próximas etapas do estudo, totalizando 43 VREfs (14 isolados em 2009 e 29 em 2011), incluindo os VREfs causadores de infecção já relatados. A numeração das amostras de *E. faecalis* pode ser verificada no Anexo I.

4.2 Detecção do gene *vanA*

Após a realização da reação de amplificação do gene *vanA*, este foi identificado em todas as amostras de VREfs, tanto de 2009, quanto de 2011. A Figura 12 mostra o gel de agarose após a eletroforese de algumas das amostras de 2011.

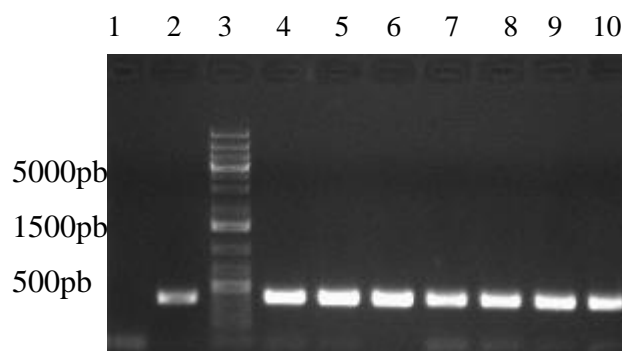


Figura 12- Gel de agarose 1% do PCR para amplificação do gene *vanA*. 1- Amostra controle negativo; 2- controle positivo *E. faecalis vanA*; 3- marcador de peso molecular GeneRuler plus 1kb DNA Ladder (Fermentas); 4- VREfs 72; 5- VREfs 94; 6- VREfs 95; 7- VREfs 96; 8- VREfs 97; 9- VREfs 98; 10- VREfs 99

A identificação do gene *vanA* em todas as amostras é condizente com o encontrado na literatura para os isolados no Brasil, que em sua maioria são do genótipo VanA (37-40), embora o primeiro VRE isolado no país tenha sido um *E. faecium* classificado como VanD (11) e recentemente, VanB tenha sido isolado no país (101).

4.3 Caracterização do Transposon Tn1546

Sabendo-se que todos os VREfs isolados possuem o genótipo *vanA*, foi realizada a caracterização do transposon Tn1546, no qual o gene *vanA* está inserido.

A primeira análise, realizada para detectar a integridade da região codificante para as proteínas essenciais para a resistência, demonstrou que esta região se encontra intacta em

todos os isolados, sem apresentar inserções ou deleções que possam ser detectadas por mudanças do tamanho do fragmento amplificado. A Figura 13 demonstra o resultado para algumas das amostras.

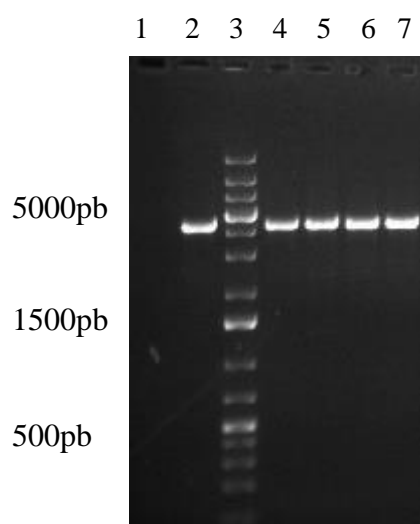


Figura 13- Gel de agarose 1% do PCR após realização do Long-PCR 2/3. 1- Amostra controle negativo; 2- controle positivo *E. faecalis* A; 3- marcador de peso molecular GeneRuler plus 1kb DNA Ladder (Fermentas); 4- VREfs 68; 5- VREfs 69; 6- VREfs 74; 7- VREfs 74.

Na verificação da integridade do transposon Tn1546 em sua totalidade, realizada através do Long-PCR 1, apenas uma amostra, a VREfs 15, apresentou tamanho diferente do esperado. Em todas as outras amostras observou-se a presença do transposon intacto.

Overlapping-PCR foi realizado então realizado com o isolado VREfs15 e apresentou um padrão atípico na região dos *primers* P17 e P18, que abrange do *upstream* ao gene *vanY* até parte do gene *vanZ* (Figura 9). Este fragmento apresentou uma banda muito maior (cerca de 3Kb) que a esperada, de aproximadamente 1,5Kb, e uma menor (cerca de 1 Kb) que a esperada.

O transposon Tn1546 pode apresentar subtipos, dependentes de mutações pontuais, deleções ou inserção de elementos IS (102). Dessa forma, uma explicação para a presença de amplificados de dois tamanhos diferentes pode ser a presença de 2 transposons diferentes: um com uma inserção de aproximadamente 1500 pb e outro com uma deleção de aproximadamente 500 pb neste isolado.

A Figura 14 mostra o gel com a amplificação para os primers P17 e P18 para o VREfs e a amostra controle, que apresenta o fragmento no tamanho esperado.

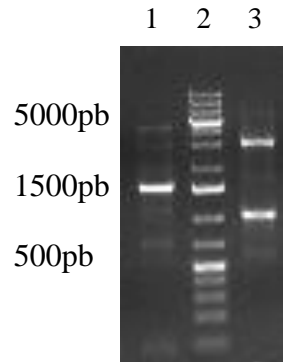


Figura 14- Produto de amplificação dos primers P17 e P18 em gel de agarose a 1%. 1 - Controle positivo *E. faecalis* vanA; 2 - marcador de peso molecular GeneRuler plus 1kb; 3- *E. faecalis* VREfs 15, onde nota-se a presença dos dois fragmentos de tamanhos diferentes do esperado.

Os fragmentos encontrados para a VREfs 15 não puderam ser explorados neste estudo, mas futuros experimentos serão realizados para que se possa entender o que houve neste transposon, confirmando, ou não, a hipótese levantada de presença de dois transposons.

4.4 Detecção de genes de fatores de virulência

Todos os isolados de *E. faecalis* foram testados para a presença dos genes *elrA*, *esp*, *cyLL* e *gelE*.

Todas as 43 amostras de *E. faecalis* testadas apresentaram o gene *elrA*. A Figura 15 mostra o gene amplificado para alguns dos isolados.

O fato de que todas as amostras de *E. faecalis* estudadas possuem o gene *elrA*, demonstra que este está difundido entre amostras clínicas. Esse resultado de alta prevalência do gene em linhagens clínicas concorda com o que demonstrado por Brinster et al (54), onde o estudo realizado com 83 amostras clínicas revelou a ausência do gene em apenas três delas, uma porcentagem bem menor do que em linhagens provenientes de comida e de amostras fecais testadas no mesmo estudo.

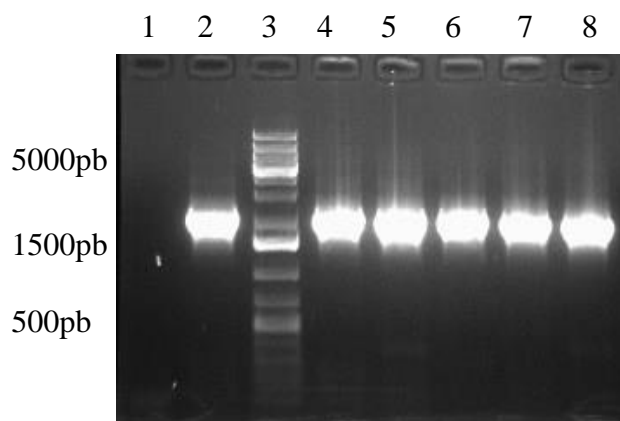


Figura 15- Gel de agarose 1% com algumas das amostras do PCR para a prevalência do gene *elrA*. 1- Controle negativo; 2- controle positivo *E. faecalis* OG1RF, 3- marcador de peso molecular GeneRuler plus 1kb (Fermentas), 4- VREfs 65; 5- VREfs 67; 6- VREfs 68; 7- VREfs 69; 8- VREfs 72.

O gene *esp* estava ausente em todas as amostras de *E. faecalis* de 2009. Já em 2011, o gene estava presente em 12 das 29 amostras, representando 41,3% das amostras deste ano. A Figura 16 mostra o resultado para alguns dos isolados e na tabela no Anexo II as amostras positivas e negativas podem ser visualizadas.

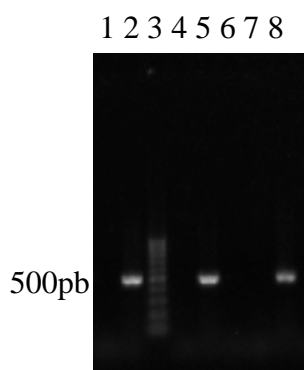


Figura 16- Gel de agarose 1% com algumas das amostras do PCR para a prevalência do gene *esp*. 1- Controle negativo; 2- controle positivo *E. faecalis* MMH594, 3- marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Jena Bioscience); 4- VREfs 65; 5- VREfs 67; 6- VREfs 68; 7- VREfs 69; 8- VREfs 72.

Das 14 amostras de VREfs isoladas em 2009, apenas uma, a VRE 38, foi positiva para o gene *cyLL*, o que representa 7,15% delas. A análise dos isolados de 2011 mostrou que ele estava presente em 18 dos 29 isolados, que representam aproximadamente 62% delas. A Figura 17 mostra o resultado para alguns dos isolados.

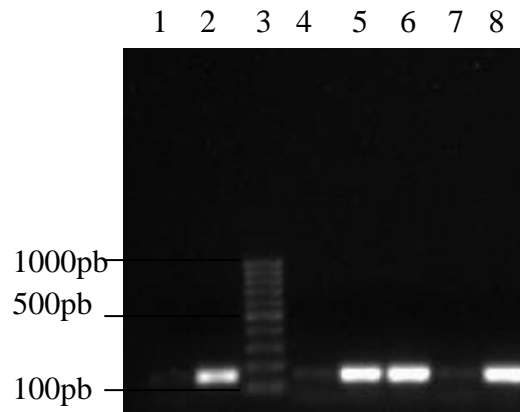


Figura 17- Gel de agarose 1% com algumas das amostras do PCR para a prevalência do gene *cylL*. 1- Controle negativo; 2- controle positivo *E. faecalis* MMH594, 3- marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Jena Bioscience); 4- VREfs 65; 5- VREfs 67; 6- VREfs 68; 7- VREfs 69; 8- VREfs 72.

A pesquisa para o gene *gelE*, que codifica a gelatinase, demonstrou que todos os isolados de *E. faecalis*, tanto de 2009 quanto de 2011, apresentam o gene, como pode ser visto na Figura 18 para algumas amostras.

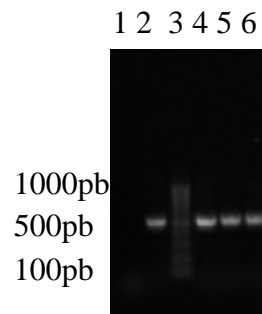


Figura 18- Gel de agarose 1% com algumas das amostras do PCR para a prevalência do gene *gelE*. 1- Controle negativo; 2- controle positivo *E. faecalis* OG1RF, 3- marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Jena Bioscience); 4- VREfs 108; 5- VREfs 109; 6- VREfs 110.

No Anexo II são mostrados os resultados da pesquisa para presença dos genes de virulência de todas as amostras. Nota-se um aumento na presença dos fatores de virulência em 2011, com relação ao que ocorria no ano de 2009. Esse aumento pode ser motivo de preocupação, uma vez que os fatores de virulência podem potencializar a capacidade dos VREfs causarem infecções.

4.5 Detecção da produção de hemolisina

No teste fenotípico para a detecção da produção de hemolisina, das 14 amostras identificadas como *E. faecalis* isoladas em 2009, uma apresenta produção de hemolisina do tipo beta-hemólise (produção completa de hemólise), a VRE38, e o restante são do tipo gama (nenhuma produção de hemólise).

Das 29 amostras de VREfs isoladas em 2011, 18 apresentaram hemólise tipo beta, as mesmas nas quais foi detectado o gene para a citolisina. As 11 amostras restantes apresentaram hemólise do tipo alfa (produção parcial de hemólise).

Uma vez que a presença da citolisina deve levar à beta-hemólise, os resultados encontrados são nos testes genotípicos e fenotípicos são condizentes, como pode ser visualizado no Anexo II.

4.6 Triagem para altos níveis de resistência a aminoglicosídeos (HLAR - *high level aminoglycoside resistance*)

Os testes de triagem realizados com a finalidade de detectar resistência a altos níveis de aminoglicosídeos (HLAR, do inglês *high level aminoglycoside resistance*) tanto para gentamicina (HLGR – *high level gentamicin resistance* $\geq 500\mu\text{g/mL}$) como também para estreptomicina (HLSR – *high level streptomycin resistance* $\geq 2000\mu\text{g/mL}$) demonstraram que todos os isolados de *E. faecalis* de 2009 são resistentes a altas concentrações de gentamicina (500 $\mu\text{g/mL}$) e sensíveis à 2000 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina.

Nos testes realizados com as amostras de 2011 o resultado se repetiu, com todos os isolados resistentes à altas concentrações de gentamicina e sensíveis à altas concentrações de estreptomicina. A alta resistência à gentamicina é associada à resistência a todos os aminoglicosídeos, exceto a estreptomicina. A resistência à aminoglicosídeos é preocupante quanto ao tratamento de infecções causadas por enterococos, uma vez que um tratamento bactericida comum é o uso de um aminoglicosídeo em sinergismo com um agente ativo na parede celular (como a vancomicina ou penicilinas) (12). Os enterococos possuem uma resistência intrínseca às baixas concentrações de aminoglicosídeos, no entanto, a associação

destes aos antibióticos ativos contra a parede celular aumenta a entrada dos aminoglicosídeos nas células e leva a morte bacteriana (103). A resistência à vancomicina e aminoglicosídeos das amostras pode levar a falha de tratamento inicial e prejudicar a evolução do paciente infectado.

4.7 Determinação da concentração inibitória mínima

Todos VREfs apresentaram alta resistência à vancomicina com CIM maior que 256 mg/L, característica do fenótipo VanA. Todos os VREfs também foram sensíveis à daptomicina, podendo esta ser uma droga de escolha no caso de infecção por tais bactérias.

Em 2009, ocorreu sensibilidade à linezolida em todos os casos, enquanto que em 2011 houve uma amostra com resistência intermediária em 24h de incubação. A resistência à linezolida está normalmente associada a mutações no domínio V do rRNA 23S. Como a maioria das bactérias, *E. faecalis* possui múltiplas cópias dos genes para o rRNA 23S (de quatro a seis cópias) e os níveis de resistência estão relacionados com o número de cópias contendo a mutação (12;76). Sendo assim, a resistência intermediária pode ter surgido da mutação de apenas parte das cópias dos genes para o rRNA 23S presentes.

Todos os VREfs de 2009 foram sensíveis para tigeciclina, no entanto, nos de 2011 detectou-se 10 amostras (isoladas de 7 pacientes diferentes) resistentes a essa droga com CIM igual a 2 mg/L. Duas das 10 estavam presentes em sítios de infecção. A resistência a tigeciclina é um fato raro, poucas vezes demonstrado na literatura para *E. faecalis* (104-105), sendo este o primeiro relato no Brasil. É importante ressaltar que o uso de tigeciclina neste hospital começou no início de 2011 para o tratamento de infecções causadas por *Acinetobacter* multirresistente em partes moles ou VRE em infecções do abdômen. Este fato pode ter colaborado para a seleção de bactérias colonizantes resistentes à tigeciclina que posteriormente se disseminaram entre os pacientes. O mecanismo de resistência à tigeciclina ainda não foi elucidado. Embora semelhante as tetraciclina, a tigeciclina é ativa contra linhagens bacterianas resistentes à tetraciclina, cuja resistência é comumente causada por bombas de efluxo do tipo Tet e proteínas que protegem o ribossomo, prevenindo a ligação das tetraciclina. A bomba de efluxo por transportadores da família RND parece ser responsável pela diminuição da susceptibilidade a tigeciclina em *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp.,

Providencia spp. e *Morganella* spp. (71). No estudo realizado por Werner et al (2008) (105), uma linhagem de *E. faecalis* resistente à tigeciclina foi analisada quanto a mecanismos de resistências, no entanto não foram encontrados mutações no rRNA 16S, o gene para a proteína TetX (proteína capaz de modificar a tigeciclina e diminuir a susceptibilidade à ela), nem diferenças de CIM quando o crescimento foi realizado na presença de inibidores das bombas de efluxo que pudessem explicar tal resistência. Em nosso estudo não foi possível investigar a fonte de tal resistência, sendo este um passo futuro a ser tomado.

A Tabela 8 mostra os dados gerais do perfil de sensibilidade para os VREfs isolados em 2009 e 2011, mostrando o número de isolados que mostraram ser sensíveis, resistentes e intermediários aos antibióticos. A visualização do resultado para cada isolado em particular pode ser feita no Anexo II.

Tabela 8- Visualização global da sensibilidade das amostras aos antimicrobianos testados.

Antimicrobianos	<i>E. faecalis</i> 2009 (14)			<i>E. faecalis</i> 2011(29)		
	Resistente	Intermediário	Sensível	Resistente	Intermediário	Sensível
Vancomicina	14 (>256 µg/mL)	0	0	29 (>256 µg/mL)	0	0
Daptomicina	0	0	14 (≤1 µg/mL)	0	0	29 (≤2 µg/mL)
Tigeciclina	0	0	14 (≤0,25 µg/mL)	10 (2 µg/mL)	0	19 (≤0,25 µg/mL)
Linezolida	0	0	14	0	1 (4 µg/mL)	28

4.8 Tipagem Molecular

Após a análise dos padrões de PFGE, foram encontrados quatro pulsotipos diferentes, com diversos subtipos. Para a realização do MLST foi selecionada uma amostra de cada um dos pulsotipos encontrados em 2011 e algumas das amostras do anos de 2009, para confirmar uma disseminação clonal neste ano. Assim, foram sequenciados os genes dos isolados VRE 2, VRE 4, VRE 15, VRE 29, VRE 53, VRE 103 (todos do pulsotipo A), VRE 67 (pulsotipo B), VRE83(pulsotipo C) e VRE 68(pulsotipo D).

O perfil alélico encontrado para as amostras e seu respectivo ST estão na Tabela 9 e a Figura 19 mostra o resultado do PFGE em conjunto com os outros dados obtidos para os VREfs.

Tabela 9- Resultado do MLST de cada Pulsotipo.

Amostra	Pulsotipo	<i>gdh</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>gki</i>	<i>aroE</i>	<i>xpt</i>	<i>yqil</i>	ST
VRE 2	A	35	7	3	32	32	26	31	103
VRE 4	A	35	7	3	32	32	26	31	103
VRE 15	A	35	7	3	32	32	26	31	103
VRE 29	A	35	7	3	32	32	26	31	103
VRE 53	A	35	7	3	32	32	26	31	103
VRE 103	A	35	7	3	32	32	26	31	103
VRE 67	B	12	7	3	7	6	1	5	6
VRE 83	C	12	7	3	7	6	1	5	6
VRE 68	D	12	7	3	7	6	1	5	6

Todas as amostras de 2009 são do pulsotipo A, sendo todas idênticas e classificadas como subtipo A1, com exceção da VRE 15, que é relacionada às demais, sendo do subtipo A4. Dessa forma, detectamos a disseminação de um clone de *E. faecalis* entre os pacientes no ano de 2009 (Figura 19).

Ao analisar os isolados de 2011, detecta-se uma clara divisão entre as amostras, sendo que parte delas pertence ao pulsotipo A e outra parte se divide nos pulsotipos B, C e D, como pode ser visualizado na Figura 19. Ao analisar os isolados de 2011 por paciente, temos 30,8% sendo pulsotipo A, 57,7% sendo pulsotipo B, 7,6% sendo pulsotipo C e 3,9% sendo pulsotipo D.

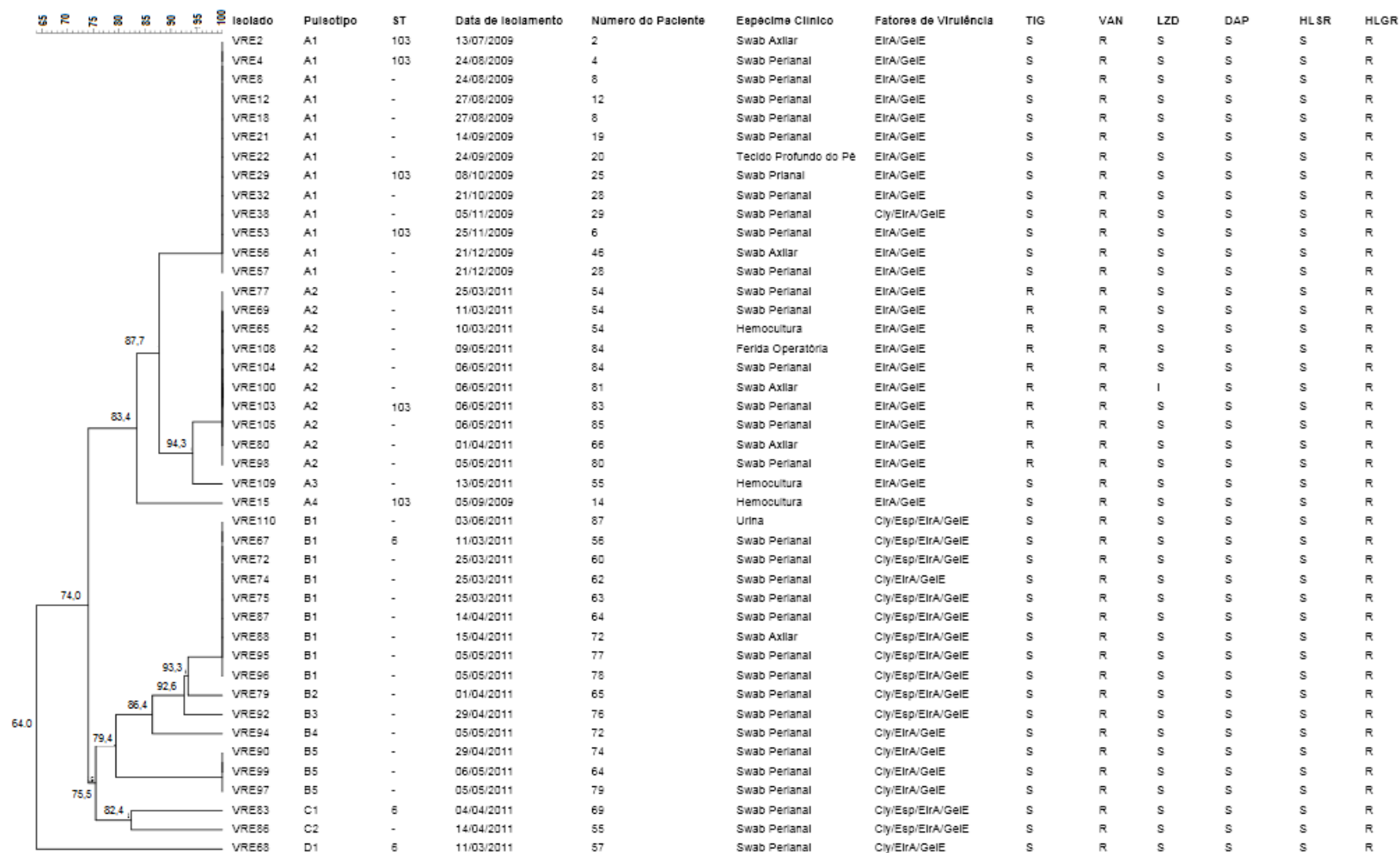


Figura 19- Dendrograma dos padrões de PFGE e informações dos isolados. ST- Tipo de sequência; TIG- Tigeciclina; VAN- Vancomicina; LZD- Linezolida; DAP- Daptomicina; R- Resistente; I-Intermediário; S- sensível.

As amostras de 2011 pertencentes ao pulsotipo A estão claramente relacionadas ao clone predominante em 2009, que sofreu modificações, mas ainda persiste no hospital. Todas as amostras resistentes à tigeciclina foram classificadas no pulsotipo A, subtipo A2. Assim, acredita-se que a exposição à tigeciclina durante o período pode ter selecionado um clone resistente a esta droga e tal clone começa a se disseminar pelo hospital.

As amostras pertencentes aos pulsotipos B e C estão agrupadas e provavelmente se originaram de um clone que se disseminou no hospital após ter sido trazido até ele por pacientes de outras unidades hospitalares, uma vez que o hospital Risoleta Tolentino Neves é centro de referência em Belo Horizonte e região, recebendo assim pacientes de várias outras unidades hospitalares.

Uma única amostra, a VRE 68, faz parte do pulsotipo D e não parece ser relacionada com as demais, nem está disseminada no hospital.

Nota-se ainda que as amostras dos pulsotipos B, C e D possuem um maior número de fatores de virulência entre os analisados do que as do pulsotipo A, no entanto, 3 das 4 infecções causadas por VREfs no período analisado de 2011 foram causadas por isolados do pulsotipo A.

Como pode ser visto na Tabela 9, os representantes do pulsotipo A são ST103, assim como possivelmente as outras amostras desse pulsotipo, que são a ela relacionadas. O fato da amostra 103, isolada em 2011, possuir o mesmo ST das amostras testadas de 2009 confirma a persistência do clone no hospital de durante este período de tempo.

As representantes dos pulsotipos B, C e D são todas ST6. Esse resultado reforça o observado no dendrograma com o resultado de PFGE (Figura 19), de que havia em 2009 um clone disseminado no hospital, ST103, como observado para VRE 2 e todas as amostras idênticas a ele do subtipo A1 e houve a inserção e disseminação de um novo clone no hospital, ST 6, no período entre 2009 e 2011, identificado nos pulsotipos B, C e D.

No banco de dados do site para *E. faecalis* existem 1194 isolados cadastrados, classificadas em 517 STs diferentes (dados do dia 06 de dezembro de 2013). A Figura 20 mostra o cenário e o agrupamento de todos os ST cadastrados, as linhas que unem dois pontos representam STs com variação em um locus e o tamanho do ponto é proporcional ao número de isolados classificados como tal ST.

Existe apenas uma amostra registrada no banco de dados como ST103, que foi isolada nos EUA e inserida no sistema em 2006. Este ST é *Single Locus Variant* (SLV) do ST 388 (Figura 20), que possui um isolado no banco de dados encontrado na França em 2008 e do ST 487, isolado nos EUA; é ainda *Double Locus Variant* (DLV) do ST 159 (Figura 20), com 3

isolados em Portugal e 1 na França. Um estudo realizado que buscava relações genéticas entre 106 linhagens de *E. faecalis*, isolados em um período de 100 anos e que incluía amostras diversas e importantes historicamente, encontrou apenas um ST 103, isolado do sangue, o qual possuía genótipo *vanB* e o gene *aac(6')-aph(2'')* de resistência à aminoglicosídeos (106). Ou seja, assim como os isolados no Hospital Risoleta Tolentino Neves, ele possuía resistência à vancomicina e aminoglicosídeos. No mesmo estudo, o ST 6 foi o segundo tipo de sequência mais encontrado.

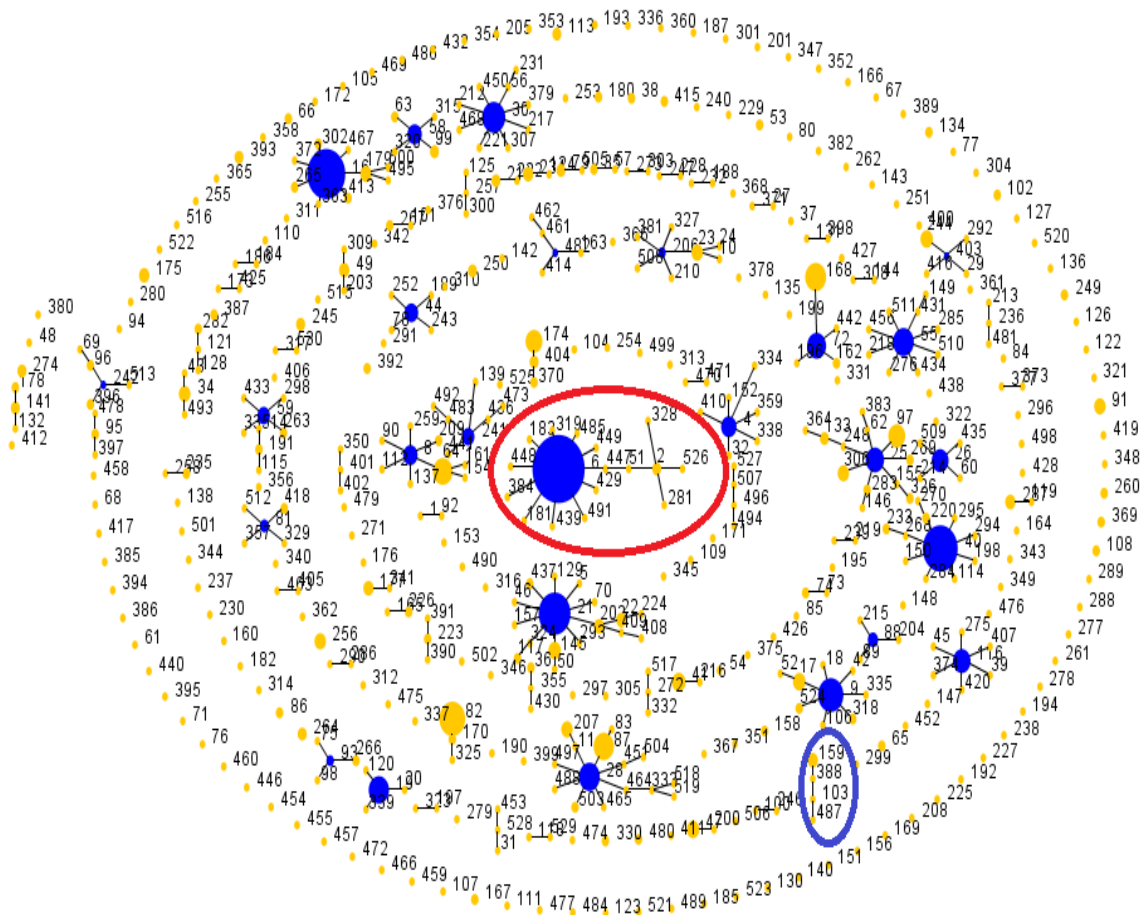


Figura 20- Diagrama realizado pelo eBURST v3 representando STs registrados no banco de dados de *E. faecalis* e as relações entre eles. Os números são os STs. Linhas que unem dois pontos representam STs com variação em um locus e o tamanho do ponto é proporcional ao número de isolados no banco de dados classificados como tal ST. O círculo azul mostra o ST 103 e o círculo vermelho o complexo clonal 2, com o ST 6 como seu fundador.

O ST 6 pertence ao complexo clonal 2 (CC2) e é o tipo de sequência com maior número de isolados no banco de dados, sendo 107, isolados na Espanha, Portugal, EUA, Polônia, Cuba, Noruega, Países Baixos, França, Japão e Nigéria. A relação do ST6 com os STs do CC2 é mostrada de forma ampliada na Figura 21.

Algumas das linhagens de *E. faecalis* utilizadas em laboratório como controles são ST 6, como é o caso das linhagens *E. faecalis* V583 (primeiro *E. faecalis* a ter genoma sequenciado e primeiro isolado resistente à vancomicina nos EUA), *E. faecalis* HH22 (primeiro isolado β -lactamase positivo) e *E. faecalis* MMH594 (primeiro isolado onde se teve ilha de patogenicidade descrita) (106).

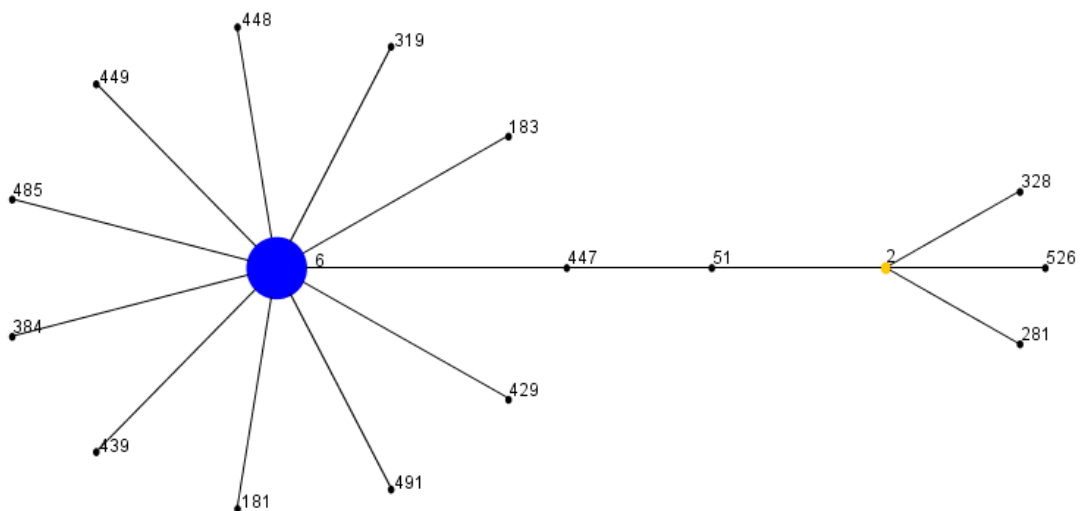


Figura 21- Representação do CC2. O ST 6 é o fundador. Os números são os STs. Linhas que unem dois pontos representam STs com variação em um locus e o tamanho do ponto é proporcional ao número de isolados no banco de dados. O ST6 é variante em três locus do ST2, que dá nome ao complexo clonal.

Nos EUA, a linhagem ST6 *E. faecalis* MMH594 foi responsável por um surto hospitalar que se estendeu por cerca de dois anos (106; 107). Um clone de *E. faecalis vanA* multirresistente ST6-CC2 é também altamente disseminado em hospitais na Itália, Espanha e Portugal desde 1993 (108).

No banco de dado de MLST existem 17 isolados brasileiros cadastrados, nenhum deles é ST 6, no entanto há um isolado ST 526, que faz parte do CC2, sendo SLV do ST 2 e variante em quatro *locus* do ST 6.

A inserção do CC2 no hospital é um fato preocupante, uma vez que este complexo clonal é considerado de alto risco, principalmente o ST 6, que normalmente está associado a multirresistência.

5 Conclusões

Amostras de VRE isoladas nos anos de 2009 e 2011 provenientes de um estudo de vigilância no Hospital Risoleta Tolentino Neves foram identificadas por multiplex-PCR. De 63 amostras isoladas em 2009, 47 (74,6%) são da espécie *E. faecium*, 14 (22,2%) da espécie *E. faecalis*, 1 (1,6%) foi identificada como sendo da espécies *E. gallinarum* e nenhuma *E. casseliflavus*. Das 47 VRE isoladas em 2011, 29 pertencem à espécie *E. faecalis* (61,7%), 17 delas pertencem à espécie *E. faecium* (36,2%) e 1 pertence à espécie *E. gallinarum*. Nota-se uma mudança na espécie prevalente, de *E. faecium* em 2009 para *E. faecalis* em 2011. Estudos em diferentes hospitais do Brasil chegam a resultados diferentes quando se analisam a espécie prevalente: em um estudo, *E. faecalis* se mostra prevalente no ambiente hospitalar (39), mas em outro há a prevalência de *E. faecium* (109). É natural que haja flutuações desta forma, já que espécies/linhagens diferentes podem ser introduzidas no ambiente hospitalar através da transferência de pacientes, ou até mesmo as resistentes serem selecionadas mediante o uso de antimicrobianos e posteriormente se disseminarem com mais facilidade. Além disso, o número reduzido de amostras e o curto período de vigilância não nos permite falar de prevalência absoluta no hospital.

Os 14 *E. faecalis* de 2009 e os 29 de 2011 foram selecionados para este estudo, sendo que 2 dos isolados de 2009 (VREfs 15 e 22) e 4 dos isolados de 2011 (VREfs 65, 108, 109 e 110) pertenciam à sítios de infecção. O restante das amostras foi isolado em sítios de colonização.

Estudos genotípicos com os VREfs mostraram que todos eles possuem genótipo *vanA* e todos, com exceção do VRE 15, apresentam o transposon Tn1546 intacto. O genótipo *vanA* é condizente com o fenótipo de alta resistência à vancomicina, para a qual todas as amostras apresentaram uma CIM maior que 256 µg/mL. O gene *vanA* é prevalente no Brasil e nosso estudo confirma esse fato.

O perfil prevalente dos fatores de virulência nos VREfs em 2009 era *elrA⁺gelE⁺*, sendo que apenas uma das amostra diferia deste perfil. Em 2011 houve uma mudança no perfil, sendo que o perfil prevalente foi *cyl⁺esp⁺elrA⁺gelE⁺* com 12 amostras (41,3%), seguido de *elrA⁺gelE⁺* com 11 amostras (37,9%), as 6 amostras restantes (20,8%) tem o perfil *cyl⁺elrA⁺gelE⁺*. As amostras mais virulentas estão relacionadas com o ST6. Todas as amostras de 2011 com o perfil *elrA⁺gelE⁺* são do pulsotipo A, juntamente com as amostras de 2009. O

aumento da presença de fatores de virulência é preocupante, uma vez que linhagens mais virulentas possuem características que podem agravar um processo infeccioso.

A análise dos pulsotipos após a realização do PFGE revela que havia um clone disseminado no hospital Risoleta Tolentino Neves em 2009, quando 13 das 14 amostras possuíam o mesmo subtipo e a amostra restante era intimamente relacionada a elas, sendo todas do pulsotipo A. A análise das amostras de 2009 mostra que este clone persiste no hospital, uma vez que há amostras em 2011 que são classificadas como pulsotipo A. Dentro deste intervalo também nota-se o surgimento de um novo clone no hospital, que deu origem ao pulsotipo B, o qual também se disseminou no hospital. Este clone provavelmente foi trazido ao hospital por pacientes colonizados ou infectados transferidos de outras unidades de saúde e pode ser mais virulento que o clone persistente desde 2009, sendo que a maioria dos isolados possui os quatro fatores de virulência estudados neste trabalho.

As amostras de 2011 também mostraram maior resistência aos antibióticos testados. Em 2009, nenhum do VREfs era resistente à linezolida e tigeciclina, enquanto em 2011 uma amostra apresentou resistência intermediária à linezolida e 10 (34,5%) das 29 amostras se mostraram resistentes à tigeciclina. Este 10 isolados pertencem ao pulsotipo A2 e foram isoladas de 7 pacientes diferentes mostrando o potencial de disseminação. O surgimento do subtipo A2 com isolados resistentes à tigeciclina em 2011 e o conhecimento de que essa droga era usada no tratamento de algumas doenças pode sugerir que uma exposição a esta droga pode ter selecionado microrganismos resistentes dentro do intervalo de dois anos entre os isolados do Pulsotipo A de 2009. Apesar de sabermos que em 2011 se iniciou o uso deste antimicrobiano no Hospital, não temos os dados se estes pacientes receberam tigeciclina durante o curso de sua internação. O surgimento de resistência aos novos antibióticos disponíveis no mercado é motivo de preocupação, uma vez que as drogas disponíveis para o tratamento de VRE são limitadas (28).

Quanto a resistência à altas concentrações de aminoglicosídeos, todos os isolados apresentaram o mesmo perfil, sendo resistentes à altas concentrações de gentamicina e sensíveis à altas concentrações de estreptomicina. A resistência a altas concentrações de aminoglicosídeos indicam que o tratamento com a combinação de um antibiótico que age na parede celular com um aminoglicosídeo pode ser difícil e outras terapias devem ser buscadas para a cura por infecções causadas por estas bactérias neste hospital.

Todas as amostras testadas do pulsotipo A são ST103, enquanto que os representantes dos pulsotipos B, C e D são ST6, que pertence ao CC2. O CC2 é considerado de risco e sua inserção no hospital, juntamente com o aumento da resistência e virulência nos isolados de

2009 é preocupante, podendo agravar as infecções nosocomiais no hospital e aumentar a mortalidade de pacientes.

Através desses experimentos foi possível traçar um perfil de virulência e resistência dos *E. faecalis* resistentes à vancomicina no Hospital Risoleta Tolentino Neves, bem como identificar clones envolvidos na colonização destes pacientes. Esses resultados também ajudam a Comissão de Controle de Infecções Hospitalares a observar a dinâmica das linhagens presentes e fornecem subsídios para tentar melhorar o controle desse microrganismo.

REFERÊNCIAS

- 1 MURRAY, B. E. The life and times of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 46-65, 1990.
- 2 MURRAY, B. E. Vancomycin-resistant enterococcal infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 10, p. 710-721, 2000.
- 3 CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C. G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clinical Microbiology Review**, v. 13, n. 4, p. 686–707, 2000.
- 4 DELISLE, S.; PERL, T. M. Vancomycin-resistant enterococci: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. **Chest**, v. 123, n. 5, p. 504S-518S, 2003. Supplement.
- 5 TEIXEIRA, L. M. et al. *Enterococcus*. In: VERSALOVIC, J. et al. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 10th ed. Washington: ASM Press, 2011. v. 1, cap. 21, p. 350-364.
- 6 TOP, J.; WILLEMS, R.; BONEN, M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 297-308, 2008.
- 7 HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. **Virulence**, v. 3, n. 5, p. 421–433, 2012.
- 8 SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 2, p. 215-224, 2002.
- 9 DAMANI, A. et al. A newly described vancomycin-resistant ST412 *Enterococcus faecium* predominant in Greek hospitals. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 29, n. 3, p. 329-331, 2009.
- 10 HIDRON, A. I. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2006–2007. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 11, p. 996-1011, 2008

11 ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Antimicrobial Resistance**, v. 52, n. 9, p. 1138-1142, 2011.

12 ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 266-278, 2012.

13 OH, J. Y. et al. Phenotypic and genotypic differences of the vancomycin-resistant enterococcus faecium isolates from humans and poultry in Korea. **The Journal of Microbiology**, v.45, n. 5, p. 466-472, 2007.

14 MAROTHI, Y. A.; AGNIHOTRI, H.; DUBEY D. Enterococcal resistance – an overview. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 214-219, 2005

15 PAULSEN, I. T. et al. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Science**, v. 299, n. 5615, p. 2071-2074, 2003.

16 NAGARAJAN, R. Antibacterial activities and modes of action of vancomycin and related glycopeptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 4, p. 605-609, 1991.

17 RYBAK, M. J. The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of vancomycin. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42 , p. S35-S39, 2006. Supplement 1.

18 LEVINE, D. P. Vancomycin: a history. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. S5-S12, 2006. Supplement 1.

19 KRUSE, H. et al. The use of avoparcin as a growth promoter and the occurrence of vancomycin-resistant enterococcus species in norwegian poultry and swine production. **Microbial Drug Resistance**, v. 5, n. 2, p. 135-139, 1999.

20 D'COSTA, V. M. et al. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, n. 7365, p. 457-461, 2011.

21 GUARDABASSI, L. et al. Glycopeptide resistance vanA operons in *Paenibacillus* strains isolated from soil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4227-4233, 2005.

22 UTTLEY, A. H. C. et al. Vancomycin-resistant enterococci. **Lancet**, v. 331, n. 8575, p. 57-58, 1988.

- 23 SAHM, D. F. et al. In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, n. 9, p. 1588-1591, 1989.
- 24 DEMERTZI, E. et al. Characterization of VanA and VanB elements from glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* from Greece. **Antimicrobial Agents and Resistance**, v. 50, n. 8, p. 682-687, 2001.
- 25 BELL, J. M.; PATON, J. C.; TURNIDGE, J. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 8, p. 2187-2190, 1998.
- 26 DALLA COSTA, L. M. et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 160-163, 1998.
- 27 ZANELLA, R. C. et al. Phenotypic and genotypic characterization of VanA *Enterococcus* isolated during the first nosocomial outbreak in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 9, n. 3, p. 283-291, 2003.
- 28 HENRIQUE, P. M. et al. Molecular characterization of enterococci harboring genotype and molecular characterization of enterococci harboring genotype and in Brazilian hospitals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 301-305, 2008.
- 29 REYNOLDS, P. E. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 8, n. 11, p. 943-950, 1989.
- 30 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. São Paulo: Editora Sarvier, 2006.
- 31 KASMAR, A. G.; HOOPER, D. Farmacologia das infecções bacterianas: síntese da parede celular. In: ARMSTRONG, E. J. M. D.; TASHIJAN, A. H.; GOLAN, D.E. M. D. **Princípios de Farmacologia**- a base fisiopatológica da farmacoterapia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. cap. 33, p. 562-577.
- 32 COURVALIN, P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. S25-S34, 2006. Supplement.
- 33 SILVEIRA, G. P. et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

34 XU, X. et al. vanM, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, pp. 4643-4647, 2010.

35 GOLD, H. S. Vancomycin-resistant enterococci: mechanisms and clinical observations. **Antimicrobial Resistance**, v. 33, n. 2, p. 210-219, 2001.

36 LECLERCQ, R.; COURVALIN, P. Resistance to glycopeptides in enterococci. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p. 545-556, 1997.

37 PALAZZO, I. C. V. et al. Evaluation of clonality in enterococci isolated in Brazil carrying Tn1546-like elements associated with vanA plasmids. **FEMS Microbiology Letters**, v. 258, n. 1, p. 29-36, 2006.

38 PALAZZO, I. C. V. et al. Changes in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing outbreaks in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, v. 79, n. 1, p. 70-74, 2011.

39 D'AZEVEDO, P. A. et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci strains eight years apart from its first isolation in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 4, p. 195-198, 2008.

40 MORETTI, M. L. et al. Clonal dissemination of VanA-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecalis* between hospitals of two cities located 100 km apart. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 9, p. 1339-1343, 2004.

41 CORDEIRO, J. C. R. et al. Inter-hospital dissemination of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecalis* in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 3, p. 260-262, 2004.

42 WOODFORD, N. et al. Current perspectives on glycopeptide resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 585-615, 1995.

43 CAMARGO, I. L. B. C. et al. 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, n. 8, p. 513-519, 2005.

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

45 PÉRICHON, B.; COURVALIN, P. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 11, p. 4580–4587, 2009.

46 ARTHUR, M. et al. Quantitative analysis of the metabolism of soluble cytoplasmic peptidoglycan precursors of glycopeptide-resistant enterococci. **Molecular Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 33-44, 1996.

47 ARTHUR, M. et al. Mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. **Journal of Infection**, v. 32, n. 1, p. 11-16, 1996.

48 ARTHUR, M. et al. The VanS sensor negatively controls VanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 1, p. 97-106, 1997.

49 WOODFORD, N. Glycopeptide-resistant enterococci: a decade of experience. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, n. 10, p. 846-862, 1998.

50 ARTHUR, M. et al. The vanZ gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin. **Gene**, v. 154, n. 1, p. 87-92, 1995.

51 JETT, B. D.; HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 4, p. 462-478, 1994.

52 COTTER, P. A. Genetic approaches to studying bacterial pathogenesis. In: ENGLEBERG, N. C.; DERMODY, T.; DIRITA, V. **Schaechter's mechanisms of microbial disease**. 5th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2012. cap. 4, p. 38-65.

53 CAMARGO, I. L. B. C. et al. Virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 273-278, 2008.

54 BRINSTER, S. et al. Enterococcal leucine-rich repeat-containing protein involved in virulence and host inflammatory response. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 9, p. 4463–4471, 2007.

55 COX, C. R.; COBURN, P. S.; GILMORE, M. S. *Enterococcal cytolyisin*: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. **Current Protein and Peptide Science**, v. 6, n. 1, p. 77-84, 2005.

56 COBURN, P. S.; GILMORE, M. S. The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 661–669, 2003.

57 IKE, Y.; HASHIMOTO, H.; CLEWELL, D. B. Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies *zymogenes* contributes to virulence in mice. **Infection and Immunity**, v. 45, n. 2, p. 528-530, 1984.

58 PARK, S. Y. et al. Immune evasion of *Enterococcus faecalis* by an extracellular gelatinase that cleaves C3 and iC3b. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 9, p. 6328-6336, 2008.

59 WATERS, C. M. et al. Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 12, p. 3613–3623, 2003.

60 KRISTICH, C. J. et al. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 1, p. 154–163, 2004.

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

62 PAPA, M. F. D. et al. Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 24, p. 8835–8843, 2007.

63 TENDOLKAR, P. M. et al. Enterococcal surface protein, *esp*, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 6032–6039, 2004.

64 RATHNAYAKE, I. U.; HARGREAVES, M.; HUYGENS, F. Antibiotic resistance and virulence traits in clinical and environmental *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 326–333, 2012.

65 BRINSTER, S.; FURLAN, S.; SERROR, P. C-Terminal WxL domain mediates cell wall binding in *Enterococcus faecalis* and other gram-positive bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 189, 4, p. 1244–1253, 2007.

66 ARAOS, R. et al. Daptomicina: características farmacológicas y aporte en el tratamiento de infecciones por cóceas gram positivas. **Revista Chilena de Infectología**, v. 29, n. 2, p. 127-131, 2012.

67 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Detalhe do produto:** cubicin. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/rconsulta_produto_detalhe.asp>. Acesso em: 23 ago. 2013.

68 POGLIANO, J.; POGLIANO, N.; SILVERMAN, J. A. Daptomycin-mediated reorganization of membrane architecture causes mislocalization of essential cell division proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 17, p. 4494–4504, 2012.

69 CASAPAO, A. M. et al. Multicenter study of high-dose daptomycin for treatment of enterococcal infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 9, p.4190-4196, 2013.

70 ARIAS, C. A. et al. Genetic basis for in vivo daptomycin resistance in enterococci. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 10, p. 892-900, 2011.

71 SEPUTIENE, V. et al. Tigecycline – how powerful is it in the fight against antibiotic-resistant bacteria? **Medicina (Kaunas)**, v. 46, n. 4, p. 240-248, 2010.

72 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Detalhe do produto:** tygacil. Brasília, 2005. Disponível em: <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/rconsulta_produto_detalhe.asp>. Acesso em: 23 ago. 2013.

73 STEIN, G. E.; BABINCHAK, T. Tigecycline: an update. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, n. 4, p. 331–336, 2013.

74 RYOU, M.; COEN, D. M. Farmacologia das infecções bacterianas: replicação, transcrição e tradução do DNA. In: ARMSTRONG, E. J. M. D.; TASHIJAN, A. H.; GOLAN, D.E. M. D. **Princípios de Farmacologia-** a base fisiopatológica da farmacoterapia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. cap. 32, p. 547-560.

75 DA SILVA, L. M.; SALGADO, H. R. N. Tigecycline: a review of properties, applications, and analytical methods. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 32, n. 3, p. 282-288, 2010.

76 ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. **Expert Reviews of Anti-infective Therapy**, v. 6, n. 5, p. 637-655, 2008.

77 MEKA, V. G.; GOLD, H. S. Antimicrobial resistance to linezolid. **Antimicrobial Resistance**, v. 39, n. 7, p. 1010–1015, 2004.

78 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Detalhe do produto: zyvox**. Brasília, 2005. Disponível em: <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/rconsulta_produto_detalhe.asp>. Acesso em: 27 ago. 2013.

79 MOELLERING, R. C. Linezolid: the first oxazolidinone antimicrobial. **Annals of Internal Medicine**, v. 138, n. 2, p. 135-142, 2003.

80 WILSON, D. N. et al. The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 36, p. 13339-13344, 2008.

81 BOLANO, A. et al. Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research**. v. 1, n. 3, p. 221-224, 2001.

82 PALAZZO, I. C. V.; REHDER, A.; DARINI, A. L. C. Quantitative disk diffusion as a convenient method for determining minimum inhibitory concentrations of oxacillin for staphylococci strains. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, n. 3, p. 186-190, 2007.

83 DUTKA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by per. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 24-27, 1995.

84 WOODFORD, N. et al. 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, n. 3, p. 653-658, 1993.

85 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: HORAUD, T.; BOUVET, A.; LECLERCQ, R.; DE MONTCLOS, H.; SICARD, M. **Streptococci and the Host**. Nova York: Pletum, 1997. cap. 98, p. 409-412.

86 ARTHUR, M. et al. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 1, p. 117-127, 1993.

87 CAMARGO, I. L. B. C.; GILMORE, M. S.; DARINI, A. L. C. Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive

Enterococcus faecium isolates from Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 11, p. 1123-1130, 2006.

88 EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1628–1635, 2001.

89 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M100-S23: performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, PA, 2013. Informational supplement, 23.

90 CHOW, J. W. Aminoglycoside resistance in Enterococci. **Clinical Infection Diseases**, v. 31, n. 2, p. 586-589, 2000.

91 MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**. v. 84, n. 4, p. 538–544, 1998.

92 EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters**. Basel, 2013. Disponível em: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2013.

93 TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, 9, p. 2233–2239, 1995.

94 SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 312-316, 1999.

95 PÉREZ-LOSADA, M. et al. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 16, p. 38-53, 2013.

96 RUIZ-GARBAJOSA, P. et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2220–2228, 2006.

97 *Enterococcus faecalis* database. Multi locus sequence typing home page. Disponível em: <<http://efaecalis.mlst.net/#>>. Acesso em: 28 ago. 2013.

98 FEIL, E. J. et al. BURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1518-1530, 2004.

99 NASER, S. M., et. al. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on rpoA and pheS genes. **Microbiology**, 151, p. 2141-2150, 2005.

100 PANESSO, D. et al. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in South America hospitals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1562-1569, 2010.

101 MERQUIOR, V. L. C. et al. Emergence and characterisation of vanB vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 557-560, 2012.

102 SCHOUTEN, M. A. et al. Molecular analysis of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant enterococci isolated from patients in Europe shows geographic transposon type clustering. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 986-989, 2001.

103 MOELLERING, R. C.; WEINBERG, A. Studies on antibiotic synergism against enterococci: II. effect of various antibiotics on the uptake of ¹⁴C-labeled streptomycin by enterococci. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 50, n. 12, p. 2580-2584, 1971.

104 CORDINA, C. et al. Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* associated with omeprazole use in a surgical patient. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 7, p. 1806-1807, 2012.

105 WERNER, G. et. al. Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from a German intensive care unit patient. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. 1182-1183, 2008.

106 MCBRIDE, S. M. et al. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. **PLoS ONE**, v. 2, n. 7, p. e582, 2007.

107 HUYCKE, M. M.; SPIEGEL, C. A.; GILMORE, M. S. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 8, p. 1626-1634, 1991.

108 FREITAS, A. R. et al. Human and swine hosts share vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* CC17 and CC5 and *Enterococcus faecalis* CC2 clonal clusters harboring Tn1546 on indistinguishable plasmids. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 49, n. 3, p. 925–931, 2011.

109 MORETTI, M. L. et al. Controlling a vancomycin-resistant enterococci outbreak in a Brazilian teaching hospital. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, n. 3, p. 369–374, 2011.

Anexo I- *Enterococcus* resistentes à vancomicina isolados e sua identificação.

Amostra	Espécime Clínico	Data de isolamento	Número do paciente	Sexo do paciente	Espécie
VRE 1	Swab Perianal	25/06/2009	1	M	<i>E. faecium</i>
VRE 2	Swab Axilar	13/07/2009	2	M	<i>E. faecalis</i>
VRE 3	Swab Perianal	13/07/2009	3	F	<i>E. faecium</i>
VRE 4	Swab Perianal	24/08/2009	4	F	<i>E. faecalis</i>
VRE 5	Swab Perianal	24/08/2009	5	F	<i>E. faecium</i>
VRE 6	Swab Perianal	24/08/2009	6	F	<i>E. faecium</i>
VRE 7	Swab Perianal	24/08/2009	7	F	<i>E. faecium</i>
VRE 8	Swab Perianal	24/08/2009	8	M	<i>E. faecalis</i>
VRE 9	Swab Perianal	19/08/2009	9	M	<i>E. faecium</i>
VRE 10	Swab Perianal	18/08/2009	10	M	<i>E. faecium</i>
VRE 11	Swab Perianal	03/09/2009	11	M	<i>E. faecium</i>
VRE 12	Swab Perianal	27/08/2009	12	F	<i>E. faecalis</i>
VRE 13	Swab Perianal	27/08/2009	11	M	<i>E. faecium</i>
VRE 14	Swab Perianal	03/09/2009	13	F	<i>E. faecium</i>
VRE 15	Hemocultura	05/09/2009	14	F	<i>E. faecalis</i>
VRE 16	Swab Perianal	03/09/2009	15	M	<i>E. faecium</i>
VRE 17	Swab Perianal	27/08/2009	16	F	<i>E. faecium</i>
VRE 18	Swab Perianal	27/08/2009	8	M	<i>E. faecalis</i>
VRE 19	Swab Perianal	27/08/2009	17	M	<i>E. faecium</i>
VRE 20	Swab Perianal	10/09/2009	18	F	<i>E. faecium</i>
VRE 21	Swab Perianal	14/09/2009	19	F	<i>E. faecalis</i>
VRE 22	Tecido Profundo Pé Esquerdo	24/09/2009	20	M	<i>E. faecalis</i>
VRE 23	Hemocultura	08/10/2009	21	M	<i>E. faecium</i>
VRE 24	Swab Perianal	28/09/2009	8	M	<i>E. faecium</i>
VRE 25	Swab Perianal	28/09/2009	22	M	<i>E. faecium</i>
VRE 26	Swab Perianal	05/10/2009	23	F	<i>E. faecium</i>
VRE 27	Swab Perianal	08/10/2009	18	F	<i>E. faecium</i>
VRE 28	Swab Perianal	08/10/2009	24	M	<i>E. faecium</i>
VRE 29	Swab Perianal	08/10/2009	25	M	<i>E. faecalis</i>
VRE 30	Swab Perianal	29/10/2009	26	M	<i>E. faecium</i>
VRE 31	Swab Colchão	20/10/2009	27	F	<i>E. faecium</i>
VRE 32	Swab Perianal	21/10/2009	28	F	<i>E. faecalis</i>
VRE 33	Swab Perianal	22/10/2009	29	F	<i>E. faecium</i>
VRE 34	Swab Perianal	16/11/2009	30	F	<i>E. faecium</i>
VRE 35	Swab Perianal	16/11/2009	31	F	<i>E. faecium</i>
VRE 36	Swab Perianal	05/11/2009	32	M	<i>E. faecium</i>
VRE 37	Swab Perianal	05/11/2009	33	M	<i>E. faecium</i>
VRE 38	Swab Perianal	05/11/2009	29	F	<i>E. faecalis</i>
VRE 39	Swab Perianal	05/11/2009	31	F	<i>E. faecium</i>
VRE 40	Swab Perianal	10/12/2009	28	F	<i>E. faecium</i>
VRE 41	Swab Perianal	26/11/2009	34	M	<i>E. faecium</i>
VRE 42	Swab Perianal	23/11/2009	35	M	<i>E. gallinarum</i>

Continua

continuação

Amostra	Espécime Clínico	Data de isolamento	Número do paciente	Sexo do paciente	Espécie
VRE 43	Swab Perianal	21/11/2009	36	F	<i>E. faecium</i>
VRE 44	Swab Perianal	20/11/2009	37	F	<i>E. faecium</i>
VRE 45	Swab Perianal	25/11/2009	38	M	<i>E. faecium</i>
VRE 46	Swab Perianal	19/11/2009	39	F	<i>E. faecium</i>
VRE 47	Swab Perianal	18/11/2009	40	M	<i>E. faecium</i>
VRE 48	Swab perianal	17/11/2009	41	M	<i>E. raffinosus</i>
VRE 49	Swab Perianal	23/11/2009	34	M	<i>E. faecium</i>
VRE 50	Swab Perianal	23/11/2009	42	M	<i>E. faecium</i>
VRE 51	Swab Perianal	23/11/2009	43	F	<i>E. faecium</i>
VRE 52	Swab Perianal	23/11/2009	34	M	<i>E. faecium</i>
VRE 53	Swab Perianal	25/11/2009	6	F	<i>E. faecalis</i>
VRE 54	Swab Perianal	14/12/2009	44	M	<i>E. faecium</i>
VRE 55	Swab Perianal	14/12/2009	45	F	<i>E. faecium</i>
VRE 56	Swab Axilar	21/12/2009	46	F	<i>E. faecalis</i>
VRE 57	Swab Perianal	21/12/2009	28	F	<i>E. faecalis</i>
VRE 58	Swab Perianal	04/01/2010	47	M	<i>E. faecium</i>
VRE 59	Swab Perianal	04/01/2010	48	F	<i>E. faecium</i>
VRE 60	Swab Perianal	04/01/2010	49	M	<i>E. faecium</i>
VRE 61	Swab Perianal	31/12/2009	50	M	<i>E. faecium</i>
VRE 62	Swab Perianal	30/12/2009	51	F	<i>E. faecium</i>
VRE 63	Swab Perianal	23/11/2009	52	F	<i>E. faecium</i>
VRE 64	Swab Perianal	10/03/2011	53	M	<i>E. faecium</i>
VRE 65	Hemocultura	10/03/2011	54	F	<i>E. faecalis</i>
VRE 66	Swab Perianal	11/03/2011	55	M	<i>E. gallinarum</i>
VRE 67	Swab Perianal	11/03/2011	56	M	<i>E. faecalis</i>
VRE 68	Swab Perianal	11/03/2011	57	F	<i>E. faecalis</i>
VRE 69	Swab Perianal	11/03/2011	54	F	<i>E. faecalis</i>
VRE 70	Swab Perianal	11/03/2011	58	M	<i>E. faecium</i>
VRE 71	Swab Perianal	25/03/2011	59	F	<i>E. faecium</i>
VRE 72	Swab Perianal	25/03/2011	60	M	<i>E. faecalis</i>
VRE 73	Swab Perianal	25/03/2011	61	M	<i>E. faecium</i>
VRE 74	Swab Perianal	25/03/2011	62	F	<i>E. faecalis</i>
VRE 75	Swab Perianal	25/03/2011	63	F	<i>E. faecalis</i>
VRE 76	Swab Perianal	25/03/2011	64	M	<i>E. faecium</i>
VRE 77	Swab Perianal	25/03/2011	54	F	<i>E. faecalis</i>
VRE 78	Swab Perianal	01/04/2011	59	F	<i>E. faecium</i>
VRE 79	Swab Perianal	01/04/2011	65	M	<i>E. faecalis</i>
VRE 80	Swab axilar	01/04/2011	66	F	<i>E. faecalis</i>
VRE 81	Swab Perianal	04/04/2011	67	F	<i>E. faecium</i>
VRE 82	Swab Perianal	04/04/2011	68	M	<i>E. faecium</i>
VRE 83	Swab Perianal	04/04/2011	69	M	<i>E. faecalis</i>
VRE 84	Swab Perianal	04/04/2011	70	F	<i>E. faecium</i>
VRE 85	Swab Perianal	14/04/2011	71	M	<i>E. faecium</i>

continuação

conclusão

Amostra	Espécime Clínico	Data de isolamento	Número do paciente	Sexo do paciente	Espécie
VRE 86	Swab Perianal	14/04/2011	55	M	<i>E. faecalis</i>
VRE 87	Swab Perianal	14/04/2011	64	M	<i>E. faecalis</i>
VRE 88	Swab axilar	15/04/2011	72	F	<i>E. faecalis</i>
VRE 89	Swab Perianal	29/04/2011	73	M	<i>E. faecium</i>
VRE 90	Swab Perianal	29/04/2011	74	M	<i>E. faecalis</i>
VRE 91	Swab Perianal	29/04/2011	75	F	<i>E. faecium</i>
VRE 92	Swab Perianal	29/04/2011	76	F	<i>E. faecalis</i>
VRE 93	Swab Perianal	05/05/2011	66	F	<i>E. faecium</i>
VRE 94	Swab Perianal	05/05/2011	72	F	<i>E. faecalis</i>
VRE 95	Swab Perianal	05/05/2011	77	F	<i>E. faecalis</i>
VRE 96	Swab Perianal	05/05/2011	78	M	<i>E. faecalis</i>
VRE 97	Swab Perianal	05/05/2011	79	M	<i>E. faecalis</i>
VRE 98	Swab Perianal	05/05/2011	80	M	<i>E. faecalis</i>
VRE 99	Swab Perianal	06/05/2011	64	M	<i>E. faecalis</i>
VRE 100	Swab Axilar	06/05/2011	81	M	<i>E. faecalis</i>
VRE 101	Swab Perianal	06/05/2011	82	M	<i>E. faecium</i>
VRE 102	Swab Perianal	06/05/2011	73	M	<i>E. faecium</i>
VRE 103	Swab Perianal	06/05/2011	83	M	<i>E. faecalis</i>
VRE 104	Swab Perianal	06/05/2011	84	M	<i>E. faecalis</i>
VRE 105	Swab Perianal	06/05/2011	85	F	<i>E. faecalis</i>
VRE 106	Swab Perianal	06/05/2011	75	F	<i>E. faecium</i>
VRE 107	Swab Perianal	06/05/2011	86	F	<i>E. faecium</i>
VRE 108	Ferida operatória	09/05/2011	84	M	<i>E. faecalis</i>
VRE 109	Hemocultura	13/05/2011	55	M	<i>E. faecalis</i>
VRE 110	Urina	03/06/2011	87	F	<i>E. faecalis</i>

Anexo II- Dados do estudo dos isolados de *E. faecalis*

Amostras	Espécime Clínico	Data de isolamento	Número do Paciente	Vancomicina (CIM µg/mL)	Daptomicina (CIM µg/mL)	Linezolida (CIM µg/mL)	Tigeciclina (CIM µg/mL)	HLGR (≥ 500 µg/mL)	HLSR (≥ 2000 µg/mL)	Citolisina (hemólise)	<i>cyl</i>	<i>esp</i>	<i>elrA</i>	<i>gelE</i>
VRE2	Swab Axilar	13/07/2009	2	>256	1	2	0,125	R	S	Gama	-	-	+	+
VRE4	Swab Perianal	24/08/2009	4	>256	1	2	0,125	R	S	Gama	-	-	+	+
VRE8	Swab Perianal	24/08/2009	8	>256	1	2	0,125	R	S	Gama	-	-	+	+
VRE12	Swab Perianal	27/08/2009	12	>256	1	2	0,125	R	S	Gama	-	-	+	+
VRE15	Hemocultura	05/09/2009	14	>256	0,5	2	0,125	R	S	Gama	-	-	+	+
VRE18	Swab Perianal	27/08/2009	8	>256	1	2	0,25	R	S	Gama	-	-	+	+
VRE21	Swab Perianal	14/09/2009	19	>256	1	2	0,125	R	S	Gama	-	-	+	+
VRE22	Tecido Profundo Pé Esquerdo	24/09/2009	20	>256	1	2	0,125	R	S	Gama	-	-	+	+
VRE29	Swab Perianal	08/10/2009	25	>256	1	2	0,25	R	S	Gama	-	-	+	+
VRE 32	Swab Perianal	21/10/2009	28	>256	1	2	0,125	R	S	Gama	-	-	+	+
VRE 38	Swab Perianal	05/11/2009	29	>256	1	2	0,125	R	S	Beta	+	-	+	+
VRE 53	Swab Perianal	25/11/2009	6	>256	1	2	0,125	R	S	Gama	-	-	+	+
VRE 56	Swab Axilar	21/12/2009	46	>256	1	2	0,25	R	S	Gama	-	-	+	+
VRE 57	Swab Perianal	21/12/2009	28	>256	1	2	0,25	R	S	Gama	-	-	+	+

cyl - citolisina, *esp* - proteína de superfície de *Enterococcus*, *elrA* - Proteína rica em leucina A, *gelE* - gelatinase.

continua

continuação

Amostras	Espécime Clínico	Data de isolamento	Número do Paciente	Vancomicina (CIM µg/mL)	Daptomicina (CIM µg/mL)	Linezolida (CIM µg/mL)	Tigeciclina (CIM µg/mL)	HLGR (≥ 500 µg/mL)	HLSR (≥ 2000 µg/mL)	Citolisina (hemólise)	<i>cyl</i>	<i>esp</i>	<i>elrA</i>	<i>gelE</i>
VRE65	Hemocultura	10/03/2011	54	>256	0,5	2	2	R	S	Alfa	-	-	+	+
VRE67	Swab Perianal	11/03/2011	56	>256	0,5	2	0,0625	R	S	Beta	+	+	+	+
VRE68	Swab Perianal	11/03/2011	57	>256	2	2	0,0625	R	S	Beta	+	-	+	+
VRE69	Swab Perianal	11/03/2011	54	>256	1	2	2	R	S	Alfa	-	-	+	+
VRE72	Swab Perianal	25/03/2011	60	>256	0,5	2	0,125	R	S	Beta	+	+	+	+
VRE74	Swab Perianal	25/03/2011	62	>256	1	2	0,0625	R	S	Beta	+	-	+	+
VRE75	Swab Perianal	25/03/2011	63	>256	1	2	0,125	R	S	Beta	+	+	+	+
VRE77	Swab Perianal	25/03/2011	54	>256	1	2	2	R	S	Alfa	-	-	+	+
VRE79	Swab Perianal	01/04/2011	65	>256	1	2	0,125	R	S	Beta	+	+	+	+
VRE80	Swab axilar	01/04/2011	66	>256	1	2	2	R	S	Alfa	-	-	+	+
VRE83	Swab Perianal	04/04/2011	69	>256	2	2	0,125	R	S	Beta	+	+	+	+
VRE86	Swab Perianal	14/04/2011	55	>256	1	2	0,125	R	S	Beta	+	+	+	+
VRE87	Swab Perianal	14/04/2011	64	>256	1	2	0,125	R	S	Beta	+	+	+	+
VRE88	Swab axilar	15/04/2011	72	>256	1	2	0,125	R	S	Beta	+	+	+	+
VRE90	Swab Perianal	29/04/2011	74	>256	1	2	0,125	R	S	Beta	+	-	+	+
VRE92	Swab Perianal	29/04/2011	76	>256	1	2	0,125	R	S	Beta	+	+	+	+

cyl - citolisina, *esp* - proteína de superfície de *Enterococcus*, *elrA* - Proteína rica em leucina A, *gelE* - gelatinase.

continuação

conclusão

Amostras	Espécime Clínico	Data de isolamento	Número do Paciente	Vancomicina (CIM µg/mL)	Daptomicina (CIM µg/mL)	Linezolida (CIM µg/mL)	Tigeciclina (CIM µg/mL)	HLGR (≥ 500 µg/mL)	HLSR (≥ 2000 µg/mL)	Citolisina (hemólise)	<i>cyl</i>	<i>esp</i>	<i>elrA</i>	<i>gelE</i>
VRE94	Swab Perianal	05/05/2011	72	>256	1	2	0,125	R	S	Beta	+	-	+	+
VRE95	Swab Perianal	05/05/2011	77	>256	1	2	0,125	R	S	Beta	+	+	+	+
VRE96	Swab Perianal	05/05/2011	78	>256	0,5	2	0,125	R	S	Beta	+	+	+	+
VRE97	Swab Perianal	05/05/2011	79	>256	1	2	0,125	R	S	Beta	+	-	+	+
VRE98	Swab Perianal	05/05/2011	80	>256	1	2	2	R	S	Alfa	-	-	+	+
VRE99	Swab Perianal	06/05/2011	64	>256	1	2	0,25	R	S	Beta	+	-	+	+
VRE100	Swab Axilar	06/05/2011	81	>256	1	4	2	R	S	Alfa	-	-	+	+
VRE103	Swab Perianal	06/05/2011	83	>256	1	2	2	R	S	Alfa	-	-	+	+
VRE104	Swab Perianal	06/05/2011	84	>256	1	2	2	R	S	Alfa	-	-	+	+
VRE105	Swab Perianal	06/05/2011	85	>256	1	2	2	R	S	Alfa	-	-	+	+
VRE108	Ferida operatória	09/05/2011	84	>256	1	2	2	R	S	Alfa	-	-	+	+
VRE109	Hemocultura	13/05/2011	55	>256	0,5	1	0,0625	R	S	Alfa	-	-	+	+
VRE110	Urina	03/06/2011	87	>256	1	2	0,125	R	S	Beta	+	+	+	+

cyl - citolisina, *esp* - proteína de superfície de *Enterococcus*, *elrA* - Proteína rica em leucina A, *gelE* – gelatinase.