

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

MARCELA RODRIGUES COELHO

**CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS HOSPITALARES DE *ENTEROCOCCUS*  
RESISTENTES À VANCOMICINA (VRE): SUSCETIBILIDADE A  
ANTIMICROBIANOS E FATORES DE VIRULÊNCIA.**

VITÓRIA  
2013

MARCELA RODRIGUES COELHO

**CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS HOSPITALARES DE *ENTEROCOCCUS*  
RESISTENTES À VANCOMICINA (VRE): SUSCETIBILIDADE A  
ANTIMICROBIANOS E FATORES DE VIRULÊNCIA.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientador (a): Dra. Ana Paula Ferreira Nunes

Coorientador (a): Dr. Ricardo Pinto Schuenk

VITÓRIA

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

(Biblioteca Setorial de Ciências da Saúde,

Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

Coelho, Marcela Rodrigues, 1982-

C672c Caracterização de cepas hospitalares de *enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE): suscetibilidade a antimicrobianos e fatores de virulência / Marcela Rodrigues Coelho. – 2013.

69 f. : il.

Orientador: Ana Paula Ferreira Nunes.

Coorientador: Ricardo Pinto Schuenk.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da  
Saúde.

1. Enterococcus. 2. Resistência a Vancomicina. 3. Virulência.  
4. Agentes antiinfecciosos. I. Nunes, Ana Paula Ferreira. II.  
Schuenk, Ricardo Pinto. III. Universidade Federal do Espírito  
Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---



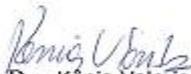
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE  
DISSERTAÇÃO DE Mestrado

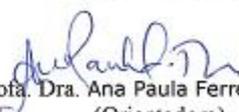
A mestranda MARCELA RODRIGUES COELHO apresentou a dissertação intitulada “CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS HOSPITALARES DE *Enterococcus* RESISTENTES A VANCOMICINA (VRE): SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E FATORES DE VIRULÊNCIA.” em sessão pública, no dia 26 de setembro de 2013, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu ( X ) **aprovar** ( ) **reprovar** a dissertação para habilitar a farmacêutica MARCELA RODRIGUES COELHO a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 26 de setembro de 2013

  
Prof. Dra. Kênia Valéria dos Santos  
(Membro Externo)

  
Prof. Dra. Liliana Cruz Spano  
(Membro Interno)

  
Prof. Dra. Ana Paula Ferreira Nunes  
(Orientadora)

  
Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck  
(Orientador)

**Dedico à Deus, tudo realmente  
acontece no Seu tempo.**

## AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Ana Paula Ferreira Nunes, minha orientadora, por abrir minha mente para pesquisa e torná-la fundamental em minha vida.

Ao professor Dr. Ricardo Pinto Schuenk, meu co-orientador, pelos conhecimentos transmitidos e pelas colaborações fundamentais.

À equipe do LACEN-ES, pelo apoio e colaboração em nossa pesquisa.

À Isabela Alochio Lucase Samyra Vanessa Ferreira Caetano, pela grandiosa colaboração na execução deste estudo e apoio.

Ao laboratório de Resistência Bacteriana, ao LABCAS e a toda equipe do setor de Patologia, onde passei momentos únicos e vivenciei um pouco dos prazeres e dificuldades presentes na rotina de pesquisadora.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas da UFES, pelos conhecimentos transmitidos de maneira tão intensa e por estarem sempre disponíveis.

À turma 2011 do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas da UFES, por ter sido única. Maravilhosas amigadas ali começaram. Levarei para o resto de minha vida nossos momentos inesquecíveis, crises de risos e ciladas.

Às empresas onde trabalhei neste período, por incentivarem o meu aperfeiçoamento e busca por novos conhecimentos.

Aos meus amigos, por sempre entender minhas inúmeras desculpas e ausências nesse período.

A minha família, que me apoiou durante todo o processo, que sentiu minha falta quando não pude estar presente e que sempre conseguia me deixar menos culpada pela ausência.

Aos meus pais, pela dedicação, apoio e confiança. Sem vocês não teria percorrido nem a metade do caminho que percorri. Muito obrigada pelos valores transmitidos. Amo vocês.

Ao meu marido e filha, pela compreensão inquestionável e apoio incondicional. Mesmo nos meus períodos de ausência plena, vocês estavam ao meu lado, torcendo por mais essa vitória. Tudo foi mais fácil com vocês do meu lado.

À Deus, por estar sempre presente em minha vida. Por me colocar de pé com fé e esperança nos momentos de maior dúvida. Por simplesmente fazer tudo acontecer no Seu tempo.

À FAPES, pelo apoio financeiro ao longo desses anos.

## RESUMO

*Enterococcus* são cocos Gram-positivos comumente encontrados no trato gastrointestinal de humanos e animais bem como no solo, água e alimentos. Eles constituem um gênero peculiar devido a sua notável capacidade de adquirir novos mecanismos de resistência, destacando-se entre as bactérias de maior versatilidade no cenário atual de resistência bacteriana e entre os principais agentes oportunistas de infecções hospitalares. Enterococo resistente à vancomicina (VRE) foi primeiramente identificado no final da década de 1980 em alguns países europeus. No presente estudo, cem isolados de VRE obtidos de diferentes hospitais da grande Vitória-ES foram pesquisados quanto aos seus genótipos de resistência e fatores de virulência codificados pelos genes *ace*, *efaA*, *gelE*, *agg* e *esp*. A presença de genes determinantes de resistência à vancomicina e espécie foram pesquisados pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando diferentes *primers* específicos (*vanA*, *van B*, *ddl E. faecalis* e *ddl E. faecium*). A susceptibilidade *in vitro* à ampicilina, penicilina, estreptomicina, gentamicina, tetraciclina, eritromicina, nitrofurantoina, norfloxacin, ciprofloxacina, teicoplanina, vancomicina e linezolida foi determinada pelo método de disco difusão e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de vancomicina pelo método de Teste E e diluição em ágar. Todos os isolados identificados como VRE eram pertencentes à espécie *Enterococcus faecium*. Todos os isolados apresentaram CIM de vancomicina >32 µg/ml e tiveram o gene *vanA* detectado na reação de PCR multiplex. O agente mais ativo *in vitro* foi a linezolida. A ocorrência de uma alta frequência de resistência múltipla aos antimicrobianos foi detectada entre esses isolados e esse fenótipo foi independente da origem dos mesmos. Muitos fatores de virulência foram descritos em *Enterococcus*, mas pouco se conhece a respeito da virulência de *Enterococcus faecium*. Os fatores de virulência foram investigados por métodos moleculares. A prevalência dos genes de virulência foi a seguinte: *ace* (2%), *efaA* (5%), *gelE* (3%), *agg* (2) e *esp* (62%). Esses resultados mostraram a baixa virulência de *E. faecium* hospitalar multirresistente. O conhecimento acerca do seu papel na patogênese pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de combate a infecções enterocócicas.

**Palavras-chave:** Enterococo resistente à vancomicina, Fatores de virulência, PCR Multiplex, Resistência aos antimicrobianos.

## ABSTRACT

*Enterococcus* are Gram-positive cocci commonly found in the gastrointestinal tract of humans and animals as well as in soil, water and food. The members of the genus *Enterococcus* have a remarkable ability to acquire new mechanisms of resistance to antimicrobials, and are considered one of the most versatile bacteria in the current scenario of bacterial resistance and a major cause of hospital acquired infections. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) were first identified in the late 1980s in a few European countries. In the present study, hundred VRE isolated from different hospital of Vitória-ES were examined for their resistance genotype and the virulence factors encoded by *ace*, *efaA*, *gelE*, *agg* and *esp* genes. The presence of vancomycin resistance genes and species was determined by a polymerase chain reaction using different specific primers (*vanA*, *vanB*, *ddl E. faecalis* and *ddl E. faecium*). The *in vitro* susceptibility to ampicillin, penicillin, streptomycin, gentamicin, tetracycline, erythromycin, nitrofurantoin, norfloxacin, ciprofloxacin, teicoplanin, vancomycin and linezolid was evaluated by disk diffusion method. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) to vancomycin was determined by E-test and agar dilution method. All isolates were identified as VRE are the species *Enterococcus faecium*. All isolates showed MIC to vancomycin >32 µg/ml and proved to harbor the *vanA* gene in the PCR multiplex. The most *in vitro* active compound was linezolid. The occurrence of a high frequency of multiple antimicrobial-resistance was detected among these isolates and this phenotype was independent of the origin from they were recovered. Several virulence factors were described for *enterococcus*, but little is known about the virulence of *Enterococcus faecium*. The virulence factors were investigated by molecular. The prevalence of the virulence genes was as follows: *ace* (2%), *efaA* (5%), *gelE* (3%), *agg* (2%) and *esp* (62%). These results showed the low virulence of nosocomial multiple-resistant *E. faecium*. The knowledge about the role of them on its pathogenesis can contribute to develop new strategies for *enterococcus* infection combat.

**Keywords:** Enterococci vancomycin-resistant, Virulence factors, *Multiplex* PCR, Resistance to antimicrobials.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Cronologia do surgimento de resistência dos *Enterococcus* às diversas classes antimicrobianas.....14
- Figura 2 – Biossíntese do peptidoglicano e mecanismo de ação da vancomicina.....19
- Figura 3 – Esquema do mecanismo de resistência a vancomicina .....20
- Figura 4 – Resistência aos glicopeptídeos do tipo VanA .....21
- Figura 5 – Foto da eletroforese em gel dos produtos amplificados no PCR *Multiplex*.....46
- Figura 6 – Foto da eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados para detecção dos genes de virulência pesquisados .....47
- Gráfico 1 – Perfil de susceptibilidade das amostras aos antimicrobianos testados.....44

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Características de resistência aos agentes antimicrobianos em espécies de *Enterococcus*.....15
- Tabela 2 – Critérios de interpretação de resistência a altos níveis de aminoglicosídeos em *Enterococcus*.....18
- Tabela 3 – Características dos principais fenótipos de resistência aos glicopeptídeos em *Enterococcus*.....22
- Tabela 4 – Padrão de interpretação dos diâmetros das zonas de inibição do crescimento bacteriano para *Enterococcus* .....36
- Tabela 5 – Sequências iniciadoras da técnica de PCR *multiplex* para a identificação de *Enterococcus* resistentes à vancomicina.....41
- Tabela 6 – Sequências iniciadoras da técnica de PCR para a detecção de genes de virulência nas amostras de *Enterococcus*.....41
- Tabela 7 – Distribuição das fontes de isolamento das amostras de *Enterococcus* de acordo com os hospitais de origem.....43
- Tabela 8 – Concentrações Inibitórias Mínimas de vancomicina determinadas pelos métodos de diluição em ágar e Teste E.....45

Tabela 9 – Presença dos genes *van* e concentração inibitória mínima de vancomicina frente as 100 amostras de *Enterococcus* analisadas neste estudo.....46

Tabela 10 – Presença dos genes de virulência nas 100 amostras classificadas como *Enterococcus* utilizadas neste estudo.....48

Tabela 11 – Distribuição dos genes de virulência entre as amostras de *Enterococcus*.....48

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>LISTA DE TABELAS</b>	
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	12
1 Características gerais	12
1.2 Resistências aos antimicrobianos	13
1.2.1 Mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos	16
1.2.2 Mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos	17
1.2.3 Mecanismos de resistência à vancomicina	18
1.2.4 Mecanismos de resistência à linezolida	23
1.3 Epidemiologia e controle das Infecções por VRE	24
1.4 Determinantes de virulência	29
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	32
<b>3. OBJETIVOS</b>	33
3.1 Gerais	33
3.2 Específicos	33
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	34
4.1 Amostras bacterianas	34
4.2 Aspectos éticos	34
4.3 Testes de suscetibilidade	34
4.3.1 Método de difusão a partir do disco	34
4.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima por Teste E	36
4.3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima por diluição em ágar	37
4.4 Identificação Molecular	37
4.4.1 Liberação do DNA	38
4.4.2 PCR <i>multiplex</i> para identificação da espécie e gene <i>van</i> de resistência	38
4.4.3 Reação de PCR para determinação dos genes de virulência	39
4.4.3.1 Detecção dos genes <i>ace</i> e <i>efaA</i>	39
4.4.3.2 Detecção dos genes <i>agg</i> e <i>gelE</i>	39
4.4.3.3 Detecção do gene <i>esp</i>	40
<b>5. RESULTADOS</b>	42

5.1 Amostras bacterianas.....	42
5.2 Identificação molecular.....	42
5.3 Perfil de suscetibilidade.....	44
5.3.1 Teste de difusão a partir do disco.....	44
5.3.2 Determinação da CIM.....	45
5.4 Detecção dos genes de resistência.....	45
5.5 Detecção dos genes de virulência.....	47
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

Os *Enterococcus* são células esféricas ou ovóides, com dimensões variando de 0,6 a 2,5  $\mu\text{m}$ , ocorrendo geralmente em pares ou cadeias curtas em meio líquido. São organismos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, catalase negativos e podem ser móveis, apresentando poucos flagelos e ausência de cápsula. São capazes de fermentar diversos carboidratos com produção de L(+)-ácido láctico. Essa fermentação ocorre sem produção de gás, com pH final variando entre 4,2 e 4,6. Crescem geralmente entre 10°C e 45°C sendo que a temperatura ótima de crescimento é 35°C. Também se observa crescimento em BHI com acréscimo de 6,5% de NaCl e em até pH 9,6, condições que são inibitórias para vários micro-organismos. São capazes de hidrolisar a esculina na presença de sais biliares a 40% (FACKLAM; COLLINS, 1989; MURRAY, 1990).

A maioria das amostras (mais de 90%) produz um antígeno associado a parede celular constituído por ácido lipoteicóico, denominado antígeno do grupo D de Lancefield. Alguns membros deste gênero produzem um pigmento amarelo em meio ágar sangue. Geralmente, as amostras de enterococos são não-hemolíticas ou alfa-hemolíticas nas culturas em meio de ágar sangue. Raramente reduzem nitrato, porém a maioria das espécies hidrolisam pirrolidonilarilamidase (PYR). Todas as espécies produzem leucina aminopeptidases (LAP) (CHOW et al., 1993; MURRAY, 1990; TYRRELL et al., 2002).

O nome *Enterococcus* é proveniente da palavra francesa *entérocoque* a qual foi utilizada pela primeira vez por Thierclin em 1899 com a finalidade de enfatizar a origem entérica desse coco Gram-positivo. No entanto, somente em 1970 o termo *Enterococcus* foi utilizado para designar um gênero de bactéria que antes pertenciam ao gênero *Streptococcus faecalis* (*faecalis* para relacionar com fezes). Andrewes e Horder, em 1906, isolaram estes micro-organismos de um paciente com endocardite e consideraram este *Streptococcus* tão característico da flora intestinal humana que o termo *faecalis* claramente se justificava. Em 1919, Orlan-Jensen descreveu um segundo organismo desse grupo, *Streptococcus faecium*, o qual difere dos padrões de fermentação do *Streptococcus faecalis* (MURRAY, 1990). Em

1984, Schleifer e Kilpper-Balz, usando hibridização DNA-DNA e DNA-rDNA, mostraram que o *S. faecalis* e o *S. faecium* eram pouco relacionados aos *Streptococcus*, incluindo *S. bovis*, de forma que deveriam ser transferidos para outro gênero: o gênero *Enterococcus* (MURRAY, 1990).

Collins, Jones e Farrow, utilizando metodologia semelhante, constataram que as espécies *S. avium*, *S. casseliflavus*, *S. durans*, e *S. gallinarum* também deveriam ser transferidas para o gênero *Enterococcus* (MURRAY, 1990).

Hoje existem 48 espécies conhecidas do gênero *Enterococcus*, entre elas podemos citar: *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. columbae*, *E. díspar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. mundtii* e *E. raffinosus* (LPSN, 2013).

## 1.2 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Um aspecto clinicamente importante associado às espécies do gênero *Enterococcus* é o amplo espectro de resistência aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento das infecções (Tabela 1) (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000; D'AZEVEDO; DIAS; TEIXEIRA, 2006; TITZE-DE-ALMEIDA et al., 2004). O surgimento de cepas de bactérias resistentes aos antimicrobianos é uma crescente ameaça, especialmente em ambientes hospitalares, constituindo situação alarmante para a saúde pública (Figura 1) (WEBB et al., 2005).

De um modo geral são dois os fatores que estão relacionados ao desenvolvimento e persistência de resistência: o primeiro está ligado ao acúmulo de resistências adquiridas, por uma determinada bactéria (quando classes inteiras de antimicrobianos tornam-se inativos contra ela) o segundo seria a ausência de novos antimicrobianos com atividade sobre cepas multirresistentes nos últimos anos (LEME; FERREIRA, 2001).

Os *Enterococcus* demonstram uma variedade de mecanismos para se tornarem resistentes a muitas classes de fármacos antimicrobianas testadas. A variabilidade genética e a multiplicação acelerada somados a presença de antimicrobianos favorecem a seleção de cepas resistentes a drogas. Uma mutação que confere resistência à determinada substância permitirá à bactéria sobreviver à

ação de antimicrobianos usados nos procedimentos terapêuticos (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000).

A resistência aos antimicrobianos do gênero *Enterococcus*, assim como em outras bactérias, pode ser classificada em intrínseca e adquirida. A resistência intrínseca é considerada como própria da espécie, e seus genes determinantes geralmente se encontram no cromossomo. A resistência adquirida pode ser consequência de uma mutação no DNA original ou pela aquisição de material genético externo à célula bacteriana (ASLANGUL et al., 2005; ZARRILLI et al., 2005).

Muitos *Enterococcus* são tolerantes aos efeitos inibitórios dos antimicrobianos ativos contra a parede celular, incluindo a penicilina e vancomicina, sugerindo que esta propriedade pode não ser inerente, mas adquirida após exposições sistemáticas a antimicrobianos (SHEPARD; GILMORE, 2002; ZARRILLI et al., 2005).

Figura 1 - Cronologia do surgimento de resistência dos *Enterococcus* às diversas classes antimicrobianas (CATTOIR; LECLERCQ, 2012).

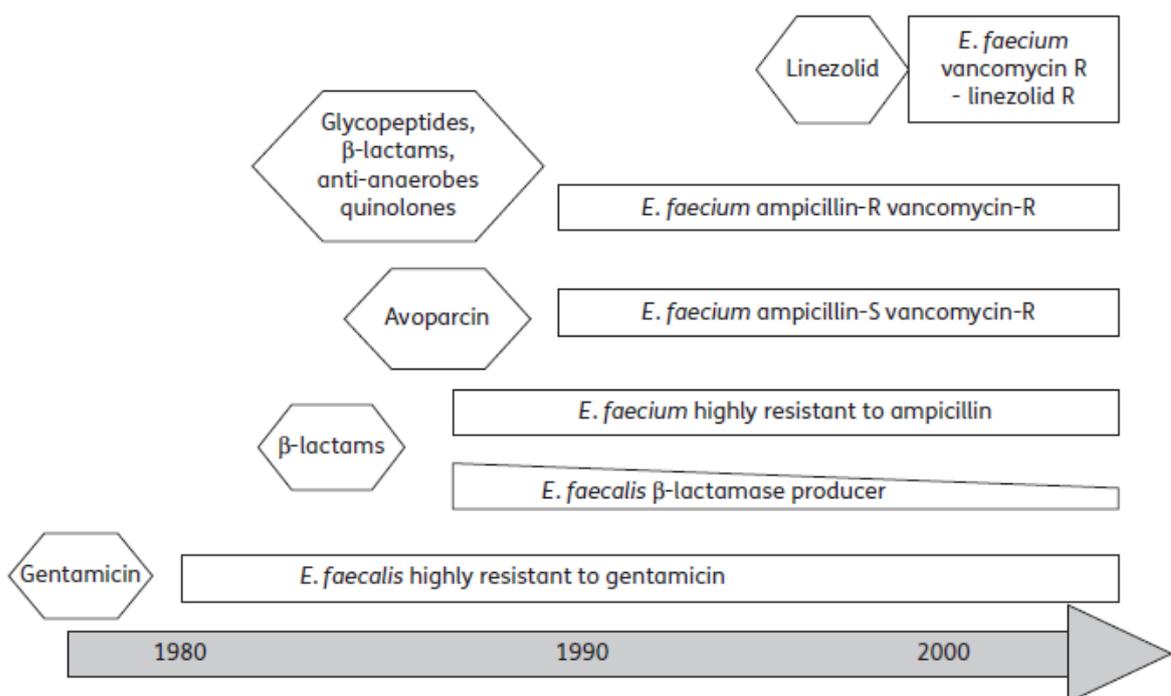


Tabela 1 - Características de resistência aos agentes antimicrobianos em espécies de *Enterococcus*

	ANTIMICROBIANO	ESPÉCIES	MECANISMO DE RESISTÊNCIA
Resistência intrínseca	β-Lactâmicos	Todas	Baixa afinidade às proteínas ligadoras de penicilina (PBP)
	Penicilinas (baixo nível)	Todas	
	Carbapenens (nível moderado)	Todas	
	Cefalosporinas (alto nível)	Todas	
	Aminoglicosídeos (baixo nível)	Todas	Captação ineficiente
Resistência adquirida	Aminoglicosídeos (nível moderado)	<i>E. faecium</i>	Produção da enzima cromossomal AAC(6')II
	Lincosamidas e Estreptograminas A	<i>E. faecalis</i> , <i>E. avium</i> , <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>	Supostamente efluxo
	Glicopeptídeos (baixo nível)	<i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>	Produção de precursores do peptidoglicano terminados em D-Ala-D-Ser
	Ampicilina (alto nível)	<i>E. faecium</i> , <i>E. hirae</i>	Superprodução ou alterações da PBP5
		<i>E. faecalis</i>	B-lactamase (rara)
	Aminoglicosídeos (alto nível)	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>	Aminoglicosídeos modificando enzimas p. ex. AAC(6')-APH(2'')
	Macrolídeos	Maioria dos enterococos	Metilação ribossomal
	Cloranfenicol	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	CAT codificando enzimas
	Tetraciclina	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	Modificação de proteína ribossomal
	Quinolonas	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	Alterações na DNA girase e Topoisomerase IV
	Glicopeptídeos (alto nível)	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	Modificação do precursor
	Oxazolidinonas	<i>E. faecium</i>	Mutação no gene 23S rRNA

Adaptado de TOP; WILLEMS; BONTEN (2008)

### 1.2.1 Mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos

Além dos mecanismos intrínsecos de resistência à baixos níveis de  $\beta$ -lactâmicos entre *Enterococcus*, mudanças nos padrões de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos revelaram mecanismos adicionais de resistência. A frequência de *Enterococcus* resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos tem aumentado, e frequentemente demonstram resistência à níveis elevados destes antimicrobianos. A concentração terapêutica de  $\beta$ -lactamâmicos com efeito bacteriostático contra isolados de *E. faecium* é 4 a 16 vezes maior que em isolados de *E. faecalis* (SHEPARD; GILMORE, 2002).

A resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos pode ocorrer de duas maneiras: a primeira é devido a alterações das proteínas ligadoras de penicilinas (PBP4 e 5) com substituições de aminoácidos específicos que contribuem com a diminuição de afinidade da ligação dos  $\beta$ -lactâmicos ao sítio de ação nas PBP's. A segunda ocorre através da produção de enzimas  $\beta$ -lactamases. A resistência à ampicilina e penicilina tem sido atribuída à produção de enzimas  $\beta$ -lactamases, descrita quase que exclusivamente para o *E. faecalis* e atribuída, na maioria dos casos, à aquisição de operon responsável pela produção de  $\beta$ -lactamase do *S. aureus* (ASLANGUL et al., 2005; SHEPARD; GILMORE, 2002). Essa resistência pode não ser detectada por testes de susceptibilidade de rotina (difusão a partir do disco). Pequenas variações na concentração do inóculo podem levar a grandes variações na concentração inibitória mínima dos antimicrobianos utilizados contra estes micro-organismos. Este mecanismo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos é considerado raro, sendo encontrado em apenas 1% a 2% das cepas resistentes à ampicilina (ASLANGUL et al., 2005).

Através do teste rápido da cefalosporina cromogênica, pode-se realizar uma pesquisa direta da presença da enzima  $\beta$ -lactamase. A produção de  $\beta$ -lactamase indica resistência à penicilina, ampicilina e à ureidopenicilinas (piperacilina e mezlocilina). O teste para detecção desta enzima é recomendado somente em alguns casos como para pesquisa em isolados bacterianos obtidos a partir do sangue e líquido (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

Devido ao surgimento de resistência aos principais antimicrobianos utilizados no combate de infecções ocasionadas por *Enterococcus*, tornou-se

crecente o uso de glicopeptídeos como vancomicina e teicoplanina, principalmente em caso de infecções mais graves (COURVALIN, 2006).

### 1.2.2 Mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos

Os *Enterococcus* apresentam resistência intrínseca a baixos níveis de aminoglicosídeos. Assim estes fármacos só apresentam efeito sinérgico quando associados aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos ou glicopeptídeos, (ZARRILLI et al., 2005). Isso ocorre pela ação do antimicrobiano  $\beta$ -lactâmicos ou glicopeptídeos, que irá agir na síntese da parede celular resultando na desorganização da mesma, facilitando a penetração do aminoglicosídeo no citoplasma para que o mesmo possa ter acesso aos seus sítios ribossômicos (SHEPARD; GILMORE, 2002).

Existem espécies de *Enterococcus* que apresentam alto grau de resistência aos aminoglicosídeos e isto decorre, geralmente, da produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, tais como 6'-acetiltransferase (AAC-6') e 2-fosfotransferase (APH-2"). Com exceção da AAC-6' do *E. faecium* que é cromossomicamente modificada, os genes correspondentes às demais enzimas são localizados em plasmídeos. Esta resistência a altos níveis de aminoglicosídeos leva a perda de sinergismo com antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos e glicopeptídeos, não ocasionando desta maneira efeito bactericida contra *Enterococcus* (LECLERCQ et al., 1992; SHEPARD; GILMORE, 2002).

A detecção de resistência a altos níveis de aminoglicosídeos deve ser realizada através de discos com concentrações especiais ou por determinação da CIM por métodos de diluição. Na rotina dos testes de suscetibilidade, gentamicina e estreptomicina são os únicos aminoglicosídeos que devem ser testados, uma vez que funcionam como marcadores para os demais aminoglicosídeos (KOLAR et al., 2006).

O Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2013) define como resistência a altos níveis CIMs superiores a 500  $\mu\text{g/mL}$  para gentamicina e CIMs superiores a 2.000  $\mu\text{g/mL}$  para estreptomicina. Todo *Enterococcus* resistente à gentamicina é considerado resistente a todos os outros aminoglicosídeos, com

exceção da estreptomicina, cuja resistência é determinada por um tipo particular de mecanismo (Tabela 2).

Tabela 2 – Critérios de interpretação de resistência a altos níveis de aminoglicosídeos em *Enterococcus*.

<b>Gentamicina HL<sup>a</sup> (500µg/mL)</b>	<b>Estreptomicina HL (2.000µg/mL)</b>	<b>Interpretação</b>
Sensível	Sensível	HLAR <sup>b</sup> negativo para estreptomicina, gentamicina, tobramicina e netilmicina.
Sensível	Resistente	HLAR para estreptomicina. HLAR negativo para gentamicina, tobramicina e netilmicina.
Resistente	Resistente	HLAR para todos os aminoglicosídeos.
Resistente	Sensível	HLAR para todos os aminoglicosídeos, exceto para estreptomicina.

<sup>a</sup>HL – High-level

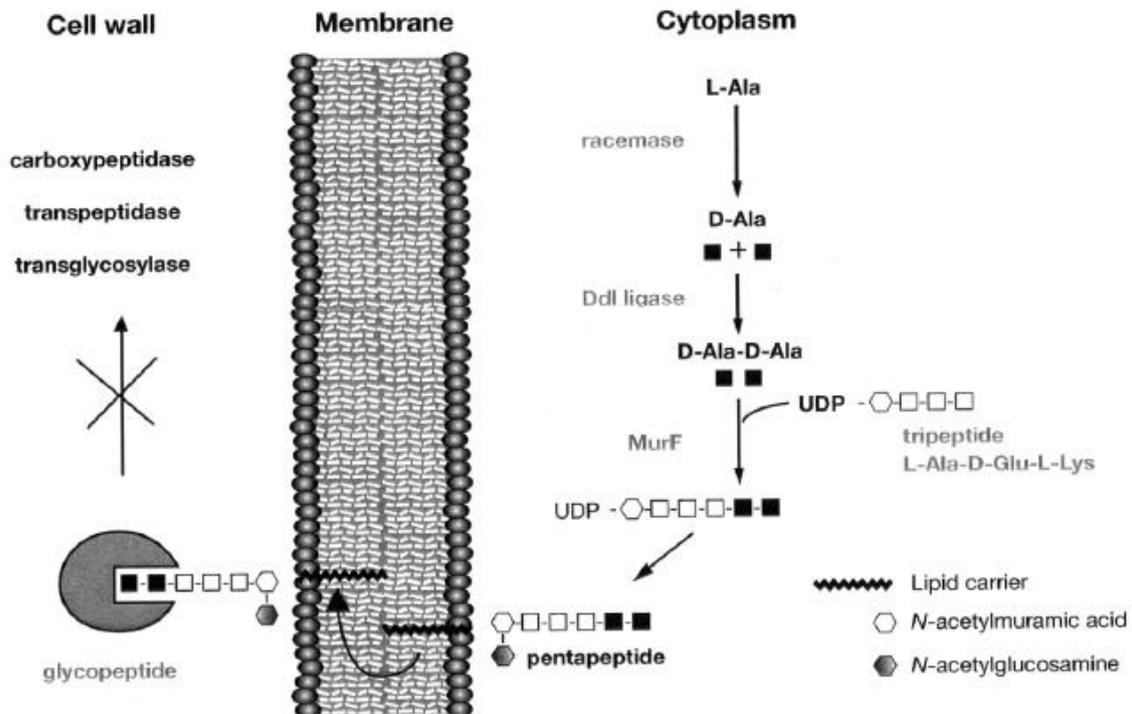
<sup>b</sup>HLAR – High-level aminoglicosydes resistance (resistência a altos níveis de aminoglicosídeos).

Adaptado de Kolar e colaboradores, (2006).

### 1.2.3 Mecanismo de resistência à vancomicina

Os glicopeptídeos agem inibindo a síntese da parede celular através da sua ligação nas terminações D-Ala-D-Ala do precursor do peptideoglicano, impedindo a ação de enzimas envolvidas nas reações de transglicosilações e transpeptidação na síntese da parede celular bacteriana (Figura 2) (WOODFORD et al., 1995).

Figura 2 - Biossíntese do peptidoglicano e mecanismo de ação da vancomicina.

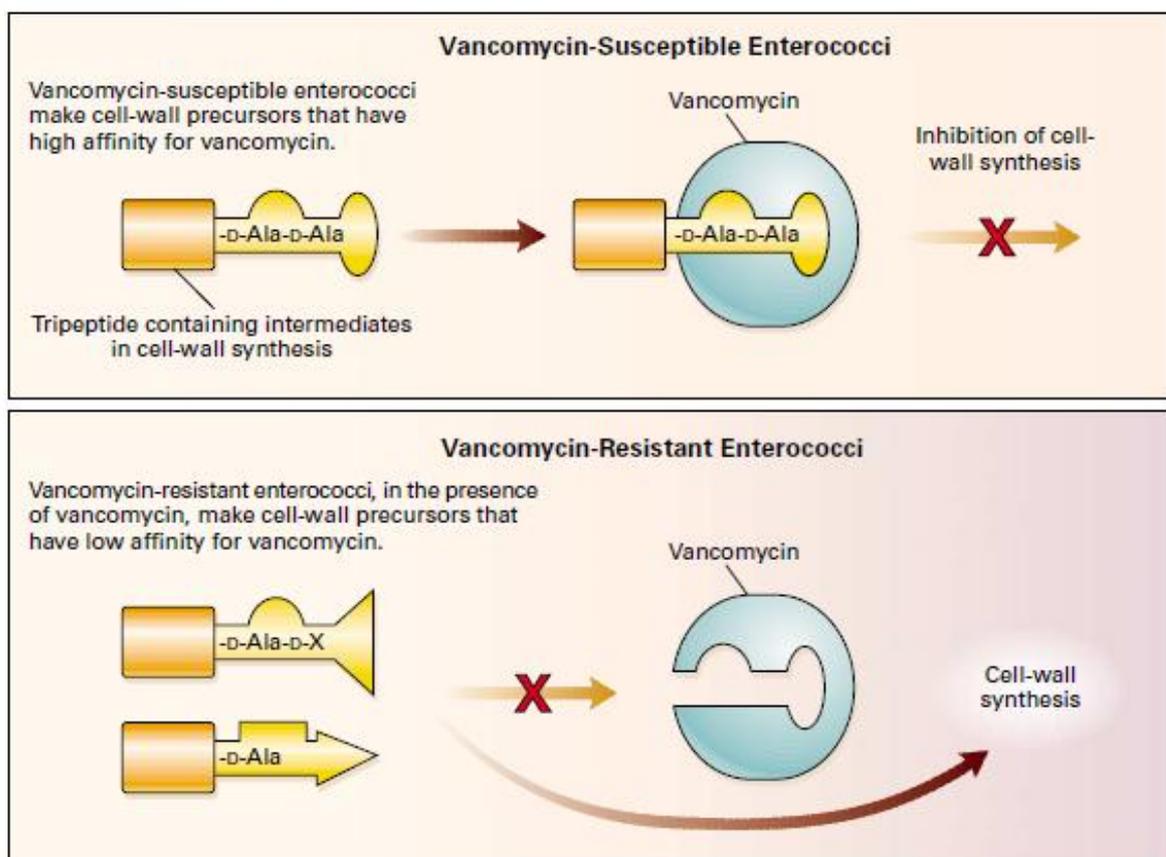


Ligação do antimicrobiano ao dipeptídeo D-Ala-D-Ala C-terminal de precursores do peptidoglicano impede reações catalisadas por transglicosilases, transpeptidases e D,D-carboxipeptidases. Ddl: D-Ala-D-Ala ligase; MurF: proteína sintetase; UDP: uracil difosfato. Adaptado de Courvalin, (2006)

O mecanismo de resistência foi melhor caracterizado para o tipo VanA. Um operon *vanA*, determinado por um cluster contendo sete genes, três dos quais *vanH*, *vanA* e *vanX* são determinantes críticos de resistência e outros dois genes regulatórios, *vanR* e *vanS*, formando a maior região conservada *vanRSHAX* do transposon Tn1546. Na presença de um indutor, como a vancomicina, a transcrição dos genes necessários para a resistência à vancomicina é ativada, a expressão destes genes tem como resultado final a síntese de terminações D-Ala-D-Lac, os quais são diferentes dos habituais (D-Ala-D-Ala) e isto impede a união do glicopeptídeo a seu sítio de união no precursor do peptideoglicano (Figura 3) (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000; COURVALINT; ARTHURA, 1993; SHEPARD; GILMORE, 2002; WOODFORD et al., 1995).

A resistência ao glicopeptídeo vancomicina tem sido considerada um dos exemplos mais críticos de resistência. Até o momento, nove mecanismos de resistência a glicopeptídeos (VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, Van L, Van M e Van N) foram descritos. Somente dois (VanA e VanB) tem impacto clínico pela grande disseminação entre as cepas circulantes e pela localização dos genes responsáveis pelos fenótipos VanA e VanB que estão em transposons e plasmídios, facilitando fortemente a disseminação horizontal entre espécies de *Enterococcus* e gêneros diferentes e por, normalmente, conferirem altos níveis de resistência (CATTOIR; LECLERCQ, 2012; CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000; COURVALINT; ARTHURA, 1993).

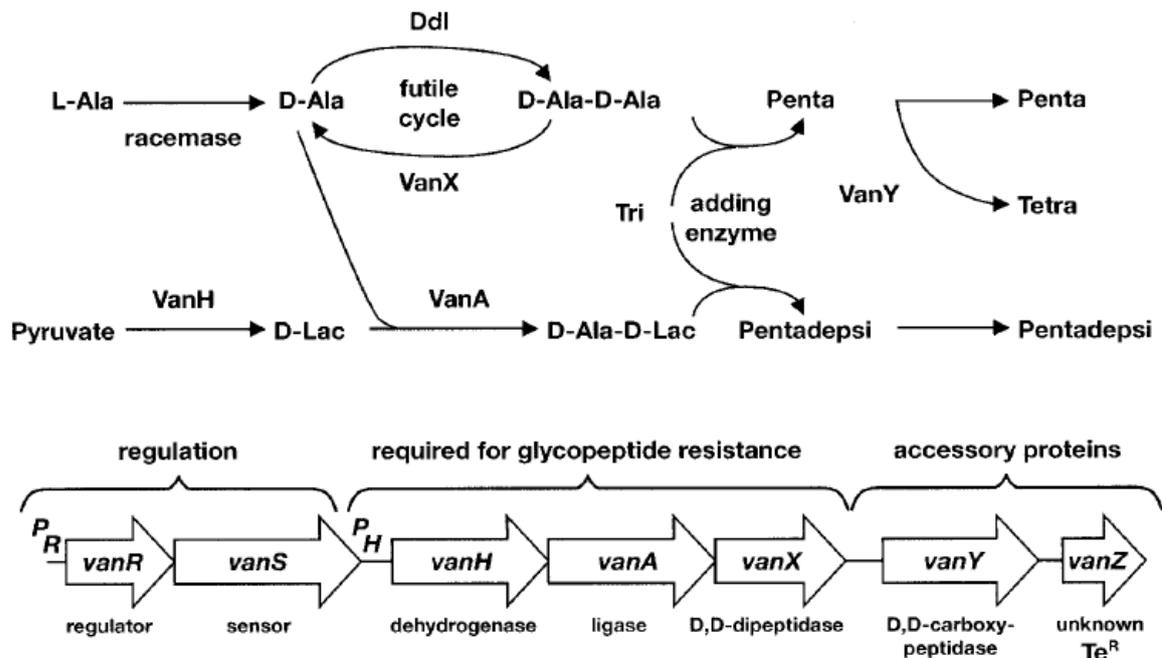
Figura 3 - Esquema do mecanismo de resistência à vancomicina (MURRAY, 2000).



Os genes transcritos são traduzidos em enzimas, algumas das quais produzem precursores da parede celular terminados em D-alanina-D-lactato (D-Ala-

D-Lac), com os quais a vancomicina tem muito baixa afinidade (Figura 4) (ARTHUR et al., 1998; EVERS; COURVALIN, 1996).

Figura 4 - Resistência aos glicopeptídeos do tipo VanA.



Síntese de precursores do peptidoglicano em uma cepa resistente do tipo VanA. Ddl: D-Ala-D-Ala ligase; Penta: L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-Lis-D-Ala-D-Ala; Pentadepsi: L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-Lis-D-Ala-D-Lac; Tetra: L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-Lis-D-Ala; Tri: L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-Lis. Abaixo, organização do operon *vanA*. As setas representam seqüências codificantes e indicam a direção da transcrição. Os genes de regulação e resistência são co-transcritos pelos promotores  $P_R$  e  $P_H$ , respectivamente. Adaptado de Courvalin, (2006).

A organização e funcionalidade do operon tipo VanB são similares às do tipo VanA, mas há diferença na regulação, uma vez que a vancomicina, mas não a teicoplanina é um indutor em VanB (EVERS; COURVALIN, 1996). O fenótipo VanC é expresso de forma constitutiva ou induzível como resultado da produção de precursores dos peptidoglicanos terminados em D-alanina-D-serina (D-Ala-D-Ser) (REYNOLDS; COURVALIN, 2005). Os genes que codificam para o tipo C são intrínsecos, componentes espécie-específicos de *E.gallinarum* (VanC-1), *E. casseliflavus* (VanC-2) e *E. flavescens* (VanC-3) (NAVARRO; COURVALIN, 1994). Os operons *vanD* e *vanM* são similares aos operons *vanA* e *vanB* e sua resistência

deve-se à produção constitutiva de precursores terminados em D-Ala-D-Lac (XU et al., 2010; DEPARDIEU; REYNOLDS; COURVALIN, 2003). Em VanE, VanG e VanL a organização é semelhante à do operon *vanC*, com síntese de precursores terminados em D-Ala-D-Ser (DEPARDIEU; REYNOLDS; COURVALIN, 2003; PATIN; COURVALIN; PERICHON, 2002). São raros e, até agora, foram detectados apenas no cromossomo de *E. faecalis*, enquanto VanN foi encontrado em apenas um isolado de *E. faecium* (CATTOIR; LECLERCQ, 2012) (Tabela3).

Tabela 3 - Características dos principais fenótipos de resistência aos glicopeptídeos em *Enterococcus* (CATTOIR; LECLERCQ, 2012).

	Resistência adquirida								Resistência Intrínseca
	Alto nível		Variável	Moderado	Baixo nível			Baixo nível	
	VanA	VanM	VanB	VanD	VanE	VanG	VanL	VanN	VanC1/C2/C3
Susptibilidade									
Vancomicina	R	R	r-R	R	r	r	r	r	r
Teicoplanina	R	R	S	r-R	S	S	S	S	S
Transmissível	+	+	+	-	-	+	-	+	-
Principais espécies	A/B <sup>a</sup>	A	A/B	A/B	B	B	B	A	G/D
Expressão	I	?	I	C	I/C	I	I	C	C/I
Localização genética	Plas (Cro)	Plas (Cro)	Cro (Plas)	Cro (Plas)	Cro	Cro	?	Cro	Cro
Precursores final	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser

R, alto nível de resistência (MIC >16 mg/L); r, baixo nível de resistência (MIC = 8–16 mg/L); S, susceptível; A, *E. faecium*; B, *E. faecalis*; G, *E. gallinarum*; D, *E. casseliflavus*; I, induzível; C, constitutivo; Cro, cromossomal; Plas, plasmidial.

<sup>a</sup> Outras espécies de *Enterococcus* também.

De todos representantes do gênero, o *E. faecium* é o que apresenta maior dificuldade de controle devido a predominância de resistência à vancomicina e também à ampicilina (PATTERSON et al., 1990; SHEPARD; GILMORE, 2002; ZARRILLI et al., 2005).

*Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) apresentam afinidade diminuída à penicilina e isso se torna mais evidente para as penicilinas semi-

sintéticas resistentes a penicilinase, tais como nafcilina e metilicina. A grande maioria das amostras de *E. faecium* resistentes a vancomicina (EFRV) é também resistente aos  $\beta$ -lactâmicos. Por outro lado, amostras de *E. faecalis* tendem a ser sensíveis aos  $\beta$ -lactâmicos, independentemente do padrão de sensibilidade a glicopeptídeos (PATTERSON et al., 1990; SHEPARD; GILMORE, 2002).

Os *Enterococcus* apresentam vários sistemas de conjugação que podem disseminar os genes que conferem resistência antimicrobiana para outras bactérias. Nos sistemas de conjugação incluem-se plasmídeos, que podem se replicar em várias outras bactérias Gram-positivas, como por exemplo, *Staphylococcus* e *Streptococcus* (também incluem os plasmídeos responsivos a feromônios que podem ser transferidos entre cepas de *E. faecalis* numa frequência que pode chegar a 100%). Por fim um tipo especial de transposon de conjugação que pode ser transferido de forma intercelular entre vários gêneros bacterianos e se integrar no genoma do novo hospedeiro bacteriano (MURRAY, 2000; ZARRILLI et al., 2005). A identificação da transferência de genes de resistência à vancomicina tanto por conjugação quanto através de transposição reforça a preocupação de disseminação dessa resistência a bactérias mais patogênicas, como *Staphylococcus* e *Streptococcus*, o que agrava as consequências clínicas (MURRAY, 2000). Dois casos ocorreram na Pensilvânia e Michigan, no ano de 2002 (CHANG et al., 2003), um em Nova Iorque, no início de 2004 (MMWR, 2004) e o quarto em Michigan no início de 2005 (Michigan Department of Community Health, 2005). Esses isolados carregavam ambos os genes, *mecA*, que codifica para resistência a metilicina e *vanA* (SEVERIN et al., 2004).

#### **1.2.4 Mecanismo de resistência à linezolida**

A linezolida foi a primeira oxazolidinona introduzida para uso clínico (em 2000), e, desde então, tem sido amplamente prescrita para tratar infecções causadas por microrganismos Gram-positivos, além de possuir indicação do Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de infecções causadas por VREF (incluindo bacteremia) (CATTOIR; LECLERCQ, 2012). Ela altera a síntese proteica através da ligação à subunidade ribossomal 50S. Dados recentes sugerem que a oxazolidinona se liga ao sítio A do Peptidil-transferase Center (PTC) do ribossoma

bacteriano, interferindo no posicionamento do aminoacil-tRNA, tendo como resultado a inibição da síntese protéica (WILSON et al., 2008)

Ainda que a prevalência de resistência à linezolida entre os micro-organismos Gram-positivos ainda seja baixa, os mecanismos de resistência a linezolida já foram caracterizados. Eles geralmente ocorrem através de mutações ribossômicas, embora já exista a preocupante descrição de resistência mediada pelos plasmídeos (mediada por Cfr metiltransferase) em *E. faecalis* de origem animal e humana, o que sugere a propagação dessa resistência em VRE (CATTOIR; LECLERCQ, 2012).

### 1.3 EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DAS INFECÇÕES POR VRE

Os *Enterococcus* se encontram amplamente disseminados na microbiota do trato gastrointestinal, cavidade oral e do trato genitourinário de humanos e animais (STOBBERINGH et al., 1999). A presença do *Enterococcus* no solo e na água de superfície pode ser atribuída à contaminação dessas áreas por fezes de animais ou por materiais de esgotos não tratados. Desse modo, por quase um século os *Enterococcus* foram utilizados como indicadores de contaminação fecal em água e alimentos para consumo humano (AARESTRUP et al., 2002).

Geralmente, os *Enterococcus* são considerados patógenos oportunistas que emergiram como causa de infecção hospitalar e geralmente causam infecções em pacientes que têm a doença subjacente grave, imunodeprimidos ou internados por longo períodos (GARCIA-MIGURA; LIEBANA; JENSEN, 2007; VILELA et al., 2006).

As infecções mais associadas com os *Enterococcus* são as infecções do trato urinário, intra-abdominais, pélvicas, bacteremia, endocardite, cutâneas, neonatais, do sistema nervoso central e do trato respiratório (GOULD et al., 2004). A maioria destas infecções tem origem hospitalar e está associada, principalmente a instrumentalização/cateterização prévia, anormalidades do trato urinário, uso extensivo de antimicrobianos e debilidade do paciente. Além de infecções de trato urinário inferior e pielonefrites, também já foram descritos casos de prostatite e abscessos periféricos. As infecções intra-abdominais e pélvicas ou infecções de

feridas pós-cirúrgica são consideradas o segundo tipo mais frequente de infecção relacionada aos *Enterococcus*. Nesses sítios, os *Enterococcus* são geralmente parte de uma microbiota mista comumente encontrada no trato gastrointestinal, e continua difícil a diferenciação de colonização e infecção verdadeira (LOW et al., 2001). Bacteremia é o terceiro tipo de infecção mais comumente atribuída aos *Enterococcus* (HÖRNER et al., 2005; DESHPANDE et al., 2007). Os *Enterococcus* ocupam a quarta posição na América do Norte (10,2%) e a quinta na Europa (7,2%), como patógeno responsável por infecções da corrente sanguínea, com uma incidência muito menor na América Latina (3,3%) (DESHPANDE et al., 2007).

Os *Enterococcus* são responsáveis por 5 a 15% dos casos de endocardite infecciosa, sendo o *E. faecalis* a espécie mais frequentemente relacionada. Essa doença é mais comum entre idosos do sexo masculino e segue, em geral, um curso subagudo. Acomete mais frequentemente pacientes com valvulopatias ou com válvulas prostéticas, embora também possa determinar infecção em válvulas previamente normais (SHEPARD; GILMORE, 2002).

Os  $\beta$ -lactâmicos em associação com aminoglicosídeos são, geralmente, os antimicrobianos de escolha para tratar as infecções graves causadas por enterococos (YAZGI et al., 2002).

A resistência à vancomicina em *Enterococcus* foi detectada pela primeira vez na Inglaterra no ano de 1986, em pacientes com insuficiência renal crônica, aproximadamente 30 anos após a introdução deste antimicrobiano (UTTLEY et al., 1988). Nos Estados Unidos os primeiros isolamentos foram descritos em 1999, onde rapidamente disseminou-se (MOELLERING et al., 1999). Logo seguiram relatos da Ásia, Austrália e África. Na América Latina cepas de *Enterococcus* resistentes à vancomicina foram detectadas pela primeira vez em 1998 no Brasil e na Argentina (DALLA COSTA et al., 1998; MARÍN et al., 1998).

A aquisição de resistência à vancomicina por cepas de *E. faecium* multirresistentes resultou na emergência desta espécie de VRE como agente de infecções hospitalares (CHIVERS et al., 2003). Assim em hospitais americanos, europeus e de várias outras partes do mundo *E. faecium* é a espécie resistente à vancomicina mais comum (LOW et al., 2001; NNIS, 2004; SIEGEL et al., 2007).

Nos Estados Unidos, a emergência de *Enterococcus* resistentes aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos, além do desenvolvimento da administração oral da vancomicina precipitou em um elevado aumento do uso da vancomicina. Este aumento foi acompanhado por um contínuo crescimento na frequência de identificação de VRE entre os isolados clínicos (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000). Em contraste com os países europeus, ainda não foi encontrado VRE em indivíduos de comunidade e em animais das empresas produtoras de alimentos nos EUA, embora tenham sido realizados poucos levantamentos epidemiológicos (CATTOIR; LECLERCQ, 2012).

Segundo Garcia-Migura, Liebana e Jensen (2007), a ocorrência de VRE tem sido relatada em fontes animais como aves e porcos em alguns países europeus. A ocorrência nestes animais teria relação com o fato da avoparcina, um glicopeptídeo semelhante à vancomicina e teicoplanina, ser acrescentado na ração animal como um promotor do crescimento. Estes achados sugerem que animais conlonizados podem servir como um reservatório, pelo qual, indivíduos não hospitalizados podem adquirir o microrganismo.

VREs são reconhecidos como importantes patógenos hospitalares que frequentemente aumentam a mortalidade e a duração das hospitalizações por sua maior patogenicidade devido à aquisição de genes de virulência. Infecções por VRE ocorrem mais comumente entre os pacientes em condições de risco, tais como doenças hematológicas, oncológicas, transplantados, imunocomprometidos, aqueles em unidades de tratamento intensivo (UTI), hemodiálise ou asilos (DESHPANDE et al., 2007; PATEL, 2003).

O aumento da prevalência destas bactérias no cenário mundial é um importante problema devido às limitações das terapias antimicrobianas para estas infecções e a transferência de genes de resistência a outras bactérias como MRSA (BHAVNANI et al., 2000; YOON et al., 2009). O tratamento de infecções causadas por VRE é extremamente problemático devido ao fato destes micro-organismos apresentarem resistência a múltiplas classes de agentes antimicrobianos, além do fato de apresentarem alta taxa de mortalidade e elevado custo para os serviços de saúde em relação àquelas causadas por cepas sensíveis à vancomicina (YAZGI et al., 2002; SALGADO, 2008). Detectar prontamente VRE e impedir a sua transmissão

entre as pessoas parecem ser os meios mais eficazes de minimizar a propagação intra e inter-hospitalar destes micro-organismos (BODNAR et al., 1996).

A detecção de uma amostra de VRE independente de se tratar de um caso de infecção ou colonização implica em uma série de medidas que devem ser tomadas, como por exemplo, a identificação da espécie, pois dependendo desse resultado pode-se presumir se a linhagem é intrinsecamente resistente à vancomicina como aquela com fenótipo VanC não havendo, neste caso, a possibilidade de disseminação da mesma. No caso de amostras com genótipos transferíveis como o VanA ou VanB, já detectados em *E. faecalis* e *E. faecium*, algumas medidas como o isolamento de contato do paciente devem ser tomadas imediatamente pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) para evitar a disseminação do VRE no ambiente hospitalar (CAIAFFA FILHO et al., 2003; PALAZZO et al., 2006).

A colonização intestinal é um importante fator para a disseminação dos VREs, já que os pacientes colonizados não apresentam quaisquer sintomas, mas podem carrear os micro-organismos por longos períodos de tempo, podendo infectar outros pacientes por meio da transmissão horizontal ou, ocasionalmente, desenvolver quadros infecciosos (MARTINEZ et al., 2003). Os pacientes colonizados ou infectados por VRE frequentemente disseminam este micro-organismo para a pele e para o ambiente. O contato direto com estes pacientes geralmente é considerado a principal fonte de transmissão deste patógeno, mas ela também ocorre através das transferências dos pacientes intra e inter hospitalar, das mãos dos trabalhadores de saúde e das superfícies ambientais contaminadas (ECKSTEIN et al., 2007).

Na Europa a maioria dos países apresenta baixos níveis de colonização como 1,5 a 14,9%, na Holanda 12% (VAN DEN BOGAARD; JENSEN; STOBBERINGH, 1997; VAN DEN BRAAK et al., 2000) e na França 2 a 5%. A frequência de colonização na Coreia do Sul é de 20%, a maioria envolvendo pacientes em unidades de terapia intensiva (TRESOLDI et al., 2006). Na América latina os índices veem aumentando, tendo variado de 12 a 28% na Argentina (TOGNERI et al., 2005; LITTIVIK et al., 2006) e no Brasil, após a descrição do primeiro caso em 1996, na cidade de Curitiba (DALLA COSTA et al., 1998), o VRE tem sido isolado por vários pesquisadores com incidência de colonização variando de 0 a 30% (ZANELLA et al., 1999; REIS et al., 2001; CEREDA et al., 2002;

CAIAFFA FILHO et al., 2003; FURTADO et al., 2005; MORETTI et al., 2004; CAMARGO et al., 2005; TRESOLDI et al., 2006; VILELA et al., 2006).

O Programa SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program* apontou o VRE como o quarto colocado (10,2%) entre os agentes etiológicos das infecções sanguíneas nos Estados Unidos, o quinto (7,2%) na Europa enquanto na América Latina este percentual é bem mais baixo (3,3%) (BIEDENBACH; MOET; JONES, 2004). Cerca de 25% das infecções em pacientes na unidade de terapia intensiva (UTI) são causadas por VRE. A emergência deste patógeno pode estar relacionada ao aumento do uso de vancomicina nos últimos anos, decorrente da terapêutica de colites associadas a antimicrobianos e de infecções por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (DESHPANDE et al., 2007).

Em 1995, como resposta ao aumento das taxas de colonização e infecção por VRE ocorridos nos Estados Unidos, o *Hospital Infection Control Practices Advisory Committee* (HICPAC) do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) publicou recomendações para prevenir a disseminação da resistência à vancomicina que incluem controle do uso de vancomicina, detecção precoce de VRE em amostras clínicas e em culturas de *swab* retal para vigilância, isolamento do paciente infectado ou colonizado, educação da equipe, higiene das mãos com clorexidina, uso de luvas, desinfecção ambiental (CDC, 1995).

Em 1997, a *Society for Healthcare Epidemiology of America* (SHEA) publicou um *guideline* para prevenir a resistência aos antimicrobianos em hospitais e em 2003 publicou um *guideline* específico para prevenir a transmissão de *S. aureus* e *Enterococcus* multirresistentes.

O *Managment multidrug-resistant organisms in Healthcare Settings*, publicado pelo CDC em 2007, ampliou as recomendações para outros micro-organismos além de *S.aureus* e *Enterococcus*. Este documento enfatiza que a prevenção da emergência e transmissão de micro-organismos multirresistentes requer uma compreensão que inclui não apenas intervenções relativas a medidas de controle, mas também a envolvimento administrativo (SIEGEL et al., 2007).

#### 1.4 DETERMINANTES DE VIRULÊNCIA

Como mencionado anteriormente, a maioria dos *Enterococcus* é comensal no trato gastrintestinal (MOORE; HOLDEMAN, 1974; NOBLE, 1978) ou está presente em ambientes contaminados por dejetos humanos. Portanto, a aquisição de determinantes de virulência está envolvida na sobrevivência do microrganismo em um ambiente altamente competitivo, o trato gastro-intestinal (MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000).

Para os *Enterococcus* poderem atuar como agentes patogênicos devem primeiro aderir aos tecidos do hospedeiro. Durante o processo de invasão os *Enterococcus* encontram um ambiente muito diferente do local onde se encontram como agentes colonizantes. Na infecção, são expressos fatores de virulência que permitem a adesão às células hospedeiras e à matriz extracelular, fatores que facilitam a invasão de tecidos e que causam danos através de toxinas. Esses mecanismos de virulência irão favorecer o crescimento deste micro-organismo nesses ambientes (KOCH et al., 2004)

Várias moléculas que parecem contribuir para a virulência de *Enterococcus* foram descritas na literatura. Entre elas incluem-se: fator de virulência associado à endocardite (LOW et al., 2003), adesina que se liga ao colágeno (NALLAPAREDDY; WEINSTOCK; MURRAY, 2003), fator de agregação (GALLI; LOTTSPREICH; WIRTH, 1990), gelatinase (SU et al., 1991), citolisina (COQUE et al., 1995), proteína de superfície (SHANKAR et al., 1999) e hialuronidase (RICE et al., 2003).

Estudos em cepas de *E. faecalis* revelaram um antígeno dominante de 37 kDa reconhecido por soro de pacientes com endocardite infecciosa (AITCHISON et al., 1987). O gene que codifica este antígeno foi clonado, sequenciado e designado *efaA*. A sequência de aminoácidos de EfaA apresenta homologia com proteínas de *Streptococcus* com propriedades de adesinas (LOWE; LAMBERT; SMITH, 1995).

A gelatinase, codificada pelo gene cromossomal *gelE*, é uma endopeptidase extracelular que hidrolisa colágeno, gelatina e pequenos peptídeos (SU et al., 1991) e que mostrou exacerbar a endocardite em um modelo animal (GUTSCHIK; MOOLER; CHRISTENSEN, 1979). A gelatinase em amostras clínicas de *E. faecalis* tem sido associada principalmente a processos inflamatórios. Alguns trabalhos revelam que ela pode aumentar a virulência dos microrganismos em

infecções sistêmicas humanas e em infecções utilizando-se modelos animais (COQUE et al., 1995; NAKAYAMA; KARIYAMA; KUMON, 2002; PILLAI et al., 2002). A produção da gelatinase por *E. faecalis* vêm sendo estudada para avaliar seu envolvimento na clínica de pacientes com bacteremias, endocardites e infecções urinárias e orais (BALDASSARRI et al., 2004; SEDGLEY; LENNAN; CLEWELL, 2004; SHANKAR et al., 2001; VERGIS et al., 2002).

A proteína de superfície, codificada pelo gene cromossomal *esp*, parece estar associada com aumento da colonização e persistência e (SHANKAR et al., 2001) formação de biofilme no trato urinário (TOLEDO-ARANA et al., 2001). A habilidade de formar biofilme em materiais médicos pode contribuir para o desenvolvimento de infecções relacionadas a cateter intravascular, com possível invasão da corrente sanguínea, sendo causa de significativa morbidade e apresentando difícil tratamento (JOYANES et al., 1999; DAROUICHE, 2001; SANDOE et al., 2002).

Vários estudos têm reportado a presença do gene *esp* em isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* (SATAKE et al., 1997; SHANKAR et al., 2001, 1999; (WOODFORD; SOLTANI; HARDY, 2001). Willems et al., (2001) relataram uma subpopulação de *E. faecium* resistentes a vancomicina (VREF) (responsável por epidemias hospitalares nos Estados Unidos, Austrália e Europa) geneticamente distinta de outra não-epidêmica. Essa subpopulação continha uma variante do gene *esp* que estava ausente em todos os isolados não-epidêmicos. Portanto, essa variante do gene *esp* pode ser utilizada como um marcador de alta prevalência em clones de VREF entre pacientes hospitalizado. A identificação dessa variante pode ser importante na criação de estratégias de controle de infecção, segundo Duprè, (2003). A alta prevalência do gene *esp* em isolados clínicos de *E. faecium* sugere um papel para *Esp* na patogênese das infecções por esse microrganismo (BALDASSARRI et al., 2001; COQUE, 2002; EATON; GASSON, 2001; WILLEMS et al., 2001; WOODFORD; SOLTANI; HARDY, 2001; EATON; GASSON, 2002; LEAVIS et al., 2003).

Shankar e colaboradores (2001), foram pioneiros em descrever a presença de uma Ilha de Patogenicidade (IPA) em microrganismo Gram-positivo. A IPA foi detectada inicialmente em *E. faecalis* MMH594 isolado de amostra clínica. Esses elementos genéticos apresentam vários genes de virulência agrupados (CAMARGO et al., 2005). Em 2004, Leavis et al., 2004 descreveram uma nova IPA

ligada ao gene *esp* em *E. faecium* e associada com epidemicidade. As IPAs de *E. faecalis* e de *E. faecium* são diferentes, contendo apenas os genes *araC* e *esp* como semelhança. Como já mencionado, *E. faecalis* é mais frequentemente isolado de espécimes clínicas, entretanto, *E. faecium*, principalmente resistente à ampicilina e à vancomicina, é mais frequentemente associado com disseminação epidêmica nos hospitais. É possível que diferenças nas seqüências das IPAs de *E. faecium* e *E. faecalis*, em adição ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, possam contribuir para essa diversidade epidemiológica. Visto que IPAs podem representar uma forma de evolução da virulência, gerando novas variantes patogênicas, é provável que a aquisição desta por *E. faecium* teve um importante papel na rápida emergência deste microrganismo como patógeno hospitalar.

Os fatores que determinam a patogenicidade de *E. faecium* não são bem conhecidos. Embora alguns fatores tenham sido identificados, o seu papel nas infecções ainda não está definido (ELSNER et al., 2000).

## 2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, é bem estabelecida a importância dos *Enterococcus* resistentes à vancomicina como patógenos nosocomiais, especialmente considerando subgrupos de pacientes mais susceptíveis. Da mesma forma, as características peculiares em relação à resistência intrínseca e à extraordinária capacidade de aquisição de elementos genéticos móveis, determinando uma variedade de resistências adquiridas, são amplamente reconhecidas. O rastreamento epidemiológico nas instituições de saúde permite uma melhor compreensão da disseminação dessas cepas multirresistentes, contribuindo para viabilizar medidas mais efetivas de controle.

Entretanto, dados em relação à epidemiologia das infecções/colonizações causadas por esse agente, bem como à susceptibilidade dos micro-organismos aos principais antimicrobianos de interesse clínico ainda são limitados no Brasil. Nesse contexto, o conhecimento da prevalência dos determinantes genéticos associados às resistências clinicamente importantes apresenta ainda uma maior limitação.

Considerando os aspectos acima mencionados e a ausência de dados sobre *Enterococcus* resistentes à vancomicina circulantes na região da grande Vitória, ES, este trabalho foi desenvolvido.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAIS

Caracterizar a epidemiologia e analisar os fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos de amostras de *Enterococcus* resistentes à vancomicina isoladas de pacientes de hospitais da grande Vitória-ES.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, utilizando diferentes metodologias fenotípicas, das amostras de *Enterococcus* resistentes à vancomicina isoladas de infecções e colonização em hospitais da grande Vitória.
  
- Detectar diferentes genes de resistência à vancomicina nas amostras isoladas através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).
  
- Detectar, pela técnica de PCR, a presença de genes de virulência nas amostras de VRE isoladas de infecções e colonizações.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS**

As amostras utilizadas para a realização deste estudo foram provenientes de diferentes hospitais da grande Vitória, entre janeiro de 2011 e janeiro de 2012. Elas foram previamente identificadas como VRE nos hospitais de origem através de testes manuais (bioquímicos e difusão a partir do disco) ou métodos automatizados.

Foram obtidas 100 amostras de *Enterococcus* isolados de materiais clínicos diversos. As amostras foram independentes, onde foi considerada apenas a primeira cultura clínica positiva isolada do mesmo sítio, para um mesmo paciente, sendo as demais amostras excluídas deste estudo.

As amostras foram estocadas em caldo de Brain Heart Infusion (BHI) (HIMEDIA, Índia) acrescido de 30% de glicerina (Dinâmica, SP, Brasil), sob refrigeração a -20°C.

Foram utilizadas as seguintes amostras padrão: *Enterococcus faecalis* “American Type Culture Collection” (ATCC) 29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Foram cedidas pelo laboratório de infecção hospitalar da Universidade Federal do Rio de Janeiro cepas controle com os genes de identificação da espécie, resistência e virulência pesquisados neste estudo (dados não publicados).

### **4.2 ASPECTOS ÉTICOS**

Esta pesquisa teve sua aprovação em seus aspectos éticos e metodológicos pelo comitê de ética em pesquisa do Centro de Ciência da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil, sob o registro nº 65/2001.

### **4.3 TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS**

#### **4.3.1 Método de difusão a partir do disco**

Os testes de difusão em ágar foram realizados conforme as recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2003)

Foram preparadas suspensões bacterianas em salina fisiológica esterilizada 0,9%, cuja turvação foi ajustada aquela da escala de turbidez 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Com auxílio de swabs esterilizados, as suspensões bacterianas padronizadas foram semeadas sobre superfície de meio de ágar Mueller-Hinton (HIMEDIA), de maneira a se obter crescimento uniforme e confluyente. Os discos impregnados com antibióticos foram então aplicados e as placas foram incubadas durante 18-24 h a 35°C. Após incubação, foi feita a leitura dos halos de inibição de crescimento e interpretação dos resultados. Foram utilizados discos (Cefar, SP, Brasil) contendo os seguintes antimicrobianos: penicilina (10 unidades), ampicilina (10 µg), gentamicina (120 µg), estreptomicina (300 µg), linezolidina (30 µg), vancomicina (30 µg), eritromicina (15 µg), norfloxacina (10 µg), ciprofloxacino (5 µg), nitrofurantoína (300 µg), teicoplanina (30 µg) e tetraciclina (30 µg). A cepa de referência *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, foi utilizada como controle. A categorização das amostras em sensível, intermediária ou resistente, foi realizada segundo os critérios estabelecidos pelo CLSI, 2013 (Tabela 4).

Tabela 4 - Padrão de interpretação dos diâmetros das zonas de inibição do crescimento bacteriano para *Enterococcus*.

Agente antimicrobiano	Concentração do disco	Diâmetro da zona total em mm		
		R <sup>b</sup>	I <sup>c</sup>	S <sup>d</sup>
Ampicilina	10 µg	≤ 16	-	≥ 17
Estreptomicina <sup>a</sup>	300 µg	≤6	7-9 <sup>e</sup>	≥10
Gentamicina <sup>a</sup>	120 µg	≤6	7-9 <sup>e</sup>	≥10
Vancomicina	30 µg	≤14	15-16	≥17
Teicoplanina	30 µg	≤10	11-13	≥14
Eritromicina	15 µg	≤13	14-22	≥23
Tetraciclina	30 µg	≤14	15-18	≥19
Ciprofloxacino	5 µg	≤15	16-20	≥21
Linezolida	30 µg	≤20	21-22	≥23
Nitrofurantoína	300 µg	≤14	15-16	≥17
Penicilina	10 units	≤14	-	≥15
Norfloxacino	10 µg	≤12	13-16	≥17

<sup>a</sup> HLAR – High-level aminoglycosydes resistance - resistência a altos níveis de aminoglicosídeos, <sup>b</sup> Resistente, <sup>c</sup> Intermediário, <sup>d</sup> Sensível, <sup>e</sup> Inconclusível (CLSI, 2013)

#### 4.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por Teste E

A CIM de vancomicina foi determinada pelo método de Etest® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) seguindo as instruções do fabricante. O preparo do teste e semeadura do inóculo foi feito conforme descrito para a técnica de difusão a partir do disco no item 4.3.1. As fitas contendo vancomicina foram depositadas individualmente em cada placa com auxílio de pinça bacteriológica esterilizada, seguido de incubação por 18-24 h a 35°C. A CIM foi considerada como a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano (ponto de intersecção da zona de inibição, de forma elíptica formada com a tira). A amostra padrão *E. faecalis* ATCC 29212 foi utilizada como controle.

### 4.3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima por diluição em ágar

A CIM para vancomicina e linezolida (Sigma, Chemical Company, St Louis, MO, EUA) foi determinada pelo método de diluição em ágar (CLSI, 2005). Foram utilizadas diferentes concentrações de vancomicina e linezolida variando de 1 a 256 µg/mL e 0,5 a 4 µg/mL respectivamente. Foi utilizada como controle de qualidade a amostra padrão *E. faecalis* ATCC 29212.

Amostras de *Enterococcus* que apresentavam valores iguais ou superiores a 8 µg/mL para vancomicina e 4 µg/mL para a linezolida foram classificadas como resistentes, enquanto que amostras com CIM menor ou igual a 2 µg/mL para vancomicina e linezolida foram classificadas como suscetíveis.

Para preparar os inóculos, quatro ou cinco colônias isoladas foram suspendidas em 3 mL de salina estéril, turvação equivalente ao 0,5 da escala de McFarland. Uma vez ajustada a turbidez do inóculo, diluiu-se 1:10 em solução salina estéril. Mediante o emprego do replicador do tipo Steers, depositaram-se volumes de 1µL de cada amostra na superfície das placas contendo os diferentes antimicrobianos. As placas foram incubadas a 35°C e a leitura foi feita após 24 h. A presença de mais de uma colônia foi considerada como resistência à concentração do antimicrobiano na placa e a CIM foi estabelecida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano. Meios de cultura sem antimicrobianos foram utilizados como controle do crescimento microbiano.

### 4.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A presença dos genes de resistência (*vanA* e *vanB*) e genes de caracterização da espécie (*ddl* para *E. faecium* e *E. faecalis*) foram pesquisados pelo método de PCR *Multiplex* segundo Depardieu, Perichon e Courvalin (2004) com modificações. Já a determinação dos genes de virulência *ace* e *efa* foi realizada segundo Duprè e colaboradores (2003) com modificações, e *agg*, *gelE* e *esp*, segundo Eaton e Gasson (2001) com modificações.

#### 4.4.1 Liberação do DNA

A liberação do DNA bacteriano foi realizada de acordo com Schuenck e colaboradores (2008), com modificações. Cinco a seis colônias de cada amostra cultivada em ágar sangue (“Blood Agar Base”, HIMEDIA, com 5% de sangue de carneiro) foram suspensas em 100µL de água estéril deionizada e aquecidas a 100 °C por 15 minutos. Após centrifugação de 15.000 x g, por 30 segundos, o sobrenadante com DNA liberado foi coletado para ser utilizado na reação de PCR.

#### 4.4.2 PCR *Multiplex* para identificação da espécie e gene *van* de resistência

Uma alíquota de 3µL do produto de extração foi adicionada a mistura da reação de PCR, que incluía 30 pmol de cada par de primer (Tabela 5), 400 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Life Technologies, SP, Brasil), 2,5 µL do tampão 10x (10 mM Tris HCl, 25mM KCl), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, CA, EUA) e água deionizada estéril para um volume final de 50µL. As amplificações foram realizadas em termociclador (Veriti 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems), empregando a seguinte programação: 1 ciclo de 3 min a 94°C para desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C para desnaturação, 1 min a 54°C para anelamento, 1 min a 72°C para extensão, seguidos de 1 ciclo de 7 min a 72°C para extensão final.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE 0,5X (0,89 M Tris, 0,89 M ácido bórico, 2,5 mM EDTA, pH 8,2) (Hexapur, Amsterdam, Holanda), a 120V por 1h. A coloração do gel foi realizada posteriormente, com a imersão deste em uma solução de brometo de etídio 0,005µL/ml (Hexapur) por 5 minutos, sendo o gel fotografado sob luz ultravioleta e observado visualmente (MiniBIS Pro 16mm, DNR Bio-Imaging Systems). Como padrão de DNA para a corrida eletroforética foi utilizado o padrão 100 pb DNA ladder (Invitrogen).

#### 4.4.3 Reação de PCR para determinação dos genes de virulência

##### 4.4.3.1 Detecção dos genes *ace* e *efaA*

Nesta etapa, para pesquisa de cada gene alvo *ace* e *efaA* foi usada uma alíquota de 3µL do produto de extração, adicionada a mistura da reação de PCR, que incluía 40 pmol de cada par de primer (Tabela 6), 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Life Technologies), 2,5 µL do tampão 10x (10 mM Tris HCl [pH 8.4], 25mM KCl), 2 mM de MgCl<sub>2</sub> 0,1%, 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e água deionizada estéril para um volume final de 50µL. As amplificações foram realizadas em termociclador (Veriti 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems), empregando a seguinte programação: 1 ciclo de 1 minuto a 94°C para desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C para desnaturação, 1 minuto a 56°C para anelamento, 1 minuto a 72°C para extensão, seguidos de 1 ciclo de 1 minuto a 72°C para extensão final.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE 0,5X (0,89 M Tris, 0,89 M ácido bórico, 2,5 mM EDTA, pH 8,2) (Hexapur), a 120V por 1h. A coloração do gel foi realizada posteriormente, com a imersão deste em uma solução de brometo de etídio 0,005µL/ml (Hexapur) por 5 minutos, sendo o gel fotografado sob luz ultravioleta e observado visualmente (MiniBIS Pro 16mm, DNR Bio-Imaging Systems). Como padrão de DNA para a corrida eletroforética foi utilizado o padrão 100 pb DNA ladder (Invitrogen).

##### 4.4.3.2 Detecção dos genes *agg* e *gelE*

Para pesquisa dos genes alvo *agg* e *gelE*, também foi usada uma alíquota de 3µL do produto de extração, adicionada a mistura da reação de PCR, que incluía 20 pmol de cada par de primer (Tabela 6), 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Life Technologies), 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 2,5 µL do tampão 10x (20 mM Tris-HCl [pH 8.4], 50 mM KCl), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> 0.1% e água deionizada estéril para um volume final de 25µL. As amplificações foram realizadas em termociclador (Veriti 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems), empregando a seguinte programação: 1 ciclo de 2 min a 94°C para desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos de 30 s a 94°C para

desnaturação, 30 s a 54°C para anelamento, 30 s a 72°C para extensão, seguidos de 1 ciclo de 2 min a 72°C para extensão final.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE 0,5X (0,89 M Tris, 0,89 M ácido bórico, 2,5 mM EDTA, pH 8,2) (Hexapur), a 120V por 1h. A coloração do gel foi realizada posteriormente, com a imersão deste em uma solução de brometo de etídio 0,005µL/ml (Hexapur) por 5 minutos, sendo o gel fotografado sob luz ultravioleta e observado visualmente (MiniBIS Pro 16mm, DNR Bio-Imaging Systems). Como padrão de DNA para a corrida eletroforética foi utilizado o padrão 100 pb DNA ladder (Invitrogen).

#### 4.4.3.3 Detecção do gene *esp*

Já para a pesquisa do gene alvo *esp*, foi usada uma alíquota de 3,5 µL do produto de extração, adicionada a mistura da reação de PCR, que incluía 20 pmol de cada par de primer (Tabela 6), 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Life Technologies), 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 2,5 µL do tampão 10x (20 mM Tris-HCl [pH 8.4], 50 mM KCl), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> 0.1% e água deionizada estéril para um volume final de 25µL. As amplificações foram realizadas em termociclador (Veriti 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems), empregando a seguinte programação: 1 ciclo de 2 min a 94°C para desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos de 45 s a 94°C para desnaturação, 45 s a 56°C para anelamento, 45 s a 72°C para extensão, seguidos de 1 ciclo de 2 min a 72°C para extensão final.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE 0,5X (0,89 M Tris, 0,89 M ácido bórico, 2,5 mM EDTA, pH 8,2) (Hexapur), a 120V por 1h. A coloração do gel foi realizada posteriormente, com a imersão deste em uma solução de brometo de etídio 0,005µL/ml (Hexapur) por 5 minutos, sendo o gel fotografado sob luz ultravioleta e observado visualmente (MiniBIS Pro 16mm, DNR Bio-Imaging Systems). Como padrão de DNA para a corrida eletroforética foi utilizado o padrão 100 pb DNA ladder (Invitrogen).

Tabela 5 - Sequências iniciadoras da técnica de PCR *multiplex* para a identificação de *Enterococcus* resistentes à vancomicina

Denominação da Sequência	Sequência (5'→3')	Gene	Tamanho do amplicon (bp)
EA1	GGGAAAACGACAATTGC	<i>vanA</i>	732
EA2	GTACAATGCGGCCGTTA		
EB3	ACGGAATGGGAAGCCGA	<i>vanB</i>	647
EB4	TGCACCCGATTTTCGTTT		
DD13	CACCTGAAGAAACAGGC	<i>ddl</i> ( <i>E.faecalis</i> )	475
DD3-2	ATGGCTACTTCAATTTACAG		
FAC1	GAGTAAATCACTGAACGA	<i>ddl</i> ( <i>E.faecium</i> )	1.091
FAC2	CGCTGATGGTATCGATTCAT		

(DEPARDIEU; PERICHON; COURVALIN, 2004)

Tabela 6 - Sequências iniciadoras da técnica de PCR para a detecção de genes de virulência nas amostras de *Enterococcus*

Denominação da Sequência	Sequência (5'→3')	Gene	Tamanho do amplicon (bp)	Referência
ACE1	AAAGTAGAATTAGATCCACAC	<i>Ace</i>	320	DUPRE, (2003)
ACE2	TCTATCACATTCGGTTGCG			
efaA 1	CGTGAGAAAGAAATGGAGGA	<i>efaA</i>	499	DUPRE, (2003)
efaA 2	CTACTAACACGTCACGAATG			
TE34	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC	<i>Esp</i>	933	EATON; GASSON, (2001)
TE36	GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA			
TE9	ACCCCGTATCATTGGTTT	<i>gelE</i>	419	EATON; GASSON, (2001)
TE10	ACGCATTGCTTTTCCATC			
TE3	AAGAAAAGAAGTAGACCAAC	<i>agg</i>	1.553	EATON; GASSON, (2001)
TE4	AAACGGCAAGACAAGTAAATA			

## 5 RESULTADOS

### 5.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

Foram investigados a prevalência de espécies e os padrões de resistência e virulência de 100 amostras de VRE isoladas de diversos materiais clínicos, provenientes de hospitais da grande Vitória, durante o período de janeiro de 2011 a janeiro de 2012.

O material clínico de onde se isolou maior número de amostras foi swab retal/fezes (77%), seguido de urina (16%), sangue (3%), abscessos, ponta de cateter, swab abdominal e hematoma (1%) (Tabela 8).

### 5.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Todas as 100 amostras de *Enterococcus* foram identificadas em espécie, por testes bioquímicos convencionais nos seus hospitais de origem. Todas as amostras foram submetidas a testes genotípicos para confirmação dos resultados obtidos com os testes fenotípicos, obtendo-se 97% de concordância entre a identificação fenotípica e genotípica. Noventa e sete (97%) das 100 amostras apresentaram redução da sensibilidade à vancomicina, sendo classificadas como VRE. Três amostras (3%) previamente identificadas nos hospitais de origem como VRE não apresentaram resistência à vancomicina nos testes realizados neste estudo.

Foram identificadas as espécies das 100 amostras de *Enterococcus* através do método genético. *E. faecium* foi a única espécie encontrada entre os isolados classificados como VRE, sendo observado em 97 amostras (97%). Já o *E. faecalis* foi identificado em apenas 3 amostras (3%) e estes isolados eram sensíveis à vancomicina e não possuíam gene *van* (Tabela 9).

Tabela 7 – Distribuição das fontes de isolamentos das amostras de *Enterococcus* de acordo com os hospitais de origem.

Fonte de isolamento	Amostras clínicas positivas para <i>Enterococcus</i>							Total de amostras
	Swab Retal/fezes	Urina	Sangue	Abscesso	Ponta de Cateter	Swab abdominal	Hematoma	
Hospital 1	29 / 85,3	4 / 11,7	-	-	-	-	1 / 3	34
Hospital 2	7 / 29,4	6 / 35,3	2 / 11,75	1 / 5,9	1 / 5,9	-	-	17
Hospital 3	7 / 70	2 / 20	1 / 10	-	-	-	-	10
Hospital 4	9 / 100	-	-	-	-	-	-	9
Hospital 5	7 / 87,5	1 / 12,5	-	-	-	-	-	8
Hospital 6	4 / 80	1 / 20	-	-	-	-	-	5
Hospital 7	2 / 40	2 / 40	-	-	-	1 / 20	-	5
Hospital 8	3 / 100	-	-	-	-	-	-	3
Hospital 9	3 / 100	-	-	-	-	-	-	3
Hospital 10	2 / 100	-	-	-	-	-	-	2
Hospital 11	1 / 100	-	-	-	-	-	-	1
Hospital 12	1 / 100	-	-	-	-	-	-	1
Hospital 13	1 / 100	-	-	-	-	-	-	1
Hospital 14	1 / 100	-	-	-	-	-	-	1
Total nº	77 / 77	16 / 16	3 / 3	1 / 1	1 / 1	1 / 1	1 / 1	100

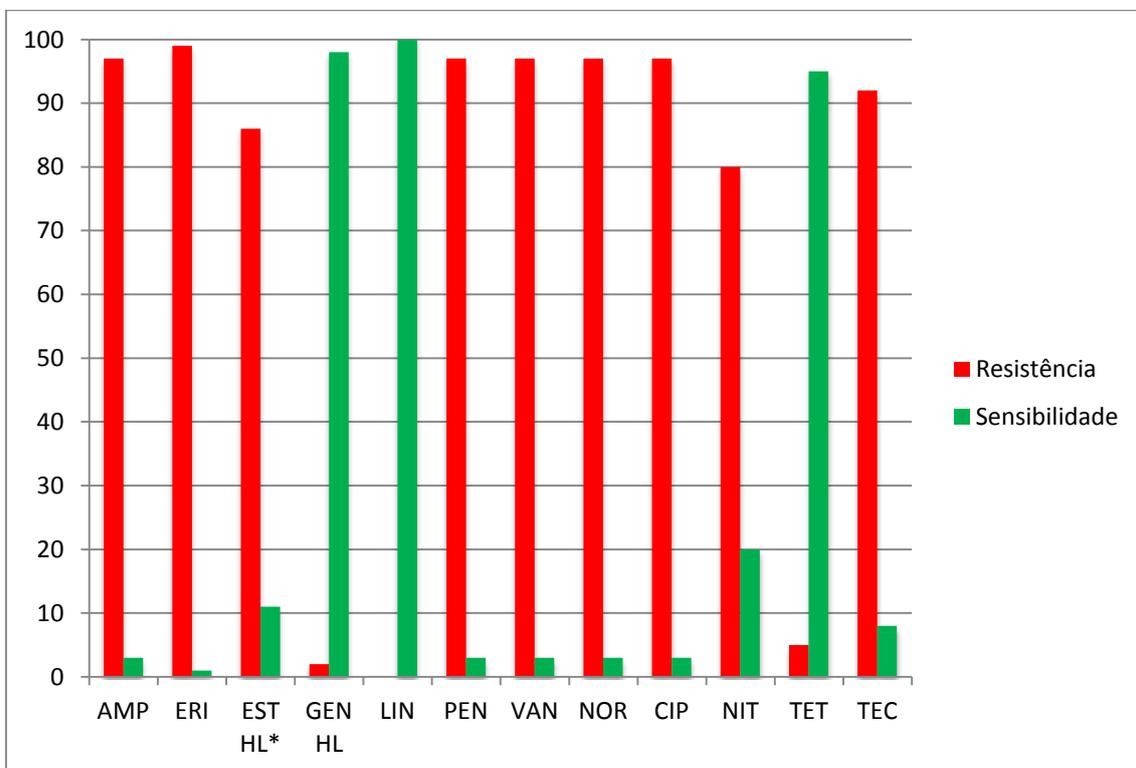
Os hospitais 1, 2, 5, 6, 7, 8, 10, 11 e 13 são públicos e , 3, 4, 9, 12 e 14 são privados.

### 5.3 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE

#### 5.3.1 Teste de difusão a partir do disco

As taxas de resistência aos antimicrobianos testados contra 100 amostras foram as seguintes: 99% à eritromicina, 97% à ampicilina, penicilina, norfloxacin, ciprofloxacina e vancomicina, 92% à teicoplanina, 86% à estreptomicina HL, 80% à nitrofurantoína, 5% à tetraciclina e 2% à genatmicina HL. Todas as amostras foram sensíveis à linezolida (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Perfil de susceptibilidade das amostras aos antimicrobianos testados.



Abreviações: AMP, ampicilina, ERI, eritromicina, EST HL, estreptomicina em altas concentrações, GEN HL, gentamicina em altas concentrações, LIN, linezolida, PEN, penicilina, VAN, vancomicina, NOR, norfloxacin, CIP, ciprofloxacina, NIT, nitrofurantoína, TET, tetraciclina, TEC, teicoplanina.

\* 3 amostras inconclusivas (CLSI, 2013).

### 5.3.2 Determinação da CIM

A CIM para a vancomicina pelos métodos de diluição em ágar e Teste E foi semelhante, com diferenças de uma diluição, mas sem modificações na categoria. Noventa e sete amostras apresentaram resistência à altas concentrações de vancomicina (CIM  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ ) e três amostras apresentaram sensibilidade a mesma com CIM  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$  (Tabela 8).

Todas as amostras também se mostraram sensíveis à linezolida pela diluição em ágar, com CIM  $\leq 1,0 \mu\text{g/mL}$ .

Tabela 8 – Concentrações Inibitórias Mínimas de vancomicina determinadas pelos métodos de diluição em ágar e Teste E.

	CIM Etest e diluição em ágar $\geq 256 \mu\text{g/mL}$	CIM Etest $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ e diluição em ágar $128 \mu\text{g/mL}$	CIM Etest e diluição em ágar $32 \mu\text{g/mL}$	CIM Etest e diluição em ágar $\leq 3 \mu\text{g/mL}$
n° de amostras	75	21	1	3

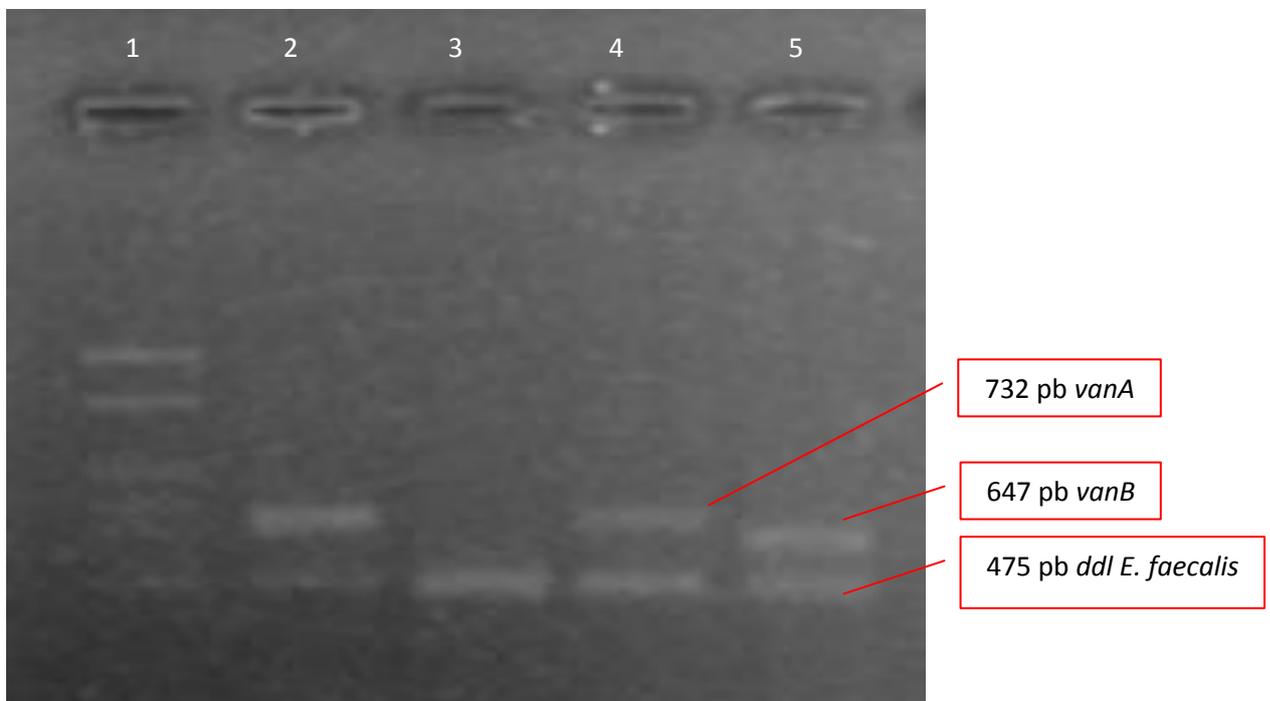
### 5.4 DETECÇÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA

O gene de resistência do tipo *vanA* foi o único gene detectado em quase todas as amostras estudadas (97%), estando ausente em 3 (3%) das amostras de *E. faecalis* (Figura 5). A correlação da presença do gene *van* com a CIM para vancomicina está apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 – Presença dos genes *van* e concentração inibitória mínima (CIM) de vancomicina frente as 100 amostras de *Enterococcus* utilizadas neste estudo.

Espécie (nº de amostras)	Genes <i>van</i>		CIM (µg/mL)		
	ausente	<i>vanA</i>	≤ 4	8 - 16	≥ 32
<i>E. faecalis</i> (3)	3	0	3	0	0
<i>E. faecium</i> (97)	0	97	0	0	97
Total n (%)	3 (3)	97 (97)	3 (3)	0 (0)	97 (97)

Figura 5 – Foto da eletroforese em gel dos produtos amplificados no PCR *Multiplex*.

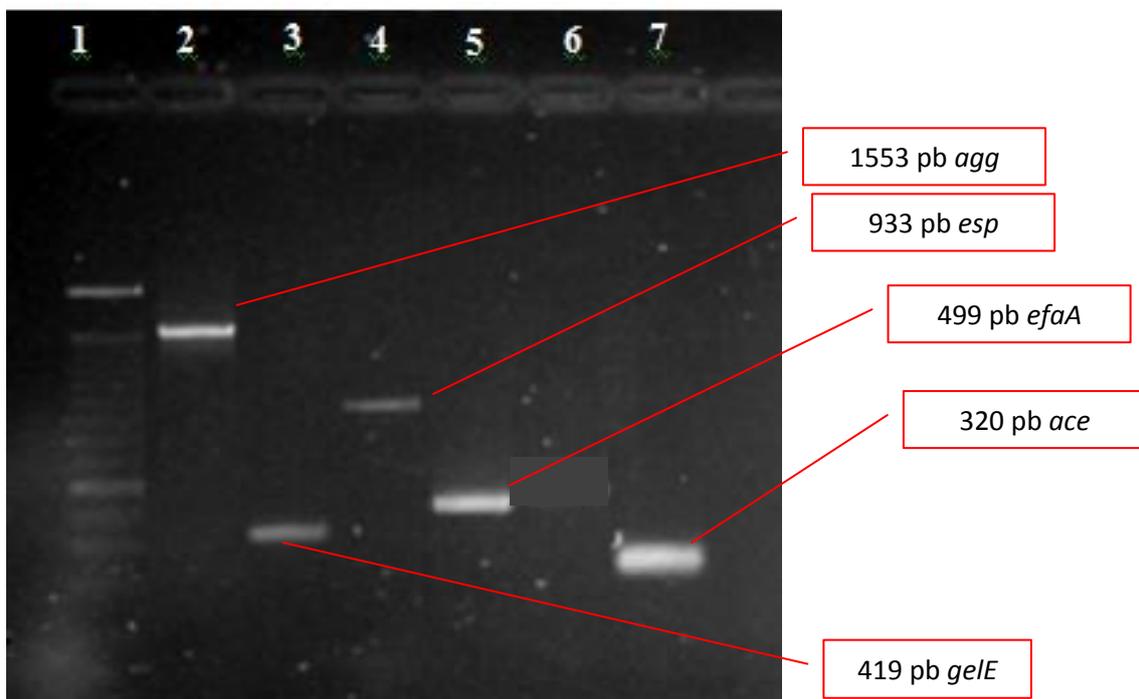


1- Marcador de peso molecular 2 - Cepa controle positivo *ddl E. faecalis vanA*. 3 - Cepa *E. faecalis* ATCC 29212. 4 - Cepa controle positivo *ddl E. faecalis vanA*. 5 - Cepa controle positivo *ddl E. faecalis vanB*.

## 5.5 DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA

Foram pesquisados cinco genes de virulência nas 100 amostras de *Enterococcus* pelo método da PCR (Figura 6). Nas três amostras identificadas como *E. faecalis*, o gene *esp* e *ace* foram encontrados em duas amostras (66%), enquanto *efaA*, *gelE* e *agg* em três amostras (100%). Já nas 97 amostras identificadas como *E. faecium*, dentre os isolados de *swab* retal/fezes o gene *esp* foi encontrado em 60 amostras (61,8%), *efaA* em cinco amostras (5,1%), *gelE* em três amostras (3,1%), *agg* e *ace* em duas amostras (2%) (Tabela 10). Todas as amostras isoladas de infecções apresentaram o gene *esp* (20,6%), os demais genes não foram encontrados.

Figura 6 - Foto da eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados para detecção dos genes de virulência pesquisados.



1: Marcador de peso molecular 2 - amostra positiva para o gene *agg* 3 - amostra positiva para o gene *gelE* 4 - amostra positiva para o gene *esp* 5 - amostra positiva para o gene *efaA* 6 - controle negativo 7 - amostra positiva para o gene *ace*.

Tabela 10 – Presença dos genes de virulência nas 100 amostras de *Enterococcus* utilizadas neste estudo.

Genes de virulência	<i>Enterococcus faecalis</i> (3 amostras)		<i>Enterococcus faecium</i> (97 amostras)		Total % das amostras
	Colonização (N=3) N (% das amostras)	Infecção (N=0) N (% das amostras)	Colonização (N=73) N (% das amostras)	Infecção (N=24) N (% das amostras)	
	<i>esp</i>	2 (66,6)	-	60 (61,8)	
<i>efaA</i>	3 (100)	-	5 (5,1)	-	8
<i>gelE</i>	3 (100)	-	3 (3,1)	-	6
<i>agg</i>	3 (100)	-	2 (2,0)	-	5
<i>ace</i>	2 (66,6)	-	2 (2,0)	-	4

Foram encontrados em duas amostras (2%) todos os genes de virulência pesquisados. O conjunto de genes *efaA*, *gelE*, *agg*, *ace* e o conjunto *esp*, *efaA* também foram encontrados em duas amostras. Já o conjunto de genes *esp*, *efaA*, *gelE*, *agg* foi encontrado somente em uma amostra (Tabela 11).

Tabela 11 – Distribuição dos genes de virulência entre as amostras de *Enterococcus*.

Perfil de virulência	N de <i>Enterococcus</i>	
	Colonização	Infecção
<i>esp + efaA + gelE + agg + ace</i>	2	-
<i>efaA + gelE + agg + ace</i>	2	-
<i>esp + efaA + gelE + agg</i>	1	-
<i>esp + efaA</i>	2	-
<i>esp</i>	57	20
<i>efaA</i>	1	-
<i>gelE</i>	1	-
<i>agg</i>	1	-

## 6 DISCUSSÃO

Este estudo investigou a frequência das espécies, dos genes de resistência, virulência e os padrões de resistência antimicrobiana em isolados de enterococos resistentes à vancomicina obtidos em amostras provenientes de hospitais da grande Vitória, Espírito Santo.

Com relação ao sítio de isolamento das amostras do estudo, podemos observar uma predominância de amostras de colonização do trato gastrointestinal (Swab retal/fezes - 74%), seguido de amostras de infecções urinárias (16%) e de corrente sanguínea (3%) causadas por VRE. Apesar do importante papel exercido pelos múltiplos fatores de risco na infecção pelo VRE, a colonização parece ter papel preponderante no desenvolvimento da infecção. Além disso, o portador intestinal pode permanecer como reservatório para a disseminação hospitalar do VRE assim como apresentar maior risco de desenvolver infecção pelo VRE (DESHPANDE et al., 2007). Reforçando isto, estudos sobre epidemiologia dos VREs indicam que o trato gastrointestinal dos pacientes é o principal reservatório destas bactérias, e a contaminação ambiental parece ser o principal meio de disseminação desses micro-organismos (FALK et al., 2000; GORDTS et al., 1995). Devido a presença deste grande reservatório de VRE no trato gastrointestinal, e a contaminação frequente e duradoura das superfícies do ambiente, surtos de VRE tem sido difíceis de conter, já que a erradicação da colonização de pacientes e a descontaminação ambiental são difíceis, levando VRE a ser endêmico em algumas instituições hospitalares (FALK et al., 2000). Por não haver uma concordância sobre métodos para a descolonização por VRE, a prevenção da disseminação desses micro-organismos através do isolamento de contato do paciente colonizado é a opção de escolha, além do uso prudente dos antibióticos (ASSADIAN et al., 2007). Isto evidencia ainda mais a necessidade do rápido diagnóstico destas bactérias e seus marcadores de resistência.

Entre os VREs avaliados pelo Programa SENTRY (2007), provenientes dos Estados Unidos e Europa, 36,7% foram isolados a partir do trato urinário, 28% da corrente sanguínea seguida pelas de pele e partes moles com 9,2% (DESHPANDE et al., 2007). Estes dados estão em concordância com os nossos resultados.

Na América Latina dados publicados por Biedenbach e colaboradores, (2004) apontam índices baixos (3,3%) de infecções sanguíneas por VRE entre 11.743 amostras bacterianas isoladas. As infecções causadas por VRE mais frequentemente identificadas são aquelas do trato urinário, intra-abdominal, feridas e de cateteres intravasculares. Entretanto, o simples isolamento de VRE na urina não significa infecção, outros critérios como os propostos pelo CDC devem ser adotados (GARDNER et al., 1988). Da mesma forma a pele pode estar colonizada por VRE o que aumenta o risco de contaminação de culturas de sangue (TENOVER; MCDONALD, 2005).

A maior parte das amostras VREs isoladas no Brasil, sobretudo no estado do Rio de Janeiro, pertence às espécies *E. faecalis* e *E. faecium*. Entretanto, já foi constatada a emergência de amostras de *E. gallinarum* portadoras do gene *vanA*, como causa de infecção e colonização de pacientes (CAMARGO et al., 2004; MERQUIOR et al., 2008; NEVES et al., 2009).

O primeiro caso de VRE do Brasil ocorreu na cidade de Curitiba em 1996, tendo como único isolado a espécie *E. faecium* (DALLA COSTA et al., 1998). Ao analisar os dados do primeiro surto hospitalar causado por VRE no Brasil, ocorrido entre maio a dezembro de 1998, observou-se um predomínio de VRE da espécie *E. faecalis* (78%), seguida da espécie *E. faecium* (22%) (ZANELLA et al., 2003). No presente estudo, observou-se um predomínio de VRE da espécie *E. faecium* (100%), corroborando com os dados do trabalho de D'azevedo e colaboradores (2008), onde se observou que em hospitais da cidade de São Paulo a frequência de VRE foi de 54% para *E. faecium* e 45% para *E. faecalis*. Com exceção de Porto Alegre observa-se um aumento na prevalência de *E. faecium* entre os isolados de VRE em várias regiões do Brasil (D'AZEVEDO et al., 2008; RIBAS et al., 2007; VILELA et al., 2006). Tal fato é preocupante uma vez que esta espécie apresenta resistência aos  $\beta$ -lactâmicos e tem a possibilidade de apresentar o gene *esp* que codifica uma proteína de superfície enterocócica que promove adesão ao trato urinário humano (TENOVER; MCDONALD, 2005).

A alta taxa de resistência de *Enterococcus* aos antimicrobianos destaca a necessidade da pronta identificação destes microrganismos, diferenciando-os de outras bactérias taxonomicamente relacionadas. Estas incluem, por exemplo, *Streptococcus* do grupo D de Lancefield, *Lactococcus* e *Vagococcus* os quais, em geral, apresentam níveis de suscetibilidade aos antimicrobianos marcadamente

mais elevados. Outros como os *Leuconostoc* e *Pediococcus* apresentam resistência intrínseca a níveis elevados da vancomicina, podendo, ocasionalmente, serem confundidos com VRE (DESAI et al., 2001).

As amostras de *E. faecium* tendem a ser intrinsecamente mais resistentes se comparadas com as de *E. faecalis* (MALANI et al., 2002). Este fato é reforçado por trabalhos que tem demonstrado que a frequência de isolamento de cepas multirresistentes é maior entre amostras de *E. faecium* (BUSANI et al., 2004; PAPAPARASKEVAS et al., 2000; ZANELLA et al., 2003). Esses dados foram confirmados em nosso estudo, visto que as únicas cepas sensíveis aos antimicrobianos foram geneticamente identificadas como *E. faecalis*.

Convém destacar que as amostras de VRE se mostraram marcadamente menos suscetíveis a grande maioria das outras classes de antimicrobianos. A redução da susceptibilidade a outras classes de antimicrobianos por parte de VRE é um evento já observado em outros trabalhos (PANESSO et al., 2002; POURSHAFIE et al., 2008; VILELA et al., 2006), evidenciando ainda mais a utilidade e necessidade da pronta identificação destes marcadores de resistência aos glicopeptídeos. Esse dado fica evidenciado no Gráfico 1 do presente estudo.

Neste estudo, 97% das amostras estudadas foram resistentes à ampicilina. A respeito dos aminoglicosídeos foi observada uma maior resistência à estreptomicina (86%) em comparação a gentamicina (2%). Esses dados estão semelhantes à trabalhos como o de Zhanel e colaboradores (2003) e Corso e colaboradores (2007). Foram pesquisadas 697 amostras de VREs por Zhanel e colaboradores (2003), 85,8% apresentaram resistência à ampicilina, 69,3% à estreptomicina e 47,6% à gentamicina. Já nas 189 amostras de VRE analisadas por Corso e colaboradores (2007), a taxa de resistência à ampicilina, estreptomicina e gentamicina foi de 98,4%, 95,8% e 77,2% respectivamente. Entretanto, deve ser lembrado que a amostragem do presente estudo foi selecionada, sendo composta, em sua maioria, por VRE. Levando isto em consideração, nosso estudo não está de acordo com o trabalho de Titize-de-Almeida e colaboradores (2004), que, analisou 99 amostras de *Enterococcus* e estas apresentaram uma taxa de resistência à ampicilina, estreptomicina e gentamicina igual a 10%, 6% e 17% respectivamente.

Resistência a altas concentrações de vancomicina foi observada em 97% dos isolados, apresentando uma CIM  $\geq 32\mu\text{g/ml}$  pelos métodos pesquisados. Três amostras apresentaram sensibilidade à vancomicina. Esse resultado pode estar

relacionado à falhas dos métodos utilizados na detecção da resistência realizadas nos hospitais de origem.

A amostragem do estudo se caracterizou pela sensibilidade plena a linezolida, não sendo encontrada nenhuma amostra resistente ou intermediária a este antimicrobiano. Este fato já era esperado, pois, de modo geral, a resistência a linezolida ainda é pouco frequente (POURSHAFIE et al., 2008; VILELA et al., 2006), apesar de trabalhos terem demonstrado um aumento na incidência de amostras plenamente resistentes ou com resistência intermediária, decorrente do aumento do uso deste antimicrobiano, ocasionando eventuais surtos de *Enterococcus* resistentes a linezolida (KAINER et al., 2007; SCHEETZ et al., 2006). Porém o uso deste antimicrobiano deve ser avaliado com cautela para que não ocorra a seleção de amostras mutantes de enterococos, diminuindo assim as opções de escolha para o tratamento de VRE. Vários estudos mostram uma excelente eficácia da linezolida contra VRE (NOSKIN et al., 1999; PATEL et al., 1999) e, além disso, este antimicrobiano tem ação contra *E.faecalis* e *E.faecium*, o que não ocorre com a Quinupristina-Dalfopristina que só tem boa eficácia contra *E. faecium* (COLLINS et al., 1993; WILLIAMS et al., 1997). A Quinupristina-Dalfopristina pode ser usada com sucesso no tratamento de VRE, entretanto o maior problema consiste em que este antimicrobiano não pode ser usado para tratamento de infecções sistêmicas (SCHEETZ et al., 2008).

Com respeito à detecção de genes relacionados à resistência aos glicopeptídeos, também foi constatada elevada especificidade. Foi observado que todas as amostras apresentaram correlação entre os resultados fenotípicos e genéticos, ou seja, estas amostras apresentaram ou não redução da sensibilidade aos glicopeptídeos e, correspondentemente, apresentaram ou não reação positiva para algum gene de resistência aos glicopeptídeos incluídos nas reações de PCR *multiplex*.

Cepas de VRE apresentando o fenótipo VanA são em sua maioria altamente resistentes à vancomicina e moderadamente a altamente resistentes à teicoplanina (BONTEN, WILLEMS, WEISTEIN, 2001; CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000). Foi identificado em todas as amostras de VRE analisadas resistência à vancomicina e teicoplanina, sendo confirmada pela técnica de diluição em ágar e teste por Etest a resistência à vancomicina, onde se obteve a concentração inibitória mínima (CIM), e pela técnica da PCR através da detecção do

gene de resistência *vanA*, diferentemente do primeiro isolado em Curitiba que apresentou genótipo *vanD4* (DALLA COSTA et al., 1998; DALLA COSTA et al., 2000).

É bem documentada na literatura essa maior prevalência do *cluster vanA* (CORSO et al., 2007; DESHPANDE et al., 2007; KURIYAMA et al., 2003; MANIATIS et al., 2001; NIEDERHAUSERN et al., 2007; NOVAIS et al., 2008; ZHENG et al., 2007), inclusive no Brasil (CAIAFFA FILHO et al., 2003; CAMARGO et al., 2004, 2005; CEREDA et al., 2002; D'AZEVEDO et al., 2008; VILELA et al., 2006; ZANELLA et al., 2003).

Embora o *E. faecium* seja considerado um importante patógeno hospitalar, pouco se sabe sobre a sua virulência. Várias pesquisas em isolados de *E. faecium* de diferentes fontes têm demonstrado a baixa prevalência dos marcadores de virulência desta espécie. A proteína de superfície enterocócica, codificada pelo gene *esp*, é o fator de virulência que contribui para colonização e permanência de *E. faecalis* em infecções (KOCH et al., 2004; SHANKAR et al., 2001). Estudos *in vitro* demonstraram a forte correlação entre a presença do gene *esp* com a capacidade de amostras enterocócicas de formar biofilme (SENO et al., 2005; TOLEDO-ARANA et al., 2001). Entretanto, esta correlação é contestada em outros estudos. Estes estudos demonstraram não ser determinante na formação do biofilme a presença do gene *esp*, mesmo quando associado com outros fatores de virulência já descritos como importantes no desenvolvimento do biofilme, como o gene *gelE* (CARNIOL; GILMORE, 2004; KRISTICH et al., 2004; SENO et al., 2005). O gene *esp* foi identificado como um marcador clonal de uma cepa de *E. faecium* que se espalhou através dos continentes (RICE et al., 2003). Ele foi o gene de virulência mais encontrado nas amostras de VRE analisadas neste estudo (62%), estando de acordo com os resultados de Camargo e colaboradores (2006) onde este gene foi encontrado em 13 amostras (56%) de VRE.

O segundo gene mais frequentemente encontrado nos isolados foi o *efaA* (8%). Ele codifica uma adesinas de parede celular expressa pelo *E. faecalis* e *E. faecium* (EATON; GASSON, 2001). Este resultado está em contraste com o resultado do estudo de Billstrom e colaboradores (2008) onde não foi detectada a presença do gene *efaA*.

Nossas amostras de *E. faecalis* apresentaram alto índice de positividade para os genes *efaA* (100%), *gelE* (100%), *agg* (100%) e *ace* (66,6%) porém, apenas

uma pequena quantidade das amostras (*efaA* 5%, *gelE* 3%, *agg* 2% e *ace* 2%) de *E. faecium* possuíam estes genes. Este resultado está em contraste com o resultado do estudo de Billstrom e colaboradores (2008), Camargo e colaboradores (2006), Eaton e Gasson (2001), Vankerckhoven e colaboradores (2008), Hallgren e colaboradores (2009), Worth e colaboradores (2008), onde não foi detectada a presença desses genes em amostras de *E. faecium*. Esse fato pode significar a ocorrência de transferência destes genes entre as espécies de *Enterococcus*, já que ele estava presente em quase todas as amostras de *E. faecalis* e em poucas amostras de *E. faecium*.

Em geral, apenas o gene *esp* foi frequentemente encontrado nesses estudos Vankerckhoven e colaboradores (2008) 9%, Billstrom e colaboradores (2008) 56%, Hallgren e colaboradores (2009) 71% e Worth e colaboradores (2008) 80,5%, o que corrobora com os resultados obtidos nesse estudo.

A caracterização e identificação dos Enterococos usando métodos fenotípicos tradicionais pode ser um processo difícil que requer vários testes, cuja leitura final pode ser demorada. Apesar destes testes serem, na maioria das vezes, capazes de identificar as várias espécies de Enterococos, estas provas são tipicamente realizadas em tubos e requerem um longo tempo de incubação antes dos testes poderem ser interpretados de modo definitivo (FACKLAM; COLLINS, 1989; JACKSON; FEDORKA-CRAY; BARRETT, 2004). A identificação por estes métodos também pode ser dificultada pela detecção de amostras com reações fracas ou atípicas fisiológicas como, por exemplo, quando são detectadas amostras de *E. casseliflavus* ou *E. gallinarum* imóveis, ou seja, algumas amostras não se comportarem fisiologicamente da mesma maneira que a amostra tipo da espécie, gerando confusão na identificação (TEIXEIRA et al., 1995; TYRRELL et al., 1997).

Apesar das técnicas de sequenciamento estarem cada vez mais acessíveis, ainda são de custo elevado e requerem um tempo relativamente longo para a sua realização, além de mão de obra altamente especializada, dificultando a sua implantação em laboratórios de diagnóstico clínico. Para transpor estas dificuldades, a utilização da técnica de PCR contendo primers espécie-específicos mostra-se como uma boa opção. Quando acompanhado de um primer gênero-específico, o PCR multiplex se mostra um método de elevada acurácia para a identificação dos enterococos, sem a necessidade de extensivos testes bioquímicos (JACKSON; FEDORKA-CRAY; BARRETT, 2004). Este dado foi comprovado em

nosso estudo. As detecções de espécie e resistência foram realizadas em um curto espaço de tempo. Além disso, detectamos falhas na identificação bioquímica e na detecção da resistência à vancomicina realizada por testes fenotípicos em 3 amostras.

Um aspecto importante é que os vários marcadores de virulência e genes que codificam a resistência antimicrobiana estão localizados sobre os elementos móveis (LEAVIS et al., 2004; SHANKAR; BAGHDAYAN; GILMORE, 2002) e podem ser transferidos entre si e entre outras bactérias (COBURN et al., 2007; WERNER et al., 2008). As estratégias de vigilância para limitar a propagação do VRE são necessárias em todos os hospitais.

## 7 CONCLUSÃO

O estudo de caracterização de enterococos resistentes à vancomicina (VRE) isolados de pacientes dos hospitais da grande Vitória, no período de janeiro de 2011 a janeiro de 2012, permite-nos concluir que:

- *E. faecium* foi a espécie predominante nas amostras de VRE analisadas no estudo.
- As amostras analisadas apresentavam um perfil de multirresistência aos antimicrobianos utilizados como opção terapêutica.
- Os resultados de elevada sensibilidade sugere a linezolida como drogas de escolha para tratamento de infecções por este agente.
- O estudo demonstrou que o principal mecanismo de resistência aos glicopeptídeos se deve a presença do gene *vanA*, observado em todas as amostras de VRE isoladas.
- As amostras de *E. faecalis* apresentaram altas frequências dos genes de virulência.
- As amostras de *E. faecium*s apresentaram baixas frequências para os genes de virulência *efaA*, *gelE*, *agg* e *ace*.
- As amostras de *E. faecalis* apresentaram altas frequências do gene de virulência *esp*.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITCHISON, E. J. et al. Serodiagnosis of *Streptococcus faecalis* endocarditis by immunoblotting of surface protein antigens. **Journal of clinical microbiology**, v. 25, n. 2, p. 211-5, fev. 1987.
- ARTHUR, M. et al. Requirement of the VanY and VanX D , D -peptidases for glycopeptide resistance in enterococci. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 819-830, 1998.
- ASLANGUL, E. et al. Relationship between the Level of Acquired Resistance to Gentamicin and Synergism with Amoxicillin in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4144-4148, 2005.
- ASSADIAN, O. et al. Prevalence of Vancomycin-Resistant Enterococci colonization and its risk factors in chronic hemodialysis patients in Shiraz , Iran. **BMC**, v. 7, n. 52, p. 1-5, 2007.
- BALDASSARRI, L. et al. Variant esp gene in *Enterococcus faecium*. **The Lancet**, v. 357, p. 1802, 2001.
- BALDASSARRI, L. et al. Analysis of virulence factors in cases of enterococcal endocarditis. **Clinical Microbiology Infectious**, v. 10, p. 1006-1008, 2004.
- BHAVNANI, S. M. et al. A nationwide , multicenter , case-control study comparing risk factors , treatment , and outcome for vancomycin-resistant and -susceptible enterococcal bacteremia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 36, p. 145-158, 2000.
- BIEDENBACH, D. J.; MOET, G. J.; JONES, R. N. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997 – 2002). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 50, p. 59-69, 2004.
- BILLSTRÖM, H. et al. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 374-377, 2008.
- BODNAR, U. R. et al. Use of In-House Studies of Molecular Epidemiology and Full Species Identification for Controlling Spread of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* Isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2129-2132, 1996.
- BOISIVON, A.; THIBAUT, M.; LECLERQ, R. Colonization by vancomycin-resistant *enterococci* of the intestinal tract of patients in intensive care units from French general hospitals. **Clinical Microbiology Infection**, v. 3, p. 175-179, 1997.
- BONTEN, M J.; WILLEMS, R.; WEINSTEIN, R. A. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here and where do they come from? **Lancet Infectious Diseases**, v. 1, p. 314-325, 2001.

BOOTH, M. C. et al. Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. **Molecular Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 1175-1184, 1996.

BUSANI, L. et al. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and -resistant enterococci isolated in Italy from raw meat products , farm animals , and human infections. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 17-22, 2004.

CAIAFFA FILHO, H. H. et al. Molecular Characterization of Van Genes Found in Vancomycin-Resistant *Enterococcus* spp . Isolated from Hospital das Clínicas, FMUSP, São Paulo, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, p. 173-174, 2003.

CAMARGO, I. L. B. C. et al. *Enterococcus gallinarum* carrying the vanA gene cluster: first report in Brazil. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 37, p. 1669-1671, nov. 2004.

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, p. 513-519, 2005.

CARNIOL, K.; GILMORE, M. S. Signal Transduction , Quorum-Sensing , and Extracellular Protease Activity in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 24, p. 8161-8163, 2004.

CATTOIR, V.; LECLERCQ, R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1-12, 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 to June 2002, issued August 2002. **American Journal Infection Control**, v. 30, p. 458-475, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Recommendations for preventing the spread of Vancomycin resistance: recommendations of the Hospital Infection Control Practices Advisory, 2006.

CHANG, P. C. et. al. In vitro synergy of baicalein and gentamicin against vancomycin-resistant *Enterococcus*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 40, p.56-61, 2007.

CEREDA, R. F. et al. MOLECULAR TYPING AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF VANCOMYCIN-RESISTANT *ENTEROCOCCUS FAECIUM* IN BRAZIL. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 23, n. 1, p. 19-22, 2002.

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C. G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 4, p. 686-707, out. 2000.

CHIVERS, L. S. et al. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. **Journal of Hospital Infection**, v. 53, p. 159-171, 2003.

CHOW, J. W. et al. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 37, n. 11, p. 2474-7, nov. 1993.

CLSI. Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 23, n. 1, p. 1-58, 2003.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 32, n. 3, p. 1-184, 2013.

COBURN, P. S. et al. Horizontal transfer of virulence genes encoded on the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. **Molecular Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 530-544, 2007.

COHEN, M. L. Epidemiology of Drug Resistance: Implications for a Post-Antimicrobial Era. **Science**, v. 257, p. 1050-1055, 1992.

COLLINS, L. A. et al. In Vitro Activity of RP59500, an Injectable Streptogramin Antibiotic, against Vancomycin-Resistant Gram-Positive Organisms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 37, n. 3, p. 598-601, 1993.

COQUE, T. M. et al. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. **Journal Infectious Disease**, v. 171, n. 5, p. 1223-1229, 1995.

COQUE, T. M. High occurrence of *esp* among ampicillin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* clones from hospitalized patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 1035-1038, 18 nov. 2002.

CORSO, A. C. et al. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Argentina. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 11, p. 69-75, 2007.

COURVALIN, P. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 42, p. 25-34, 2006.

COURVALIN, P.; ARTHURA, M. Genetics and Mechanisms of Glycopeptide Resistance in Enterococci. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 37, n. 8, p. 1563-1571, 1993.

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.

- DALLA COSTA, L. M. et al. Characterization of a divergent vanD-type resistance element from the first glycopeptide-resistant strain of *Enterococcus faecium* isolated in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 12, p. 3444-6, dez. 2000.
- DAROUICHE, R. O. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. **Clinical infectious diseases** □: **an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 33, n. 9, p. 1567-72, 1 nov. 2001.
- DEPARDIEU, F.; PERICHON, B.; COURVALIN, P. Detection of the van Alphabet and Identification of Enterococci and Staphylococci at the Species Level by Multiplex PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5857-5860, 2004.
- DEPARDIEU, F.; REYNOLDS, P. E.; COURVALIN, P. VanD-Type Vancomycin-Resistant. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 7-18, 2003.
- DESAI, L. M. et. al. Prevalence, identification and distribution of various species of enterococci isolated from clinical specimens with special reference to urinary tract infection in catheterized patients. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 19, n. 3, p.132-173, 2001.
- DESHPANDE, L. M. et al. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe □: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, p. 163-170, 2007.
- DUPRE, I. et al. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 491-498, 1 jun. 2003.
- 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 Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 4, p. 195-198, 2008.
- D'AZEVEDO, P. A.; DIAS, C. A. G.; TEIXEIRA, L. M. GENETIC DIVERSITY AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF ENTEROCOCCAL ISOLATES FROM SOUTHERN REGION OF BRAZIL. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 1, p. 11-16, 2006.
- EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. v. 67, n. 4, p. 1628-1635, 2001.
- EATON, T. J.; GASSON, M. J. A variant enterococcal surface protein esp<sub>fm</sub> in *Enterococcus faecium*, distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. **FEMS Microbiology Lett**, v. 216, n. 2, p. 269-275, 2002.
- ECKSTEIN, B. C. et al. Reduction of *Clostridium Difficile* and vancomycin-resistant *Enterococcus* contamination of environmental surfaces after an intervention to improve cleaning methods. **BMC infectious diseases**, v. 7, p. 61, jan. 2007.

ELSNER, H. et al. Virulence Factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Blood Culture Isolates. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 19, p. 39-42, 2000.

EVERS, S.; COURVALIN, P. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS(B)-VanR (B) two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 5, p. 1302-9, mar. 1996.

FACKLAM, R. R.; COLLINS, M. D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. **Journal of clinical microbiology**, v. 27, n. 4, p. 731-4, abr. 1989.

FALK, P. et al. Outbreak of Vancomycin- Resistant Enterococci in a Burn Unit. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 21, n. 9, p. 575-582, 2000.

FURTADO, G. H. C. et al. Incidence of vancomycin-resistant *Enterococcus* at a university hospital in Brazil. **Revistas Saúde Pública**, v. 39, n. 1, p. 1-5, 2005.

GALLI, D.; LOTTSPREICH, F.; WIRTH, R. Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pherormone plasmid pAD1. **Molecular Microbiology**, v. 4, p. 895-904, 1990.

GARCIA-MIGURA, L.; LIEBANA, E.; JENSEN, L. B. Transposon characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) and dissemination of resistance associated with transferable plasmids. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 263-268, 2007.

GARDNER, J. S. et al. CDC definitions for nosocomial infections , 1998. **American Journal Infection Control**, v. 16, n. 3, p. 128-140, 1988.

GORDTS, B. et al. Vancomycin-Resistant Enterococci Colonizing the Intestinal Tracts of Hospitalized Patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 11, p. 2842-2846, 1995.

GOULD, C. V. et al. Chloramphenicol Resistance in Vancomycin-Resistant Enterococcal Bacteremia: Impact of Prior Fluoroquinolone Use? **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 25, n. 2, p. 138-145, 2004.

GUTSCHIK, E.; MOOLER, S.; CHRISTENSEN, N. Experimental endocarditis in rabbits. 3. Significance of the proteolytic capacity of the infecting strains of *Streptococcus faecalis*. *Acta Pathology Microbiology Immunology Scand B*, v. 87, n. 6, p. 353-362, 1979.

HALLGREN, A. et al. Molecular detection of aggregation substance , enterococcal surface protein , and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E . faecium* of clinical origin. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 299, p. 323-332, 2009.

HÖRNER, R. et al. Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria Antimicrobial susceptibility among

isolates of *Enterococcus* from Hospital Universitário de Santa Maria. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial**, n. 38, p. 391-395, 2005.

HYNES, W. L.; WALTON, S. L. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. **FEMS Microbiology Lett**, v. 183, p. 201-207, 2000.

JACKSON, C. R.; FEDORKA-CRAY, P. J.; BARRETT, J. B. Use of a Genus- and Species-Specific Multiplex PCR for Identification of Enterococci. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3558-3565, 2004.

JOYANES, P. et al. In vitro adherence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* to plastic biomaterials. **Clinical Microbiology Infection**, v. 6, p. 382-386, 1999.

KAINER, M. A et al. Response to emerging infection leading to outbreak of linezolid-resistant enterococci. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 7, p. 1024-30, jul. 2007.

KIRST, H. A.; THOMPSON, D. G.; THALIA, N. I. Historical Yearly Usage of Vancomycin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1303-1304, 1998.

KOCH, S. et al. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. **Vaccine**, v. 22, p. 822-830, 2004.

KOLAR, M. et al. The influence of antibiotic use on the occurrence of vancomycin-resistant enterococci. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 31, p. 67-72, 2006.

KRISTICH, C. J. et al. Esp-Independent Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis*. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 1, p. 154-163, 2004.

KURIYAMA, T. et al. Molecular characterization of clinical and environmental isolates of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from a teaching hospital in Wales. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 821-827, 2003.

LEAVIS, H. et al. A Novel Putative Enterococcal Pathogenicity Island Linked to the esp Virulence Gene of *Enterococcus faecium* and Associated with Epidemicity. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 3, p. 672-682, 2004.

LEAVIS, H. L. et al. Epidemic and Nonepidemic Multidrug-Resistant *Enterococcus faecium*. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 9, p. 1108-1115, 2003.

LECLERCQ, L. et al. Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptide. **Clinical Infectious Disease**, v. 15, p.499-501, 1992.

LITTVIK, A. M. et al. Colonization with vancomycin-resistant *enterococci* (VRE) in intensive care unit patients in Cordoba City, Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 38, p. 28-30, 2006.

LIVORNESE, L. L. JR. et al. Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. **Annals of Internal Medicine**, v. 117, p. 112-116, 1992.

LOW, D. E. et al. Clinical Prevalence, Antimicrobial Susceptibility, and Geographic Resistance Patterns of Enterococci: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 – 1999. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 133-145, 2001.

LOW, Y. L. et al. Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 113-119, 1 fev. 2003.

LOWE, A M.; LAMBERT, P. A; SMITH, A W. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. **Infection and immunity**, v. 63, n. 2, p. 703-6, fev. 1995.

MALANI, P. N. et al. Molecular analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* from Michigan hospitals during a 10 year period. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 841-843, 2002.

MANIATIS, A. N. et al. Dissemination of Clonally Unrelated Erythromycin- and Isolates in a Tertiary Greek Hospital. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4571-4574, 2001.

MARTINEZ, J. A. et al. Role of Environmental Contamination as a Risk Factor for Acquisition of Vancomycin-Resistant Enterococci in Patients Treated in a Medical Intensive Care Unit. **American Medical Association**, v. 163, p. 1905-1912, 2003.

MARÍN, M. E. et al. First Report of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolated in Argentina. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, p. 235-236, 1998.

MERQUIOR, V. L. C. et al. Bacteraemia associated with a vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* strain harbouring both the *vanA* and *vanC1* genes. **Journal of medical microbiology**, v. 57, p. 244-245, fev. 2008.

MOELLERING, R. C. J. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. **Clinical Infectious Disease**, v. 14, p. 1173-1178, 1992.

MOELLERING, R. C. et al. The efficacy and safety of quinupristin/dalfopristin for the treatment of infections caused by vancomycin-resistant. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 251-261, 1999.

MOORE, W. E. C.; HOLDEMAN, L. V. Human Fecal Flora: The Normal Flora of 20 Japanese-Hawaiians. **American Society for Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 961-979, 1974.

MORETTI, M. L. et al. Clonal dissemination of VanA-type *faecalis* between hospitals of two cities located 100 km apart. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 37, p. 1339-1343, 2004.

MUNDY, L. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 4, p. 513-22, out. 2000.

MURRAY, B. E. The life and times of the Enterococcus. **Clinical microbiology reviews**, v. 3, n. 1, p. 46-65, jan. 1990.

MURRAY, B. E. Vancomycin-resistant enterococcal infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, p. 710-721, 2000.

NAKAYAMA, J.; KARIYAMA, R.; KUMON, H. Description of a 23 . 9-Kilobase Chromosomal Deletion Containing a Region Encoding *fsr* Genes Which Mainly Determines the Gelatinase-Negative Phenotype of Clinical Isolates of *Enterococcus faecalis* in Urine. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 6, p. 3152-3155, 2002.

NALLAPAREDDY, S. R.; WEINSTOCK, G. M.; MURRAY, B. E. Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by *Acm* , a new member of the MSCRAMM family. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1733-1747, 2003.

NEU, H. C. The Crisis in Antibiotic Resistance. **Science**, v. 257, p. 1064-1073, 1992.

NEVES, F. P. G. et al. Emergence of the *vanA* genotype among *Enterococcus gallinarum* isolates colonising the intestinal tract of patients in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 211-215, 2009.

NIEDERHAUSERN, S. et al. VanA-Type Vancomycin-Resistant Enterococci in Equine and Swine Rectal Swabs and in Human Clinical Samples. **Current Microbiology**, v. 55, p. 240-246, 2007.

NNIS. National Nosocomial Infections Surveillance ( NNIS ) System Report , Data Summary from January 1992-June 2001 , Issued August 2001. **American Journal Infection Control**, v. 29, n. 6, p. 404-421, 2001.

NNIS. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report , data summary from January 1992 through June 2004 , issued October 2004. **American Journal Infection Control**, v. 32, n. 8, p. 470-485, 2004.

NOBLE, C. J. Carriage of group D streptococci in the human bowel. **Journal of Clinical Pathology**, v. 31, p. 1182-1186, 1978.

NOSKIN, G.A. et. al. Recovery of vancomycin-resistant enterococci on fingertips and environmental surfaces. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 16, p. 577-581, 1995.

NOSKIN, G. A. et al. In Vitro Activities of Linezolid against Important Gram-Positive Bacterial Pathogens Including Vancomycin-Resistant Enterococci. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 8, p. 2059-2062, 1999.

- NOVAIS, C. et al. Diversity of Tn1546 and its role in the dissemination of vancomycin-resistant enterococci in Portugal. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 1001-1008, 2008.
- PALAZZO, I. C. V et al. Evaluation of clonality in enterococci isolated in Brazil carrying Tn1546 -like elements associated with vanA plasmids. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 258, p. 29-36, 2006.
- PANESSO, D. et al. First Characterization of a Cluster of VanA-Type Colombia. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 9, p. 961-965, 2002.
- PAPAPARASKEVAS, J. et al. Diversity among high-level aminoglycoside-resistant enterococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p. 277-283, 2000.
- PARTE, A. C. LPSN: **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <www.bacterio.net>. Acesso em 15 jul. 2013.
- ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu; 2005.
- PATEL, R. et al. In Vitro Activity of Linezolid against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and Penicillin-Resistant Streptococcus pneumoniae. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 34, p. 119-122, 1999.
- PATEL, R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 51 Suppl 3, p. iii13-21, jun. 2003.
- PATIN, L. A.; COURVALIN, P.; PERICHON, B. vanE Gene Cluster of Vancomycin-Resistant Enterococcus faecalis BM4405. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 23, p. 6457-6464, 2002.
- PATTERSON, J. E. et al. Molecular Epidemiology of P-Lactamase-Producing Enterococci. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 34, p. 302-305, 1990.
- PILLAI, S. K. et al. Prevalence of the fsr Locus in Enterococcus faecalis Infections. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2651-2652, 2002.
- POURSHAFIE, M. R. et al. Clonal heterogeneity of clinical isolates of vancomycin-resistant Enterococcus faecium with unique vanS. **Tropical Medicine and International Health**, v. 13, n. 5, p. 722-727, 2008.
- REIS, A. O. et al. In vitro Antimicrobial Activity of Linezolid Tested Against Vancomycin-Resistant Enterococci Isolated in Brazilian Hospitals. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, p. 243-251, 2001.
- RIBAS, R. M. et al. Vancomycin-Resistant Van A Phenotype Enterococcus faecalis: First Case in Minas Gerais State and Epidemiological Considerations. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 4, p. 439-440, 2007.

RICE, L. B. et al. A Potential Virulence Gene , hyl Efm , Predominates in Enterococcus faecium of Clinical Origin. **The Journal of infectious diseases**, v. 187, p. 508-512, 2003.

SALGADO, C. D. The risk of developing a vancomycin- resistant Enterococcus bloodstream infection for colonized patients. **Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology**, v. 36, n. 10, p. 5-8, 2008.

SANDOE, J. A. T. et al. Enterococcal intravascular catheter-related bloodstream infection: management and outcome of 61 consecutive cases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, p. 577-582, 2002.

SATAKE, S. et al. Detection of Vancomycin-Resistant Enterococci in Fecal Samples by PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 9, p. 2325-2330, 1997.

SCHEETZ, M. H. et al. The clinical impact of linezolid susceptibility reporting in patients with vancomycin-resistant enterococci. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 56, p. 407-413, 2006.

SCHEETZ, M. H. et al. Increasing Incidence of Linezolid-Intermediate or -Resistant , Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium Strains Parallels Increasing Linezolid Consumption. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2256-2259, 2008.

SCHUENCK, R. P. et al. Multiplex PCR assay to identify methicillin-resistant Staphylococcus haemolyticus. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, p. 431-435, 2008.

SEDGLEY, C. M.; LENNAN, S. I.; CLEWELL, D. B. Prevalence , phenotype and genotype of oral enterococci. **Oral Microbiology Immunology**, v. 19, p. 95-101, 2004.

SENO, Y. et al. Clinical implications of biofilm formation by Enterococcus faecalis in the urinary tract. **Acta Medica Okayama**, v. 59, n. 3, p. 79-87, 2005.

SHANKAR, N. et al. Role of Enterococcus faecalis Surface Protein Esp in the Pathogenesis of Ascending Urinary Tract Infection. **Infection and immunity**, v. 69, n. 7, p. 4366-4372, 2001.

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

SHANKAR, V. et al. Infection-Derived Enterococcus faecalis Strains Are Enriched in esp , a Gene Encoding a Novel Surface Protein. **Infection and immunity**, v. 67, n. 1, p. 193-200, 1999.

SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 215-224, 2002.

SIEGEL, J. D. et al. 2007 guideline for isolation precautions□: preventing transmission of infectious agents in health care settings. **American Journal Infection Control**, v. 35, n. 10, p. 65-164, 2007.

SLAUGHTER, S. et. al. A comparison of the effect of universal use of gloves and gowns with that of glove use alone on acquisition of vancomycin-resistant enterococci in a medical intensive care unit. **Annals of Internal Medicine**, v. 125, p. 448-456, 1996.

STOBBERINGH, E. et al. Enterococci with Glycopeptide Resistance in Turkeys , Turkey Farmers , Turkey Slaughterers , and (Sub) Urban Residents in the South of The Netherlands□: Evidence for Transmission of Vancomycin Resistance from Animals to Humans? **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 9, p. 2215-2221, 1999.

SU, Y. A. N. A. et al. Nucleotide Sequence of the Gelatinase Gene ( *gelE* ) from *Enterococcus faecalis* subsp . *liquefaciens*. **Infection and immunity**, v. 59, n. 1, p. 415-420, 1991.

TEIXEIRA, C. I. A. M. et al. Correlation between Phenotypic Characteristics and DNA Relatedness within *Enterococcus faecium* Strains. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 6, p. 1520-1523, 1995.

TENOVER, F. C.; MCDONALD, L. C. Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci□: epidemiology and control. **Current Opinison in Infectious Disease**, v. 18, p. 300-305, 2005.

TITZE-DE-ALMEIDA, R. et al. Molecular Epidemiology and Antimicrobial Susceptibility of Enterococci Recovered from Brazilian Intensive Care Units. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 197-205, 2004.

TOGNERI, A. M. et al. Clinical and epidemiologic analysis of intestinal tract colonization with vancomycin-resistant *enterococci* in an intensive care unit. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 37, p. 26-33, 2005.

TOLEDO-ARANA, A. et al. The Enterococcal Surface Protein , *Esp* , Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4538-4545, 2001.

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

TRESOLDI, A. T. et al. Low Prevalence of Vancomycin Resistant Enterococci Colonization in Intensive Care Patients in a Brazilian Teaching Hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 239-241, 2006.

TYRRELL, G. J. et al. Species Identification of Enterococci via Intergenic Ribosomal PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 5, p. 1054-1060, 1997.

- TYRRELL, G. J. et al. *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *enterococcus pallens* sp. nov. Isolate from Human Clinical Specimens. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, p. 1140-1145, 2002.
- UTTLEY, A. H. et al. Vancomycin-resistant enterococci. **The Lancet**, v. 1, p. 57–58, 1988.
- VAN DEN BOGAARD, A. E.; JENSEN, L. B.; STOBBERINGH, E. E. Vancomycin-Resistant Enterococci in Turkey and Farmers. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 21, p. 1558-1559, 1997.
- VAN DEN BRAAK, N. et al. Prevalence and Determinants of Fecal Colonization With Vancomycin-Resistant *Enterococcus* in Hospitalized Patients in The Netherlands. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 21, n. 8, p. 520-524, 2000.
- VERGIS, E. N. et al. Association between the Presence of Enterococcal Virulence Factors Gelatinase , Hemolysin , and Enterococcal Surface Protein and Mortality among Patients with Bacteremia Due to *Enterococcus faecalis*. **Clinical infectious diseases**, v. 35, p. 570-575, 2002.
- VILELA, M. A. et al. Identification and molecular characterization of Van A-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Northeast of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7, p. 716-719, 2006.
- WEBB, G. F. et al. A model of antibiotic-resistant bacterial epidemics in hospitals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 37, p. 13343-13348, 2005.
- WELLS, C.L. et al. Stool carriage, clinical isolation, and mortality during an outbreak of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized medical and/or surgical patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 21, p. 45-50, 1995.
- WERNER, G. et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. **Eurosurveillance**, v. 13, n. 47, p. 1-11, 2008.
- WILLEMS, R. J. L. et al. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. **The Lancet**, v. 357, p. 853-855, 2001.
- WILLIAMS, J. D. et al. Comparative in vitro activity of quinupristin/dalfopristin against *Enterococcus* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 39, p. 41-46, 1997.
- 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, 9 set. 2008.
- WOODFORD, N. et al. Current Perspectives on Glycopeptide Resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 4, p. 585-615, 1995.

WOODFORD, N.; SOLTANI, M.; HARDY, K. J. Frequency of esp in *Enterococcus faecium* isolates. **The Lancet**, v. 358, p. 584, 2001.

WORTH, L. J. et al. Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* vanB: clonal distribution, prevalence and significance of esp and hyl in Australian patients with haematological disorders. **Journal of Hospital Infection**, v. 68, p. 137-144, 2008.

XU, X. et al. vanM, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4643-4647, nov. 2010.

YAZGI, H. et al. A comparison of high-level aminoglycoside resistance in vancomycin-sensitive and vancomycin-resistant *Enterococcus* species. **The Journal of International Medical Research**, v. 30, n. 529-534, 2002.

YOON, Y. K. et al. Epidemiology and Control of an Outbreak of Vancomycin-Resistant *Enterococci* in the Intensive Care Units. **Yonsei Medical Journal**, v. 50, n. 5, p. 637-643, 2009.

ZANELLA, R. C. et al. First confirmed case of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with vanA phenotype from Brazil: isolation from a meningitis case in São Paulo. **Microbiology Drug Resistance**, v. 5, n. 2, p. 159-162, 1999.

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.

ZARRILLI, R. et al. Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 827-835, 2005.

ZHANEL, G. G. et al. Antibiotic activity against urinary tract infection (UTI) isolates of vancomycin-resistant enterococci (VRE): results from the 2002 North American Vancomycin Resistant Enterococci Susceptibility Study (NAVRESS). **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 382-388, set. 2003.

ZHENG, B. et al. Molecular Characterization of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Mainland China. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2813-2818, 2007.