



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GILSELENA KERBAUY LOPES

***ENTEROCOCCUS FAECIUM* DEPENDENTE DE
VANCOMICINA:
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA**

GILSELENA KERBAUY LOPES

***ENTEROCOCCUS FAECIUM* DEPENDENTE DE
VANCOMICINA:
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sueli Fumie Yamada Ogatta

Londrina
2010

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L881e Lopes, Gilselena Kerbauy.
Enterococcus faecium dependente de vancomicina :
caracterização fenotípica e genotípica / Gilselena Kerbauy Lopes. –
Londrina, 2010.
73 f. : il.

Orientador: Sueli Fumie Yamada Ogatta.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual
de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Virulência (Microbiologia) – Teses. 2. Genética bacteriana –
Teses. 3. Enterococcus – Teses. 4. Drogas – Resistência em
microorganismos – Teses. I. Ogatta, Sueli Fumie Yamada. II.
Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Micro-biologia. III. Título.

CDU 579.86

GILSELENA KERBAUY LOPES

***Enterococcus faecium* DEPENDENTE DE VANCOMICINA:
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Marcia Regina Eches Perugini
UEL – Londrina – PR

Londrina, 23 de julho de 2010.

Aos meus pais, Dinho e Gilvana,
à minha avó, Leilah,
ao meu irmão, Gabriel.

“Somos do tamanho dos nossos sonhos”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo carinho e amor;

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Sueli Fumie Yamada Ogatta, por tudo o que pacientemente me ensinou, pela compreensão, apoio e pelo exemplo que se tornou em minha vida;

À Prof^a. Dra. Marcia Regina Eches Perugini, por ter participado ativamente do meu crescimento profissional;

À Prof^a. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni, pela disponibilidade em ajudar em todas as etapas do experimento;

À enfermeira Dra. Renata Aparecida Belei por todas as oportunidades que me proporcionou e pela amizade;

Ao coordenador Marco Antonio Nogueira e aos professores do curso pelo precioso empenho e sabedoria;

Aos professores Dra. Renata Katsuko Takayama Kobayashi e Prof. Dr Gerson Nakazato pela importante contribuição;

Aos funcionários do laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos Ediel e Jussevania, pelo imenso apoio e amizade;

A toda equipe da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do Hospital Universitário (HU) de Londrina por todos os anos de boa convivência, incentivo e apoio;

Aos docentes do Departamento de Enfermagem da UEL pelo apoio, carinho e convívio enriquecedor.

Às colegas do laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos pela colaboração e boa convivência;

Aos colegas de turma pela alegre amizade, e inesquecíveis bons momentos;

A todos que colaboraram para a conclusão deste trabalho.

LOPES, G.K. ***Enterococcus faecium* dependente de vancomicina: caracterização fenotípica e genotípica.** 2010. 73 f. Dissertação de Mestrado em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

RESUMO

A vancomicina, um antimicrobiano de amplo espectro, é indicada para tratamento de infecções graves. *Enterococcus* spp resistente a este glicopeptídeo, com predomínio de *Enterococcus faecium* estão entre os principais agentes etiológicos de infecções relacionadas aos serviços de saúde. Além disso, enterococos dependente de vancomicina para o crescimento foram isolados de amostras clínicas. Neste trabalho *Enterococcus faecium vanA*, que cresce apenas na presença de vancomicina (VDEfm-UEL), foi isolado de fezes de uma paciente em antibioticoterapia endovenosa com vancomicina para tratamento de sepse por *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina. VDEfm-UEL também apresentou resistência a ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, eritromicina, levofloxacina, penicilina, rifampicina e teicoplanina. Além disso os genes que codificaram fatores associados a virulência: *efaA*, *gelE* e *esp*, foram detectados no genoma da bactéria. A dependência de vancomicina parece estar associada a mutações em D-Ala-D-Ala ligase (Ddl), importante enzima com função na síntese da parede celular. A inserção de uma adenosina mono fosfatada na sequência genética de *ddl*, resultou na formação de um códon terminador da tradução prematuro. Este é o primeiro relato de VDE *E. faecium* isolado em um Hospital Universitário no Brasil.

Palavras-chave: *Enterococcus faecium*. Vancomicina. Dependência. Genótipo *vanA*. Fatores de virulência.

LOPES, G.K. **Vancomycin dependent *Enterococcus faecium*: phenotypic and genotypic characterization.** 2010. 73 p. Dissertation of the Mastership in Microbiology, Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

ABSTRACT

Vancomycin, a broad-spectrum antimicrobial, is indicated for treatment of serious infections. Glycopeptide resistant enterococi, predominantly *Enterococcus faecium*, are among the main etiological agents of infections related to health care associated services. Currently, some reports have identified clinical isolates of vancomycin dependent enterococci. In this study *Enterococcus faecium vanA* which grow only in the presence of vancomycin (VDE_{fm}-UEL) was isolated from the feces of a patient receiving intravenous vancomycin therapy for methicilin resistant *Staphylococcus aureus*. VDE_{fm}-UEL was also shown to be resistant to ampicillin, ciprofloxacin, chloramphenicol, erythromycin, levofloxacin, penicillin, rifampicin and teicoplanin. It also harbored the putative virulence genes *efaA*, *gelE* and *esp*. The vancomycin dependence seems to be associated with mutations in the D-Ala-D-Ala ligase, an important enzyme with function in cell wall synthesis. An insertion of one adenosine at the *ddl* gene sequence resulting in a frame-shift mutation, which monophosphate a premature stop codon. This is the first report of VDE isolation at the University Hospital in Brazil.

Keywords: *Enterococcus faecium*. Vancomycin. Dependence. *VanA* genotype. Virulence factors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Biossíntese do peptidoglicano e mecanismo de ação da vancomicina	21
Figura 2 – Distribuição global de <i>E. faecium</i> CC17	24
Figura 3 – Mecanismos de resistência aos glicopeptídeos do tipo VanA	30
Figura 4 – Ligação da vancomicina ao sítio alvo da parede celular	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características de resistência aos agentes antimicrobianos em espécies de <i>Enterococcus</i>	23
Tabela 2 – Características dos antimicrobianos utilizados para <i>Enterococcus</i> resistente a vancomicina	28
Tabela 3 – Fenótipos de resistência a vancomicina em espécies de <i>Enterococcus</i>	29
Tabela 4 – Isolados clínicos de <i>Enterococcus</i> dependente de vancomicina	35

LISTA DE ABREVIATURAS

CC17	Complexo Clonal 17
CDC	<i>Centers For Disease Control and Prevention</i>
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
D-Ala	Dextrógiro Alanina
L-Ala	Levógiro Alanina
MDRO	<i>Multidrug-Resistant Organisms</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MR	Microrganismos Multirresistente
MRSA	<i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i>
ORF	<i>Open Reading Frames</i>
PAI	<i>Pathogenicity Islands</i>
VDE	<i>Vancomycin Dependent Enterococci</i>
VDEfm	<i>Vancomycin Dependent Enterococcus faecium</i>
VRE	<i>Vancomycin Resistance Enterococi</i>
VRSA	<i>Vancomycin Resistance S. aureus</i>
UEL	Universidade Estadual de Londrina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS	14
2.2	DETERMINANTES DE VIRULÊNCIA.....	15
2.3	EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES ENTEROCÓCICAS	20
2.4	RESISTÊNCIA A VANCOMICINA	24
2.5	DEPENDÊNCIA DE VANCOMICINA	33
3	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVO GERAL.....	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
	REFERÊNCIAS	37
4	TRABALHO CIENTÍFICO	54
	INTRODUCTION	54
	Case Report	55
	MATERIALS AND METHODS	56
	Hospital, Surveillance and Microorganism Isolation	56
	Phenotypic Characterization.....	57
	Genotypic Characterization	57
	Cloning and Sequencing of the <i>ddl</i> gene.....	58
	RESULTS AND DISCUSSION	58
	ACKNOWLEDGMENTS	61
	REFERENCES	63
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
	ANEXOS	69
	ANEXO I – dados complementares	70
	ANEXO II – Manuscrito em fase de redação.....	71

1 INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos relacionados aos procedimentos invasivos, diagnósticos e terapêuticos, têm aumentado a expectativa de vida de pacientes hospitalizados e conseqüentemente, a suscetibilidade às infecções associadas aos serviços de saúde. Este importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo constitui uma das principais causas de morbimortalidade associada às pessoas que se submetem a procedimentos clínicos de assistência à saúde.

A intensa pressão seletiva decorrente do uso indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro para controle das infecções induz a evolução e disseminação de microrganismos altamente resistentes aos mesmos, os multirresistentes (MR) ou organismos resistentes a múltiplos antimicrobianos (*Multidrug-Resistant Organisms* - MDRO). Entretanto, não comumente, alguns estudos têm descrito microrganismos completamente adaptados a este ambiente de pressão antimicrobiana, mostrando que os mesmos não apenas crescem na presença de altas concentrações de antimicrobianos como também utilizam estas substâncias como fator de crescimento (BERT et al., 2009).

A resistência a glicopeptídeos observada em *Enterococcus* spp tornou-se um problema cada vez mais preocupante na prática clínica. De acordo com dados disponibilizados pelo CDC no *Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers For Disease Control and Prevention, 2006- 2007* (HIDRON et al., 2008), *Enterococcus* spp. foi o terceiro colocado na classificação dos patógenos isolados dos casos de infecção associada aos serviços de saúde, respondendo por 12% de incidência, e destes, 86,9% mostraram resistência a vancomicina.

A vancomicina é indicada para o tratamento de infecções graves como endocardites, osteomielites e sepses (MURRAY, 2000; CETNIKAWA; FALK; MAYHAL, 2000; OPREA et al., 2004). Este glicopeptídeo foi isolado pela primeira vez em 1956, extraído de *Streptomyces orientalis*, e a partir de 1958 (NAILOR; SOBEL 2009) seu uso clínico foi amplamente difundido. Resistência a esse antimicrobiano começou a ser relatada em 1986, na Europa (LECLERCQ et al., 1988; UTLEY et al., 1988) e posteriormente em diversas regiões do mundo. Há evidências de que *Enterococcus* spp. utilizam esse agente antimicrobiano como um fator de crescimento (FRAIMOW et al., 1994). Este fenômeno foi observado em

Enterococos isolados de processos infecciosos ou de colonização em pacientes tratados por longos períodos com vancomicina. Esses isolados foram denominados enterococos dependente de vancomicina (*vancomycin dependent enterococci* – VDE). Os impactos clínicos desse fenômeno ainda são incertos, entretanto é importante ressaltar que os sistemas de controle de infecções associadas a serviços de saúde devem ser capazes de identificar esse microrganismo. Além disso, a utilização adequada dos antimicrobianos deve ser uma prática corrente nesses ambientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

Espécies do gênero *Enterococcus* são cocos Gram-positivos pertencentes à família *Streptococcaceae* que se apresentam aos pares, cadeias curtas ou células isoladas (NOBLE, 1978). Classificam-se como anaeróbios facultativos, catalase-negativa, e podem ser α , β , ou não-hemolíticos (SCHLEIFER; KILPPER-BÄLZ, 1984; MURRAY, 1990). Caracterizam-se por crescer em pH 9,6, em meio líquido suplementado com NaCl 6,5% e por sobreviver a 60 °C por 30 minutos (SHERMAN, 1937). Sua temperatura ótima de crescimento é 35 °C (FACKLAM; COLLINS, 1989). São capazes de hidrolisar a esculina na presença de bile. Diferenciam-se de outras bactérias Gram-positivas pela produção das enzimas leucina aminopeptidase (LAP-ase) e pirrolidonil-aminopeptidase (PYR-ase), reação positiva com o antígeno do grupo D de Lancefield e reação negativa com o antígeno do grupo A de Lancefield (MURRAY, 1990).

Algumas espécies desse gênero são móveis e/ou se caracterizam pela presença de colônias com pigmentação amarela (COLLINS et al., 1984; SCHLEIFER; KILPPER-BÄLZ, 1984; COLLINS; FARROW; JONES, 1986). Enterococos produzem bacteriocinas (enterocinas), que são pequenos peptídeos catiônicos e anfipáticos com atividade antimicrobiana sobre várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (CLEVELAND et al., 2001).

O gênero *Enterococcus* compreende vinte e oito espécies diferentes: *E. avium*, *E. asini*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hirae*, *E. malodratius*, *E. moraviensis*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. saccharolyticus*, *E. saccharominimus*, *E. solitarius*, *E. sulfureus*, *E. villorum*. Sua filogenia baseia-se na análise das sequências nucleotídicas do gene que codifica para RNA ribossomal 16S e hibridação de DNA-DNA genômico (SCHLEIFER; KLIPPER-BALZ, 1984; SCHABERG; ZERVOS, 1986; MURRAY, 1990; KONEMAN et al., 2001).

Enterococos fazem parte da microbiota do trato gastrintestinal e genital feminino de seres humanos e de vários outros mamíferos e pássaros. Esses

microorganismos são encontrados também no solo, água e alimentos (SGHIR et al., 2000; TANNOCK; COOK, 2001; AARESTRUP et al., 2002).

No âmbito da assistência a saúde, dentre os agentes etiológicos de infecções, enterococo tem emergido como um importante patógeno, tendo em vista sua adaptação a situações ambientais adversas, resistência intrínseca e extrínseca aos antimicrobianos e capacidade para adquirir e transmitir plasmídeos e transposons contendo sequências gênicas que conferem resistência antimicrobiana (GIRIDHARA UPADHYAYA; RAVIKUMAR; UMAPATHY, 2009; FRAM et al., 2010). Entre as espécies de *Enterococcus*, *E. faecalis* e *E. faecium* são predominantes nas infecções relacionadas à assistência a saúde. Dados globais indicam que esses microrganismos estão entre os principais agentes causadores de endocardite, bacteremias, infecções de feridas, sítio cirúrgico e trato urinário no âmbito hospitalar principalmente nos EUA e Europa (TANNOCK; COOK, 2001; OZOROWSKI et al., 2009).

2.2 DETERMINANTES DE VIRULÊNCIA

Aquisição de determinantes de virulência é necessária para sobrevivência do microrganismo em um ambiente altamente competitivo (MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000; SHANKAR BAGHDAYAN; GILMORE, 2002; VERGIS et al., 2002), além de favorecer a emergência de *Enterococcus* spp. como agente causador de importantes infecções relacionadas aos serviços de saúde (GIRIDHARA UPADHYAYA; RAVIKUMAR; UMAPATHY, 2009; VAN SCHAIK, et al., 2010).

O sequenciamento dos genomas de *E. faecium* e *E. faecalis*, realizado respectivamente pelo *Institute for Genomic Research* e *Joint Genomic Institute of the Department of Energy*, Estados Unidos da América, auxiliou na compreensão dos mecanismos de virulência desses microrganismos (GIRIDHARA UPADHYAYA; RAVIKUMAR; UMAPATHY, 2009).

O genoma da cepa *E. faecalis* V583, contém um total de 3.337 fases abertas de leitura (ORFs – *open reading frames*) sendo 3.182 presentes no cromossoma, 74 no plasmídeo pTEF1, 62 no plasmídeo pTEF2 e 19 no plasmídeo pTEF3. Aproximadamente 55,9% dessas ORFs (1.829) apresentam similaridade com proteínas com funções conhecidas e 6,7% (225) com funções desconhecidas,

24% (747) apresentaram homologia com proteínas hipotéticas conservadas, e 15,8% (526) não apresentaram homologia com sequências nucleotídicas depositadas em banco de dados. Uma descoberta importante foi que 24,6% do genoma são compostos por sequências móveis e/ou adquiridas, incluindo regiões de integração de fagos, sequências de inserção, transposons conjugativos, ilhas de patogenicidade e plasmídeos integrativos (PAULSEN et al., 2003).

Os fatores de virulência de determinadas bactérias são codificados por sequências gênicas localizadas em regiões específicas do genoma, denominadas ilhas de patogenicidade (*Pathogenicity Islands* - PAI) (HACKER; KAPER, 2000).

Em comum, as PAIs apresentam as seguintes características: a) compreendem grandes regiões do genoma (10 a 200 kb); b) apresentam conteúdo G+C menor quando comparado com outras regiões do genoma; c) estão presentes no genoma de cepas patogênicas, mas ausentes em cepas não patogênicas da mesma espécie ou relacionadas; d) são compostos por um ou mais genes de virulência; e) são flanqueadas por sequências repetidas diretas; f) frequentemente estão associadas aos genes de tRNA, que servem de sítios de integração para DNA exógeno; g) apresentam sequências que codificam fatores de mobilidade, tais como integrases, transposases e sequências de inserção; h) representam região de DNA instável, ou seja, pode ser deletada por meio das sequências de inserção ou das regiões repetidas diretas (HACKER; KAPER 2000).

A primeira descrição de uma PAI clássica em *Enterococcus* spp. ocorreu em 2002, resultado de pesquisa realizada por Shankar et al. em amostras de *E. faecalis* multirresistentes isolados de amostra clínica. Essa região do genoma apresenta aproximadamente 150 kb e contém 129 ORFs que codificam transposases e sequências reguladoras os quais controlam a transcrição de genes que codificam proteínas com importantes funções na expressão dos fatores de virulência.

Leavis et al. (2004) identificaram um grupo de seis genes ligados ao gene *esp* (Proteína de Superfície de enterococos) no genoma de *E. faecium*. Sequencialmente encontram-se os genes: *uve2*, que apresenta 42% de similaridade com fator sigma SpollG de *Bacillus subtilis*; *araC*, apresentando 61% de similaridade com o gene ortólogo de *E. faecalis*; *esp*, com 92% de similaridade com o gene ortólogo de *E. faecalis*; *nox*, que codifica uma NADH oxidase com 35% de

similaridade com o gene ortólogo de *E. faecalis*; *muramidase*, codifica uma enzima com papel importante durante o crescimento e divisão celular e apresenta 27% de similaridade com o gene ortólogo de *Streptococcus pyogenes*; ORF6 cuja sequência nucleotídica apresenta 33% de similaridade a um gene que codifica uma proteína hipotética em *Listeria monocytogenes*; *mdr*, que codifica uma bomba de efluxo de antimicrobianos e apresenta 45% de similaridade com o gene ortólogo de *Lactobacillus lactis*. Esta estrutura foi denominada de PAI, pelos autores, de acordo com as seguintes características: análises de *Southern blot* mostraram que isolados *esp*⁺ e *esp*⁻ estavam associados à presença ou ausência do cluster gênico, respectivamente; conteúdo G-C menor quando comparado com outras regiões do genoma, e que é característico de PAIs; presença de genes de virulência (*esp*, *nox* e *muramidase*); presença da PAI somente em isolados provenientes de infecção.

Como já mencionado, *E. faecalis* é a espécie mais prevalente em espécimes clínicas, entretanto, *E. faecium*, principalmente resistente a ampicilina e a vancomicina, está mais frequentemente associado com disseminação epidêmica nos hospitais. É possível que diferenças nas sequências das PAIs de *E. faecium* e *E. faecalis*, em adição ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, possam contribuir para essa diversidade epidemiológica. Visto que PAIs podem representar uma forma de evolução da virulência, gerando novas variantes patogênicas, é provável que a aquisição desta por *E. faecium* teve um papel importante na rápida emergência deste microrganismo como patógeno hospitalar (LEAVIS et al., 2004).

Várias moléculas que podem contribuir para a virulência de enterococos, sendo a maioria descrita para *E. faecalis*, são reportadas na literatura. Um fator de virulência associado a endocardite, denominado EfaA, foi obtido a partir do antígeno dominante de 37 kDa do soro de pacientes com endocardite infecciosa causada por *E. faecalis*. O gene que codifica este antígeno foi clonado, sequenciado e designado *efaA* (AITCHISON et al., 1987). A sequência de aminoácidos de EfaA apresenta homologia com proteínas de estreptococos com propriedades de adesinas (LOWE; LAMBERT; SMITH, 1995).

Uma adesina de ligação ao colágeno, expressa na superfície bacteriana foi identificada em *E. faecium* e denominada Acm. O gene *acm*, que codifica este fator de virulência é significativamente expresso em maior frequência nos isolados clínicos de infecção (NALLAPAREDDY; WEINSTOCK; MURRAY, 2003). A deleção desse gene elimina a capacidade de aderência da bactéria ao

colágeno (NALLAPAREDDY et al., 2006) e a colonização de válvula cardíaca de ratos experimentalmente infectados (NALLAPAREDDY et al., 2008) indicando sua participação no desenvolvimento de endocardites por Enterococos. Diferentemente de Acm, o antígeno secretado SagA de *E. faecium* é capaz de se ligar, além do colágeno, à fibronectina e laminina. Esta proteína parece ser essencial ao crescimento da bactéria (TENG et al., 2003).

O fator de agregação é uma proteína de superfície cuja expressão pelo gene *asa1*, carregado em um plasmídeo, é induzida por feromônios (GALLI; LOTTSPREICH; WIRTH, 1990; CLEWELL, 1993). *Asa1* promove a aglutinação entre os microrganismos, facilitando a transferência de plasmídeos durante a conjugação (KREFT et al., 1992; CLEWELL, 1993), além de aumentar a aderência bacteriana a células tubulares renais (KREFT et al., 1992) e cardíacas (GUZMAN et al., 1989).

A gelatinase, codificada pelo gene cromossomal *ge/E*, é uma protease extracelular capaz de hidrolisar colágeno, caseína, hemoglobina, gelatina e pequenos peptídeos (SU et al., 1991). Alguns trabalhos mostram que a gelatinase 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; PILAI et al., 2002).

Citolisina é uma proteína capaz de lisar células animais (BOOTH, 1996). Sua nomenclatura é variável de acordo com a ação específica para cada tipo de célula (GILMORE; SEGARRA; BOOTH, 1990). A produção de hemolisinas por *Enterococcus* spp tem sido apontada como fator de virulência em modelos animais e humanos (COBURN et al., 1999). A produção de citolisina parece contribuir significativamente para o aumento da severidade da endocardite (CHOW et al., 1993) da endoftalmite (JETT et al., 1992) em modelos animais, bem como para a severidade da doença enterocócica em humanos (IKE; HASHIMOTO; CLEWELL, 1987). O operon da citolisina, constituído por oito genes: *cy/R₁*, *cy/R₂*, *cy/L_L*, *cy/L_S*, *cy/M*, *cy/B*, *cy/A* e *cy/I* (COBURN; GILMORE, 2003), está presente em plasmídeo ou está integrado ao cromossomo bacteriano (JETT et al., 1992; GILMORE et al., 1994).

O gene cromossomal *hyl* descrito em *E. faecium* (RICE et al. 2003) apresenta homologia com hialuronidases previamente descritas em *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus* e *Streptococcus pneumoniae* (HYNES; WALTON, 2000), as quais parecem contribuir para a invasão da nasofaringe e este processo pode

preceder uma infecção do sistema nervoso central, e na patogênese da pneumonia pneumocócica em camundongos (BERRY; PATON, 2000).

Proteína de superfície de enterococos (Esp) é uma molécula associada à parede celular, codificada pelo gene cromossomal *esp*. Vários estudos têm reportado a presença do gene *esp* em isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* (SATAKE et al., 1997; SHANKAR et al., 1999; SHANKAR et al., 2001; WOODFORD; SOLTANI; HARDY, 2001; WILLEMS et al., 2001; RUZON et al., 2009). Embora evidências experimentais detalhadas ainda não estejam disponíveis, 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; WILLEMS et al., 2001; WOODFORD; SOLTANI; HARDY, 2001; COQUE et al., 2002; EATON; GASSON, 2002; LEAVIS et al., 2003). Em *E. faecalis*, a presença do gene *esp* tem sido associada ao aumento de virulência (SHANKAR et al., 1999), colonização e persistência no trato urinário (SHANKAR et al., 2001) e formação de biofilme (TOLEDO-ARANA et al., 2001).

Embora não seja um determinante de virulência clássico, a capacidade de formar biofilme microbiano parece contribuir substancialmente na virulência dos microrganismos (DONLAN; COSTERTON 2002).

Biofilmes são comunidades bacterianas organizadas e funcionais, que encontram-se embebidas em matriz extracelular secretada pelos microrganismos, composta por polissacarídeos, proteínas e outras macromoléculas incluindo material genético. Dentro dessa matriz, as células bacterianas evadem-se da resposta imune do hospedeiro e sobrevivem a terapia antimicrobiana, resultando em infecções persistentes de difícil tratamento (MOHAMED; HUANG, 2007).

E. faecalis e *E. faecium* são capazes de formar biofilme na superfície de dispositivos relacionados aos procedimentos invasivos de assistência à saúde, como cateteres ureterais (KEANE et al., 1994), intravascular (SANDOE et al., 2002), endopróteses biliares (DOWIDAR et al., 1991) e dispositivos siliconados utilizados em gastrostomia (DAUTLE et al., 2003).

A habilidade de formar biofilme em materiais médicos pode contribuir para o desenvolvimento de infecções relacionadas a cateter intravascular (JOYANES et al., 1999; DAROUICHE, 2001; SANDOE et al., 2003). Corroborando esta situação, dados disponibilizados pelo CDC mostraram que *Enterococcus* spp. foi o segundo patógeno (13,7%) mais frequentemente isolado nos casos de

infecções da corrente sanguínea e o terceiro (9,6%) nos casos de infecções urinárias, ambas relacionadas a cateteres (HIDRON et al., 2008).

Existem controvérsias no papel de Esp na formação de biofilme por *E. faecalis*. Enquanto alguns pesquisadores não encontram correlação com a ausência ou presença do gene *esp* (KRISTICH et al., 2004), a formação de biofilme mediada por Esp foi mostrada por outros (TOLEDO-ARANA et al., 2001, TENDOLKAR et al., 2004). A expressão de Esp na superfície de *E. faecium* parece ser necessária na aderência inicial do microrganismo à superfície de poliestireno (VAN WAMEL et al., 2007). Corroborando com isto, Heikens et al. (2007) mostraram que a aderência e a formação do biofilme, na mesma superfície, foi significativamente reduzida em cepa de *E. faecium esp⁻* comparado à cepa selvagem. Entretanto, embora não completamente elucidado, vários fatores podem colaborar com a formação de biofilme de enterococos

2.3 EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES ENTEROCÓCICAS

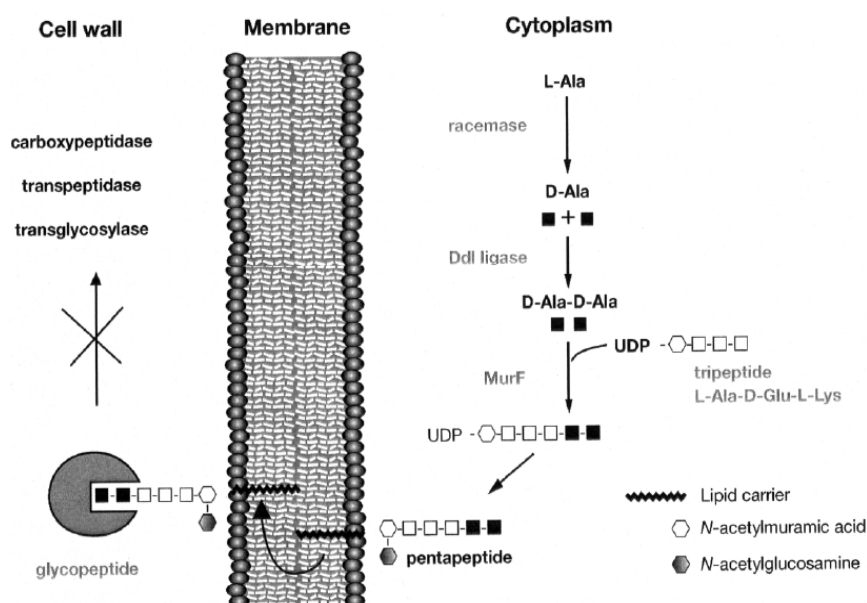
Dados epidemiológicos recentes mostram que *E. faecium* e *E. faecalis* estão entre os principais agentes etiológicos das infecções relacionadas aos serviços de saúde (WERNER; STROMMINGER; WITTE, 2008; GALES et al.; 2009), incluindo infecções da corrente sanguínea, endocardite, infecções de feridas, sítio cirúrgico, e trato urinário, peritonites e abscessos intra-abdominais (LAUTENBACH et al., 1999; GIACOMETTI et al., 2000; HIGAKI; MOROHASHI; YAMAGISHI, 2002). Entre os principais fatores de risco para tais infecções estão: idade avançada, hospitalização, presença de cateteres de longa permanência, terapia antimicrobiana múltipla e imunossupressão (MURRAY; WEINSTOCK, 1999; BONTEN; WILLEMS; WEINSTEIN, 2001).

Esses microrganismos podem ser transmitidos por contato direto ou adquirido, pelo consumo de água ou alimentos contaminados (ELSNER et al., 2000). Em algumas situações, as infecções originam-se a partir da microbiota normal do intestino dos pacientes (GILMORE; FERRETI, 2003).

Infecções enterocócicas graves, como infecções da corrente sanguínea e endocardite, requerem tratamento com uma combinação de dois agentes antimicrobianos, um que interfira com a síntese da parede celular, como ampicilina, penicilina G ou vancomicina (Figura 1) e outro que atue na síntese

protéica (gentamicina ou estreptomicina). O sinergismo somente é possível quando o microrganismo é sensível a ambas as classes de antimicrobianos envolvidas (ROSSI; ANDREAZZI, 2005). Com a parede celular danificada, o aminoglicosídeo pode penetrar na célula mais facilmente (HERMAN; GERDING, 1991).

Figura 1 – 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 as reações catalisadas por transglicosilase, transpeptidase e D,D-carboxipeptidase. Ddl: D-Ala-D-Ala ligase; MurF: mureína sintetase; UDP: uracil difosfato. Adaptado de Courvalin (2006). Os Glicopeptídeos ligam-se a porção final da cadeia de aminoácidos da parede celular, inibindo a função de várias enzimas que participam da síntese final do peptidoglicano (carboxipeptidase, transaminase e transglicosidade) (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

A vancomicina combinada com um aminoglicosídeo mostrou sinergismo contra Enterococos, tanto *in vitro* como *in vivo* (WESTENFELDER et al., 1973) e é recomendada como escolha para pacientes com alergia a penicilina ou no tratamento de cepas resistentes a ampicilina e a penicilina (HERMAN; GERDING, 1991).

O uso de antimicrobianos pode desestabilizar a microbiota intestinal, eliminando os microrganismos sensíveis (de qualquer espécie) e permitindo a colonização de outros, incluindo enterococos resistentes (GILMORE; FERRETI, 2003). Os portadores intestinais assintomáticos de enterococos resistentes podem permanecer colonizados por meses e até anos, se tornando reservatórios e

oferecendo risco de transmissão e disseminação destas cepas (GILMORE; FERRETI, 2003).

Uma vez no intestino, esses microrganismos podem ser transportados deste sítio para a corrente sanguínea e disseminados para locais distantes. De acordo com o modelo de translocação, o acesso de enterococos à via hematogênica pode ser decorrente de invasão microbiana das células epiteliais do intestino ou da fagocitose pelos leucócitos intraepiteliais (WELLS et al., 1990; ZENG et al., 2004). Além disso, esses microrganismos podem ser transmitidos após contaminação ambiental ou de profissionais de saúde, como será descrito posteriormente.

De acordo com as diretrizes do CDC, (*Management of Multidrug-Resistant Organisms In Healthcare Settings*, 2006), para fins epidemiológicos, MDROs são definidos como microrganismos, predominantemente bactérias, que são resistentes a uma ou mais classes de agentes antimicrobianos. Entretanto, as denominações de certos MDROs fazem referência à apenas um agente, como no caso do VRE (*vancomycin resistant enterococci*). Contudo, subentende-se que esses microrganismos são frequentemente resistentes a outros agentes antimicrobianos disponíveis além daquele citado na nomenclatura.

A resistência intrínseca a antimicrobianos como cefalosporinas, sulfonamidas, lincosaminas, penicilinas e carbapenens é uma característica do gênero *Enterococcus* (GIRAFFA et al., 2002). Além disso, muitas espécies podem tornar-se resistentes a tetraciclinas, macrolídeos, aminoglicosídeos e glicopeptídeos pela aquisição de plasmídeos e transposons (GOLD, 2001).

A este perfil de resistência múltipla aos antimicrobianos frequentemente utilizados na prática clínica [TOP; WILLEMS; BONTEN, 2008 (Tabela 1)] que se credita importância epidemiológica ao VRE no âmbito da saúde pública (*National Nosocomial Infections Surveillance System*, 2001; WEBB et al., 2005).

Com objetivo de explorar a origem evolutiva de *E. faecium*, estudo envolvendo cinco continentes analisou pelo método *Multilocus Sequence Typing* (MLST) 411 amostras de bactérias sensíveis e resistentes a vancomicina, procedentes de fonte humana, animal, hospitalar e da comunidade. Os resultados mostraram uma linhagem genética de propagação global (Figura 2) denominada Complexo Clonal 17 (CC17) associada a surtos de infecções relacionadas a serviços

de saúde, resistente à ampicilina, macrolídeos e quinolonas, e muitas vezes contendo o gene *esp* (WILLEMS et al., 2005).

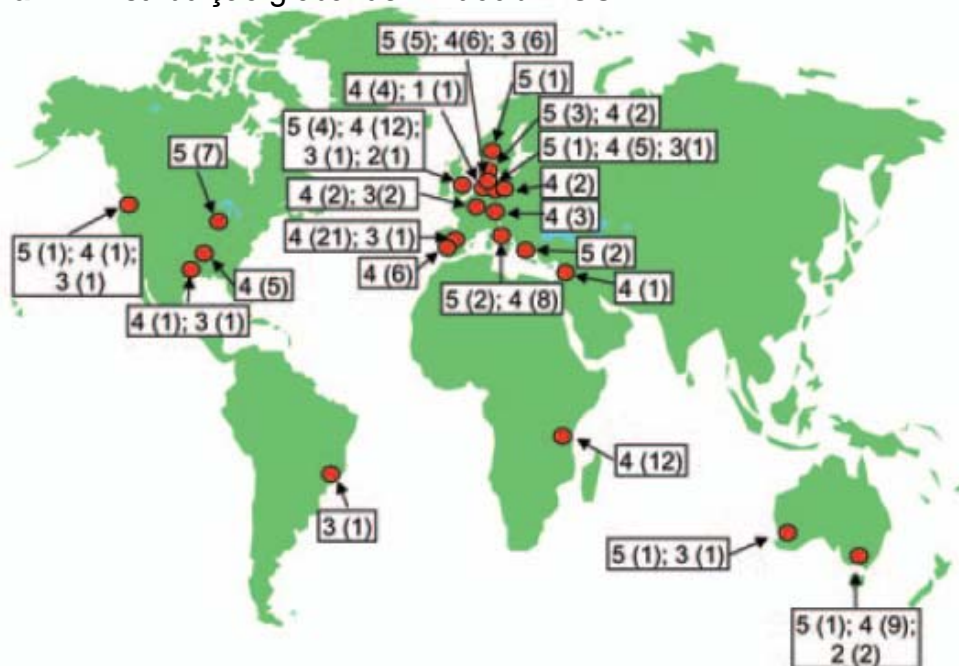
E. faecium CC17 é um exemplo de processo evolutivo cumulativo que contribui para a permanência de bactérias em ambientes hospitalares. Evidências indicam que o seu desenvolvimento precedeu o aparecimento de resistência a vancomicina (COQUE et al., 2005; TORRES et al., 2006; NEBREDA et al., 2007).

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

	ANTIMICROBIANO	ESPÉCIE	MECANISMO DE RESISTÊNCIA
Resistência Intrínseca	β -Lactâmicos	Todos os enterococos	Baixa afinidade às proteínas ligadoras de penicilina (PBP)
	Penicilinas (baixo nível)		
	Carbapenens (nível moderado)		
	Cefalosporinas (alto nível)		
Resistência Adquirida	Aminoglicosídeos (baixo nível)	Todos os enterococos	Captação ineficiente
	Aminoglicosídeos (nível moderado)	<i>E. faecium</i>	Atividade da enzima cromossomal 6'-N-aminoglicosídeo acetiltransferase [AAC(6')-II]
	Lincosamidas	<i>E. faecalis</i> , <i>E. avium</i> , <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>	Supostamente efluxo
	Estreptograminas A	<i>E. faecalis</i> , <i>E. avium</i> , <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>	
	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
	Aminoglicosídeos (alto nível)	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>	β -lactamase (rara)
	Macrolídeos	Maioria dos Enterococos	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, como aminoglicosídeo acetiltransferase e quinase [AAC(6')-APH(2'')]
	Cloranfenicol	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	Metilação ribossomal
	Tetraciclina	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	Cloranfenicol acetil transferase
Quinolonas	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	Modificação de proteína ribossomal	
Glicopeptídeos (alto nível)	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	Alterações na DNA girase e Topoisomerase IV	
Oxazolidinonas	<i>E. faecium</i>	Modificação do precursor	
			Mutação no gene 23S rRNA

*Adaptado de TOP; WILLEMS; BONTEN (2008).

Figura 2 – Distribuição global de *E. faecium* CC17.



Círculos indicam locais de isolamento de *E. faecium* CC17. Os números indicam a fonte de isolamento: 1, isolados de animais; 2, isolados da comunidade humana (vigilância epidemiológica); 3, isolados de colonização retal em pacientes hospitalizados; 4, isolados clínicos humanos; 5, isolados de surtos hospitalares documentados. Os números de amostras isoladas estão indicados entre parênteses.

2.4 RESISTÊNCIA A VANCOMICINA

Como mencionado anteriormente, a ocorrência de infecções enterocócicas aumentou progressivamente nas últimas décadas. *E. faecalis* continua sendo o agente etiológico da maioria das infecções enterocócicas em humanos (IWEN et al., 1997). Entretanto, durante a década passada, a incidência de infecções causadas por *E. faecium* aumentou, o que tem sido relacionado à emergência de resistência adquirida aos antimicrobianos nessa espécie (IWEN et al., 1997; MURDOCH et al., 2002; WILLEMS; BONTEN, 2007).

Nos anos 80, depois da emergência de resistência a beta-lactâmicos e a aminoglicosídeos de alto nível, a vancomicina passou a ser um dos poucos antimicrobianos disponíveis para tratar infecções enterocócicas. Em 1986, entretanto, enterococos resistentes a vancomicina foram identificados pela primeira vez na França e Inglaterra (LECLERQ; DERLOT; DUVAL, 1988; UTTLEY et al., 1988) ocorrendo uma rápida disseminação a partir de 1999 nos Estados Unidos, onde a incidência de VRE foi atribuída à utilização generalizada de vancomicina nos hospitais norte-americanos (MOELLERING, 2000). A partir de então, VRE tem sido

isolado em quase todos os continentes incluindo países da Ásia, Europa, América e África (DALLA COSTA et al., 1998; MARIN et al., 1998; MURRAY, 2000; KAWALEC et al., 2001; De LISLE; PERL, 2003, KOH; CHIU et al., 2006; KOLAR et al., 2006; WERNER et al., 2008b; 2008c).

Na Europa, considerando que o consumo de vancomicina foi menos acentuado, o surgimento das cepas resistentes neste continente sugere referência ao uso de um glicopeptídeo estreitamente relacionado, a avoparcina, amplamente utilizada na comunidade agrícola como promotor de crescimento na pecuária (BATES; JORDENS; SELKON,1993). Seu uso perdurou do final dos anos 1970 até 1998, quando foi proibida (*The European Antimicrobial Resistance Surveillance System*, 2008)

Em 2007, o programa *Sentry - Antimicrobial Surveillance Program*, que conta com a participação de diversas instituições mundiais de saúde, apontou este microrganismo como o quarto colocado (10,2%) entre os agentes etiológicos das infecções sanguíneas nos Estados Unidos e o quinto (7,2%) na Europa. Na América Latina este percentual é mais baixo (5,0%) (GALES te al., 2009). Podemos sugerir que a baixa incidência de isolados VRE na América Latina pode ser consequência da subnotificação e reduzida atividade de vigilância das infecções quando comparado a países como os europeus e EUA. Podem diferenciar-se desses também pelas restrições econômicas que refletem diretamente nos avanços e disponibilidade de técnicas diagnósticas.

Como citado anteriormente, enterococos responde por 12% das infecções reportadas por 466 hospitais norte americanos ao *National Healthcare Safety Network* (NHSN - CDC). VRE foi identificado em 86,4% das infecções da corrente sanguínea e 87,1% das infecções urinárias, ambas relacionadas a cateter (HIDRON et al., 2008).

O primeiro caso de VRE no Brasil foi descrito em 1996 na cidade de Curitiba, Paraná, isolado de hemocultura de uma criança de 9 anos de idade, sexo feminino, com diagnóstico de anemia aplásica em sepse. O isolado também apresentou resistência a ampicilina, teicoplanina, gentamicina e estreptomicina (DALLA COSTA et al., 1998).

No Brasil, dados epidemiológicos recentes foram divulgados pelo programa *Sentry*, que contou com a participação de quatro instituições: Hospital São Paulo/UNIFESP, São Paulo, SP, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre,

RS, Hospital de Base do Distrito Federal, Brasília, DF e Laboratório Médico Santa Luzia, Florianópolis, SC. Estas instituições coletaram um total de 3.907 amostras de bactérias Gram-positivas entre janeiro de 2005 e setembro de 2008. Deste total, 754 amostras representaram *Enterococcus* spp., sendo 83,0% *E. faecalis*, e destes, 7,7% resistentes a vancomicina. A resistência a vancomicina por esta espécie cresceu de 4,4% em 2005 para 12,2 % em 2008, mostrando significativo aumento no perfil de resistência. Em contrapartida, entre as cepas de *E. faecium* isoladas, 65,7% eram resistentes a vancomicina. O estudo concluiu que no Brasil a incidência de *E. faecium* resistente a vancomicina é relativamente baixa quando comparada às reportadas pelos Estados Unidos, mas está emergindo e se disseminando rapidamente por alguns serviços de saúde brasileiros (GALES et al., 2009).

Bactérias resistentes a antimicrobianos, como VRE, são transmitidas entre os pacientes pela contaminação ambiental (CLIFFORD et al., 1997) ou pelo contato interpessoal, como relatado por Webb et al. (2005). Pacientes portadores de VRE, como os que têm o trato gastrointestinal colonizado, são, em sua maioria, assintomáticos, de maneira que esse reservatório frequentemente não é notado a menos que sejam colhidas culturas de vigilância (BOYCE, 1997). Equipamentos médicos e superfícies do ambiente no qual o paciente encontra-se hospitalizado geralmente tornam-se contaminados com VRE (HOTA, 2001), podendo servir de fonte para contaminação carreada, principalmente, pelas mãos dos profissionais de saúde (HAYDEN et al., 2008).

Em estudo realizado no Hospital Universitário de Londrina, mesma instituição da atual pesquisa, VRE foi isolado de diversos itens, incluindo bancadas, leito de pacientes, equipamentos (bombas de infusão medicamentosa, respiradores, monitores), válvulas de ar, estetoscópios, esfigmomanômetros, termômetros, materiais de escritório entre outros (PERUGINI, 2008).

A disseminação da contaminação ambiental por VRE ocorre especialmente nos ambientes onde há pacientes com diarreia (BOYCE et al., 1997). Entretanto, estudos têm mostrado que a limpeza ou desinfecção do ambiente pode reduzir a incidência de colonização ou infecção por VRE (SCHULTSZ et al., 2003; HAYDEN et al., 2006).

Em vista do exposto, controlar a disseminação da colonização por VRE e prevenir o desenvolvimento de infecções em pacientes colonizados são metas importantes (PATEL, 2003). Para direcionar estas metas o CDC publicou um

manual específico com recomendações para conter a transmissão hospitalar de VRE (*Management of Multidrug-Resistant Organisms In Healthcare Settings*, 2006). Essas recomendações focam principalmente o uso prudente da vancomicina, treinamento dos profissionais, culturas de vigilância e o estabelecimento de medidas de controle, incluindo o uso de luvas e aventais e o isolamento apropriado dos pacientes.

Em resposta aos dados publicados, em todo o mundo a atenção voltou-se para a epidemiologia do VRE principalmente em hospitais, contudo ainda há relatos atuais do isolamento de VRE na atividade pecuária e redes de esgoto da comunidade (AARESTRUP, 1995; WITTE; KLARE, 1995; AARESTRUP et al., 2002; TANIMOTO et al., 2005; KOTZAMANIDIS, et al., 2009). Isto sugere que alimentos derivados desses animais podem servir de reservatório para transmissão do VRE a indivíduos não-hospitalizados (CETINKAYA et al., 2000; AARESTRUP, 2004; MANSON, et al., 2004).

Infecções por VRE têm sido associadas a maior morbidade e mortalidade, especialmente em pacientes com diversos fatores de risco como alta prevalência de doenças infecciosas, e em hospitais com superlotação e infraestrutura inadequada. Esta associação é decorrente do número reduzido de opções terapêuticas eficazes para MDROs (LEAVIS et al., 2003; RICE; HUTTON-THOMAS; LAKTICOVA, 2004).

Quanto ao tratamento das infecções enterocócicas por cepas resistentes à vancomicina, as alternativas terapêuticas são restritas a antimicrobianos introduzidos recentemente na prática clínica, como quinupristin/dalfopristin, linezolide, tigeciclina e daptomicina. Porém, estes são aprovados somente em casos especiais e a resistência aos mesmos já foi reportada [JOHNSON et al., 2002; WERNER et al., 2003; HALLE, et al., 2004, SEEDAT et al., 2006; MONTERO; STOCK; MURRAY, 2008; WERNER, 2008a, GALES et al. 2009 (Tabela 2)].

Tabela 2 – Características dos antimicrobianos utilizados para *Enterococcus* resistentes a vancomicina

Antimicrobiano	Classes	Modo de ação /inibição	Alvo	Espectro de atividade	Mecanismos de Resistência
Quinupristin/dalfopristin	Streptogramina	Síntese protéica	23S rRNA Proteína ribossomal L24	Gram-positivos, exceto <i>E. faecalis</i>	Mutações em 23S rRNA
Linezolid	Oxazolidinona	Síntese protéica	23S rRNA	Gram-positivos Micobactérias	Mutações em 23S rRNA
Tigeciclina	Gliciliclina	Síntese protéica	16S rRNA Proteína ribossomal S7	Ampla espectro	Ainda não detectado
Daptomicina	Lipopeptídeo Cíclico	Potencial de membrana	Biossíntese de ácido teicoico	Gram-positivos	Baixa frequência de alterações na membrana

Fonte: Adaptado de Boneca e Chiosis, 2003

Tendo em vista este panorama, as infecções por VRE apresentam altas taxas de mortalidade e elevado custo para os serviços de saúde em relação àquelas causadas por cepas sensíveis a vancomicina (SALGADO; FARR, 2003).

Quanto ao aspecto molecular da resistência à vancomicina pelo enterococos, existe até o momento a descrição de seis fenótipos, incluindo VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG e VanL [MCKESSAR et al., 2000; DEPARDIEU et al., 2003; COURVALIN, 2006; BOYD, et al., 2008 (Tabela 3)]. Estes fenótipos correspondem aos genótipos *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG* e *vanL* (AARESTRUP et al., 2000; QU, et al., 2009).

VanA e VanB possuem maior relevância clínica (MAK, et al., 2009). VanA e, em menor extensão, VanB são amplamente distribuídos, mediados por elementos genéticos adquiridos, não encontrados previamente em enterococos (LAI; KIRSCH, 1996).

Geralmente, o genótipo *vanA* expressa o fenótipo VanA, mostrando elevado nível de resistência aos dois principais glicopeptídeos, vancomicina e teicoplanina. Diferencialmente, o genótipo *vanB* e seu respectivo fenótipo, é caracterizado por níveis intermediários de resistência a vancomicina e sensibilidade a teicoplanina (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000). Entretanto, algumas cepas *vanA* apresentaram sensibilidade a teicoplanina, e foram então denominadas com

fenótipo VanB-genótipo *vanA*. O mecanismo deste fenômeno ainda não foi esclarecido, mas acredita-se estar relacionado a mutações observadas nos genes *vanS*, *vanY* e *vanZ* do transposon Tn1546 (HASHIMOTO et al., 2000; LAUDERDALE et al., 2002; LEE et al., 2004; SONG et al., 2006; HENRIQUE et al., 2008; GU et al., 2009).

Cepas dos tipos VanC, VanE, VanG e VanL são resistentes a baixas concentrações de vancomicina e sensíveis a teicoplanina (REYNOLDS; COURVALIN, 2005; BOYD, et al., 2008). Cepas do tipo VanD caracterizam-se por resistência constitutiva a níveis moderados dos dois glicopeptídeos (DEPARDIEU; REYNOLDS; COURVALIN, 2003).

Tabela 3 – Fenótipos de resistência a vancomicina em espécies de *Enterococcus*

Fenótipo	Resistência Adquirida						Resistência Intrínseca
	VanA	VanB	VanD	VanE	VanG	VanL	VanC
Gene	<i>vanA</i>	<i>vanB</i> ²	<i>vanD</i> ²	<i>vanE</i>	<i>vanG</i> ²	<i>vanL</i>	<i>vanC</i>
MIC _{vancomicina} (mg/L)	16 – 1000	4 - 32	64 - 128	8 - 32	16	8	2 - 32
MIC _{teicoplanina} (mg/L)	(4-) 16 – 512	0,5 – 1	4 – 64	0,5	0,5	S	0,5 – 1
Expressão	Induzida	Induzida	Constitutiva	Induzida	Induzida	Induzida	Constitutiva/ Induzida
Localização	Plasmídeo/cromossomo	Plasmídeo/cromossomo	Cromossomo	Cromossomo	Cromossomo	Cromossomo?	Cromossomo
Transferência por conjugação	+/-	+/-	-	-	+	-	-
Distribuição entre espécies de <i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. durans</i> <i>E. hirae</i> <i>E. gallinarum</i> ¹ <i>E. casseliflavus</i> ¹ <i>E. raffinosus</i> <i>E. avium</i> <i>E. mundtii</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. durans</i> <i>E. gallinarum</i> ¹	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. raffinosus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i> : <i>vanC1</i> <i>E. casseliflavus</i> : <i>vanC2/3</i>

1 aquisição dos genes *vanA* ou *vanB* somado a *vanC1* ou *vanC2/3* – evento raro

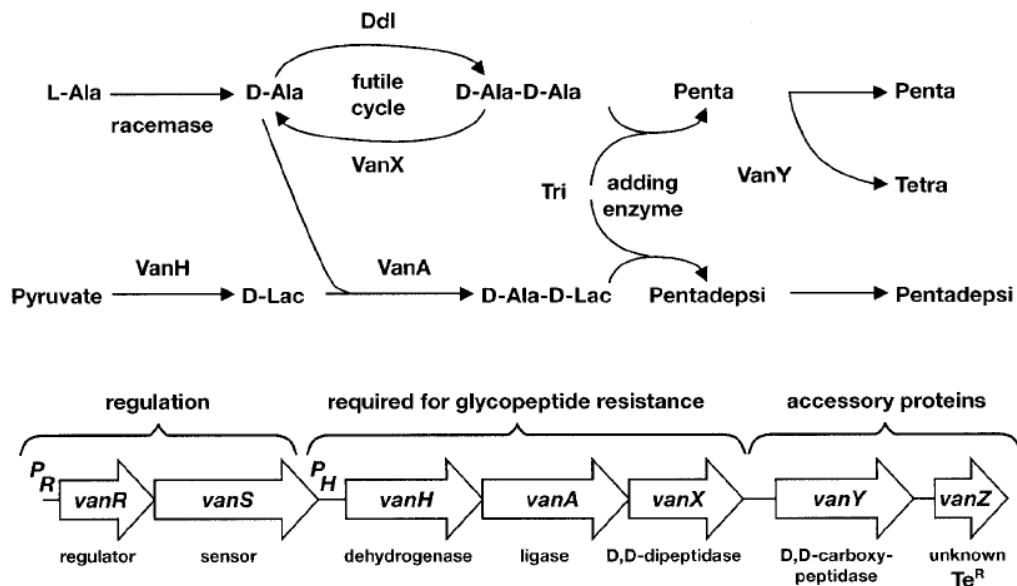
2 subtipos existentes (*vanB1-3*, *vanD1-5*, *vanG1-2*); S, sensível a teicoplanina

Fonte: Werner et al. (2008b).

A melhor descrição dos mecanismos genéticos da resistência a vancomicina partiu de estudos realizados com o gene *vanA* (Figura 3), e posteriormente *vanB*. O operon que confere o fenótipo VanA de resistência é composto por sete genes encontrados no transposon Tn1546. Na presença do indutor, o antimicrobiano, os genes *vanS* e *vanR* codificam proteínas sensora e reguladora, respectivamente, constituindo os dois componentes reguladores responsáveis pelo reconhecimento do glicopeptídeo no meio de cultura e ativação transcricional dos genes de resistência. Duas proteínas são essenciais para a produção de precursores de peptidoglicanos terminando em D-Alanina-D-Lactato (D-Ala-D-Lac), com os quais a vancomicina tem baixa afinidade quando comparada

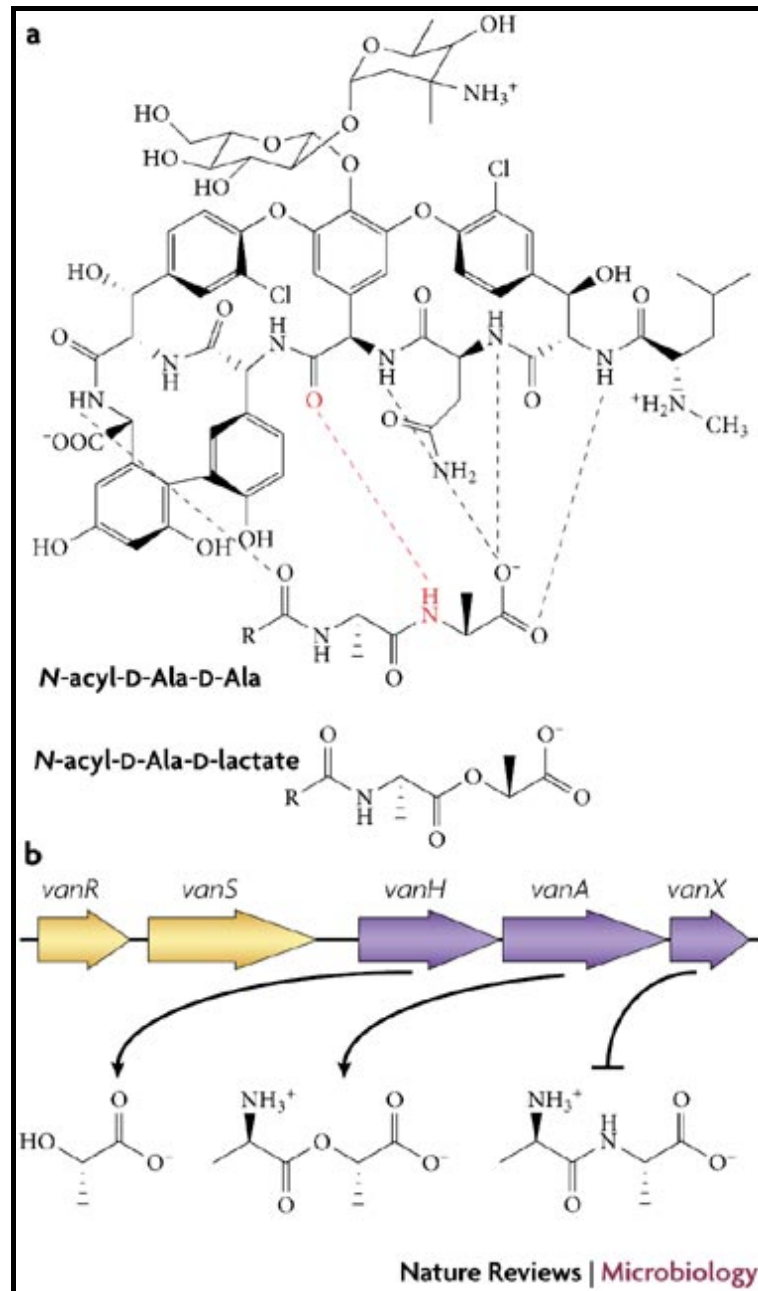
aos constituintes normais da parede, D-Alanina-D-Alanina (D-Ala-D-Ala) [EVERS; QUINTILIANI; COURVALIN, 1996; ARTHUR et al., 1998; TANIMOTO et al, 2005 (Figura 4)]. Essas proteínas são a desidrogenase (codificada por *vanH* ou *vanH_B*) que sintetiza D-Lac, e a ligase (codificada por *vanA* ou *vanB*) que liga D-Lac à D-Ala. Duas proteínas, DD-dipeptidase (*VanX* ou *VanXB*) e DD-carboxipeptidase (*VanY* ou *VanYB*) são responsáveis pelo catabolismo de D-Ala-D-Ala terminal pela clivagem do dipeptídeo ou remoção da terminação D-Ala, etapa final da formação da parede celular, que culmina com a ligação às pontes cruzadas, garantindo estabilidade à parede mesmo na presença do antimicrobiano.

Figura 3 – Mecanismos de resistência aos glicopeptídeos do tipo VanA.



Acima, síntese de precursores do peptidoglicano em uma cepa resistente do tipo VanA. Ddl: D-Ala-D-Ala ligase; Penta: L-Ala- γ -D-Glu-L-Lis-D-Ala-D-Ala; Pentadepsi: L-Ala- γ -D-Glu-L-Lis-D-Ala-D-Lac; Tetra: L-Ala- γ -D-Glu-L-Lis-D-Ala; Tri: L-Ala- γ -D-Glu-L-Lis. Abaixo, organização do operon *vanA*. As setas representam sequências 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).

Figura 4 – Ligação da vancomicina ao sítio alvo na parede celular.



a) Ligações entre a estrutura molecular da vancomicina com a estrutura terminal do peptidoglicano N-acyl-D-Ala-D-Ala por meio das cinco pontes de hidrogênio. Abaixo, molécula de peptidoglicano produzida por enterococos resistentes a vancomicina (VRE), composta pela porção terminal N-acyl-D-Ala-D-Lactate, que remove uma ponte de hidrogênio, resultando na diminuição da afinidade do antibiótico com a parede celular. b) Organização do operon *vanA*. As setas representam sequências codificantes e indicam a direção da transcrição. Os genes de regulação e resistência são co-transcritos pelos promotores de *vanR* e *vanS*, respectivamente. Adaptado de Wright (2007) e Arthur e Courvalin (1993).

Tendo em vista que a teicoplamina não participa na indução de resistência do tipo VanB, as diferenças entre os dois principais fenótipos residem predominantemente nos genes de regulação, preservando a organização e funcionalidade similares às do tipo VanA (EVERS; COURVALIN, 1996).

Entre os enterococos, existem atualmente três operons que resultam na produção de D-Ala-D-Ser e conferem resistência de baixo nível a vancomicina, *vanC*, *vanE*, *vanG* e *vanL* (NAVARRO; COURVALIN, 1994; DEPARDIEU et al., 2003; REYNOLDS; COURVALIN, 2005; BOYD, et al., 2008). O operon *vanC* é intrínseco a *E. gallinarum* (VanC1) e *E. casseliflavus* (VanC2/3) (NAVARRO; COURVALIN, 1994), enquanto *vanE*, *vanG* e *vanL* são adquiridos por *E. faecalis* (REYNOLDS; COURVALIN, 2005).

O operon *vanD* é similar aos operons *vanA* e *vanB* e sua resistência deve-se à produção constitutiva de precursores terminados em D-Ala-D-Lac (DEPARDIEU; REYNOLDS; COURVALIN, 2003).

A tendência a adquirir várias características de resistência a antimicrobianos pode resultar de mecanismos baseados em conjugação. Um dos sistemas de conjugação envolve oligopeptídeos chamados feromônios, e são denominados plasmídeos responsivos a feromônios. Este processo se desencadeia quando cepas de enterococos secretam no meio um número de feromonas para diferentes tipos de plasmídeos. Quando uma célula contendo um plasmídeo-feromônio responsivo (a célula do potencial doador) entra em contato com o seu correspondente feromônio, a transcrição de um gene do plasmídeo é ativada, resultando na síntese de uma substância agregativa (chamada de substância de agregação). Esse processo de agregação pode ser visualizado em tubo de ensaio, onde um agregado visível é depositado no fundo do tubo. Este fenômeno facilita a formação de porinas, através da qual ocorre a transmissão dos plasmídeos. Uma vez que a célula receptora tiver adquirido o plasmídeo, a síntese do feromônio correspondente é desligada para evitar auto-agregação. Este sistema de conjugação ocorre principalmente em *E. faecalis* e é altamente eficiente (MURRAY, 1998).

Outro sistema de conjugação envolve uma ampla gama de plasmídeos que podem ser transferidos entre espécies de enterococos e outros organismos, como estreptococos e estafilococos. A frequência de transferência é geralmente muito menor do que com o sistema por feromônio (CLEWELL, 1981).

A possibilidade de transferência de resistência para outros microrganismos possivelmente mais patogênicos é uma crescente preocupação. Clinicamente, foram relatados quatro isolados, não-relacionados, de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina que portavam o gene *vanA* (*Vancomycin Resistance S. aureus* - VRSA). Dois casos ocorreram na Pensilvânia e Michigan, EUA, no ano

de 2002. Esses isolados estavam associados com úlcera crônica de pele, e a resistência a vancomicina foi mediada pelo transposon Tn1546 (CHANG et al., 2003). Em Nova Iorque, um caso foi isolado no início de 2004 (KACICA; McDONALD, 2004). Seis casos ocorreram em Michigan, isolados a partir de 2005, até 2007 (FINKS et al, 2009).

2.5 DEPENDÊNCIA DE VANCOMICINA

A vancomicina é uma das últimas opções terapêuticas indicada no tratamento de endocardite, osteomielite, sepse, causados por *Enterococcus* spp ou outros Gram-positivos, incluindo MRSA (CHIEW; HALL, 1998).

O desenvolvimento da resistência a este glicopeptídeo observada em enterococos a partir de 1986 (LECLERQ; DERLOT; DUVAL, 1988; UTTLEY et al., 1988) ainda é um fator preocupante na prática clínica, tendo em vista as limitações terapêuticas implícitas (TOP; WILLEMS; BONTEN, 2008)

Outra consequência da pressão seletiva dos antimicrobianos sobre os microrganismos é detectada por alguns autores em amostras clínicas de enterococos que utilizam vancomicina para seu crescimento [FRAIMOW, et al, 1994; WOODFORD et al, 1994; GREEN et al, 1995; DEVER; SMITH et al., 1995; FARRAG; ELTRINGHAM; LIDDY, 1996; STEWART et al,1996; ROSSNEY; MCCONKEY; KEANE, 1997; SNG et al, 1998; MAJUMDAR et al, 1999; KIRKPATRICK et al, 1999; YOWLER; BLINKHORN; FRATIANNE, 2000; CHACHATY et al, 2001; TAMBYAH; MARX; MAKI, 2004; BERT et al, 2009 (Tabela 4)].

Enterococos dependente de vancomicina (VDE) foi isolado pela primeira vez em 1993 (FRAIMOW *et al.*, 1994), em uma amostra de urina de uma paciente que recebeu tratamento intravenoso com vancomicina por um longo período. Derivado do VRE, este mutante cresce apenas na presença de glicopeptídeo.

Estas infecções são claramente incomuns, contudo os relatos desses casos indicam sua importância clínica. Para os casos de pacientes infectados e colonizados por VDE sete estavam em uso de vancomicina para tratamento de infecções não enterocócicas: um para diarreia causada por

Clostridium difficile (DEVER et al., 1995), cinco para infecções estafilocócicas invasivas (FARRAG; ELTRINGHAM; LIDDY, 1996; STEWART et al., 1996; SNG et al., 1998; MAJUMDAR et al., 1999; BERT et al., 1999) e outro para bacteremia por *Corynebacterium* spp. resistentes aos antibióticos β -lactâmicos (TAMBYAH; MARX; MAKI, 2004). Nos demais casos, VDE foi considerado a causa imediata de infecções.

Sua significância clínica reflete as dificuldades no isolamento destas cepas, que raramente são identificadas nas análises laboratoriais convencionais. Isso ocorre em vista das características particulares de nutrição deste mutante que requer para o seu crescimento um meio suplementado com D-Ala-D-Ala, vancomicina ou outro indutor dos genes de resistência *van* (VAN BAMBEKE, 1999). A falha na identificação impossibilita descontinuidade do uso da vancomicina, levando a falha terapêutica.

Estudo realizado por Majumdar et al. (1999) mostrou, por análise do perfil eletroforético de DNA em campo de pulsos alternados (*Pulsed Field*), que duas cepas de enterococos, VRE e VDE, isoladas simultaneamente de fezes e sangue do paciente, eram geneticamente indistinguíveis. Isto sugere que o uso da vancomicina não apenas falhou na erradicação das cepas resistentes como também selecionou mutantes dependentes.

O mecanismo de resistência a vancomicina, citado anteriormente, mostra que as cepas de enterococos resistentes, quando expostas ao antimicrobiano, induzem expressão de genes de resistência (operon *van*), resultando na formação de parede celular com baixa afinidade ao antimicrobiano (EVERS et al., 1996; ARTHUR et al., 1998; TANIMOTO et al., 2005).

Em estudo realizado por Rosato et al. (1995), as cepas dependentes de vancomicina produziram os substratos de D-Ala-D-Lac ligase apenas na presença de 16 μ g de vancomicina. Na ausência do indutor nenhum precursor foi isolado, sugerindo que estes microrganismos tornam-se dependentes da transcrição dos genes plasmidiais ou cromossomais (operon *van*), expressos apenas na presença do glicopeptídeo.

No processo da dependência a vancomicina, a hipótese mais aceita propõe que ocorrem mutações no gene *ddl* cromossomal, que afetam a via clássica da biossíntese de parede celular. Essas mutações alteram a proteína em sítios importantes, inativando a enzima D-Ala-D-Ala ligase, tornando este mutante

dependente da expressão dos genes de resistência (operon *van*) induzidos na presença do glicopeptídeo (ROSATO et al., 1995; EVERS et al., 1996; VAN BAMBEKE et al., 1999; GREEN et al., 2003).

Corroborando essa hipótese, foi mostrado que as cepas dependentes crescem com dificuldade em meio contendo os precursores D-Ala-D-Ala (0,2 M), mas não crescem em meio contendo apenas D-Ala ou L-Ala (FRAIMOW et al., 1994; ROSATO et al., 1995).

Tabela 4 – Isolados clínicos de *Enterococcus* dependente de vancomicina (Adaptado de Bert et al, 2009)

Ano	Pais	Espécie	Genótipo	Sítio	Características do pacientes	Tratamento prévio com glicopeptídeos (duração)	Referência
1994	EUA	<i>E. faecalis</i>	<i>vanB</i>	Urina	Septicemia	Vancomicina (45 d)	FRAIMOW et al.,1994
1994	Reino Unido	<i>E. faecium</i>	Desconhecido	Fezes	Insuficiência renal	Vancomicina	WOODFORD et al., 1994
1994	Reino Unido	<i>E. faecium</i>	Desconhecido	Fezes	Insuficiência renal	Vancomicina	WOODFORD et al., 1994
1995	EUA	<i>E. faecium</i>	<i>vanB</i>	Sangue	Transplante hepático e intestinal	Vancomicina (14 d)	GREEN et al., 1995
1995	EUA	<i>E. faecium</i>	<i>vanB</i>	Fezes	Diarréia por <i>Clostridium difficile</i>	Vancomicina oral (10 d)	DEVER, SMITH, HANDWERGER, 1995
1996	Reino Unido	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	Sangue e urina	Ruptura esofágica	Teicoplanina	FARRAG, ELTRINGHAM, LIDDY, 1996
1996	Reino Unido	<i>E. faecalis</i>	Desconhecido	Sangue	Câncer de próstata	Vancomicina (8d)	STEWART et al., 1996
1997	Reino Unido	<i>E. faecalis</i>	Desconhecido	Sangue	Insuficiência renal	Vancomicina	STEWART et al., 1996
1997	Irlanda	Não especificado	Desconhecido	Urina	Leucemia aguda	Teicoplanina	ROSSNEY, McCONKEY, KEANE, 1997
1998	EUA	Não especificado	Desconhecido	Sangue	Transplante renal e pancreatite	Vancomicina	SNG et al., 1998
1999	EUA	<i>E. faecium</i>	<i>vanB</i>	Urina e fezes	Transplante de medula	Vancomicina (46 d)	KIRKPATRICK et al.,1999
1999	EUA	<i>E. faecium</i>	<i>vanB</i>	Urina e fezes	Transplante de medula	Vancomicina (6d)	KIRKPATRICK et al., 1999
1999	EUA	<i>E. faecium</i>	<i>vanB</i>	Fezes	Transplante de medula	Vancomicina (22d)	KIRKPATRICK,et al., 1999
1999	Reino Unido	<i>E. faecalis</i>	Desconhecido	Sangue e fezes	Insuficiência renal/Septicemia	Vancomicina (42 d)	MAJUMDAR et al., 1999
2000	EUA	<i>E. faecium</i>	Desconhecido	Fezes	Grande queimado	Vancomicina	YOWLER, BLINKHORN, FRATIENNE, 2000
2001	França	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	Sangue	Neuroblastoma	Teicoplanina (35 d)	CHACHATY et al., 2001
2004	EUA	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	Líquido peritoneal	Transplante renal e pacreático	Vancomicina	TAMBYAH, MARX, MAKI, 2004
2004	EUA	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	Líquido intra-abdomina	Transplante renal e pancreático	Vancomicina	TAMBYAH, MARX, MAKI, 2004
2004	EUA	<i>E. faecium</i>	<i>vanB</i>	Urina	Transplante medula óssea	Vancomicina	TAMBYAH, MARX, MAKI, 2004
2009	França	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	Fezes	Transplante hepático	Vancomicina (14 d)	BERT et al., 2009

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Atualmente, *E. faecium* é um importante agente de infecções associadas a serviços de assistência a saúde. Esse cenário é preocupante pelo fato deste microrganismo apresentar resistência a vários antimicrobianos, inclusive aos glicopeptídeos. No Hospital Universitário de Londrina, Paraná, instituição do atual estudo, o primeiro isolamento de VRE ocorreu em 1999. Após adoção das medidas de controle recomendadas pelo CDC, cepas resistentes não foram isoladas até maio de 2002. A partir de então VRE passou a ser identificado e a frequência de isolamento em culturas de vigilância aumentou gradativamente até se tornar endêmico nos dias atuais. No período entre 2007 e 2009 o enterococos representou 4,4% de todos os agentes etiológicos isolados de infecções associadas aos serviços de saúde. Do total de Enterococos, 45% foram representados por *E. faecalis*, todos sensíveis a vancomicina, e 55% *E. faecium*, destes 83% resistentes a vancomicina.

Em vista do exposto, o objetivo principal desse trabalho foi:

- Caracterizar o primeiro isolado de *E. faecium* dependente de vancomicina em um hospital universitário brasileiro, procedente de colonização retal de paciente em uso do glicopeptídeo, utilizando técnicas fenotípicas e moleculares;

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar o perfil de sensibilidade aos agentes antimicrobianos;
- Determinar o genótipo de resistência a vancomicina por reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR);
- Avaliar a presença de genes que codificam fatores de virulência por PCR: citolisina (*cylA*), adesina (*efaA*), gelatinase (*gelE*) e proteína de superfície (*esp*);
- Clonar e sequenciar o gene *ddl*.
- Pontuar as mutações no gene *ddl* mutante.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M. Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. *Microbiol Drug Resist*, v. 1, p. 255-257, 1995.
- AARESTRUP, F. M.; AGERSO, Y.; GERNER-SMIDT, P.; MADSEN, M.; JENSEN, L. B. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 37, n. 2, p. 127-37, 2000.
- AARESTRUP, F.M.; HASMAN, H.; JENSEN, L. B.; MORENO, M.; HERRERO, IA.; DOMINGUEZ, L.; FINN, M.; FRANKLIN, A. Antimicrobial resistance among enterococci from pigs in three European countries. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 8, p. 4127-4129, 2002.
- AARESTRUP, F.M. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: principles and limitation. *Veterinary Public Health*, v. 51, n. 8-9, p. 380-388, 2004.
- AITCHISON, E.J.; LAMBERT, P.A.; SMITH, E.G.; FARRELL, I.D. Serodiagnosis of *Streptococcus faecalis* endocarditis by immunoblotting of surface protein antigens. *Journal Clinical Microbiology*, v. 25, p. 211-215, 1987.
- ARTHUR, M.; COURVALIN, P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in Enterococci. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v.. 37, n.8, p. 1563-1571, 1993.
- ARTHUR, M.; DEPARDIEU, F.; CABANIÉ, L.; REYNOLDS, P.; COURVALIN, P. Requirement of the VanY and VanX D,D-peptidases for glycopeptide resistance in enterococci. *Molecular Microbiology*, v. 30, p. 819-830, 1998.
- BALDASSARI, L.; BERTUCCINI, L.; AMMENDOLIA, M.G.; GHERARDI, G.; CRETÌ, R. Variant *esp* gene in a vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium*. *Lancet*, v. 357, p. 1802, 2001.
- BATES, J.; JORDENS, J.Z.; SELKON, J.B. Evidence for an animal origin of vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*; v.21, n.342, p.490- 1, 1993.
- BERRY, A.M.; PATON, J.C. Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infection and Immunity*, v. 68, p. 133-140, 2000.
- BERT, F.; LEFLON-GUIBOUT, V.; LE GRAND, J.; BOURDON, N.; NICOLAS-CHANOINE, M. H. Émergence d'entérocoque dépendant de la vancomycine à la suite d'un traitement par glycopeptide: cas clinique et revue Emergence of vancomycin-dependent enterococci following glycopeptide therapy: Case report and reviel. *Pathologie Biologie*, v.57, p. 56-60, 2009.

BIENDENBACH, 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.

BONECA, I.G.; CHIOSIS, G. Vancomycin resistance: occurrence, mechanisms and strategies to combat it. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, v.7, n.3, p.311-328, 2003.

BONTEN, M.J.; WILLEMS, R.; WEINSTEIN, R.A. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet Infectious Disease*, v. 1, p. 314-325, 2001.

BOYCE, J.M.; OPAL, S. M.; CHOW, J. W.; ZERVOS, M.J.; POTTER-BYNOE, G.; SHERMAN, C.B.; ROMULO, R.L.; FORTNA, S.; MEDEIROS, A.A.; Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable *vanB* class vancomycin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, p.1148-53, 1994

BOOTH, M.C.; BOGIE, C.P.; SAHL, H.G.; SIEZEN, R.J.; HATTER, K.L.; GILMORE, M.S. Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytotoxin, a novel lantibiotic. *Molecular Microbiology*, v. 21, p. 1175-1184, 1996.

BOYCE, J.M. Vancomycin-resistant enterococcus: detection, epidemiology and control measures. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 11, p. 367-384, 1997.

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

Centers for Disease Control and Prevention-CDC. *Guidelines for Management of Multidrug-Resistant Organisms In Healthcare Settings*, 2006. Advisory Committee (HICPAC). CDC *MMWR-Morb Mortal Wkly Rep*. 2006.

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, G.C. Vancomycin-resistant *Enterococci*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.13, p.686-707, 2000.

CHACHATY, E.; CIUPEK, C.; SCHOEPFER, C.; HARTMANN, O.; TANCREDE, C. *Glycopeptide-dependent vanA Enterococcus faecium bacteremia after prolonged treatment with teicoplanin*. In: Program and abstracts of the 38th interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy; San Diego, p. 94, 2001.

CHANG, S.; SIEVERT, D.M.; HAGEMAN, J.C.; BOULTON, M.L.; TENOVER, F.C.; SHAH, S.; RUDRIK, J.T.; PUPP, G.R.; BROWN, W.J.; CARDO, D.; FRIDKIN, S.K. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *The New England Journal of Medicine*, v. 348, p. 1342-1347, 2003.

CHIEW, Y.F.; HALL, M.C. Comparison of three methods for the molecular typing of Singapore isolates of enterococci with high-level aminoglycosides resistances, *Journal Hospital Infection*. v. 38, p. 223-230, 1998.

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

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 71, n. 1, p. 1-20, 2001.

CLEWELL, D.B. Plasmids, drug resistance, and gene transfer in the genus *Streptococcus*. *Microbiological Reviews*, v.45, p. 409-436, 1981.

CLEWELL, D.B. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell*, v. 73, p. 9-12, 1993.

CLIFFORD M.L.; KUEHNERT, M.J.; TENOVER, F.C.; JARVIS, W.R. Vancomycin-Resistant Enterococci Outside the Health-Care Setting: Prevalence, Sources, and Public Health Implications Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia. *Emerging Infectious Diseases*. v. 3, n. 3, 1997.

COBURN, P.S.; HANCOCK, L.E.; BOOTH, M.C.; GILMORE, M.S. A novel means of self-protection, unrelated to toxin activation, confers immunity to the bactericidal effects of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Infection and Immunity*, v. 67, p. 3339-3347, 1999.

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

COLLINS, M.D.; JONES, D.; FARROW, J.A.E.; KILPPER-BÄLZ, R.; SCHLEIFER, K. H. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov., *E. gallinarum* comb. nov.; e *E. malodoratus* sp. nov.; *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 34, p. 220-223, 1984.

COLLINS, M.D.; FARROW, J. A. E.; JONES, D. *Enterococcus munditti* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 36, p. 8-12, 1986.

COQUE, T.M.; PATTERSON, J.E.; STECKELBERG, J.M.; MURRAY, B.E. 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 Infection Disease*, v. 171, p. 1223-1229, 1995.

COQUE, T.M.; WILLEMS, R.; CANTÓN, R.; CAMPO, R.; BAQUERO, F. High occurrence of *esp* among ampicillin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* clones from hospitalized patients. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 50, p. 1035-1038, 2002.

COQUE, T.M.; WILLEMS, R.J.L.; FORTU'N, J.; TOP, J.; DIZ, S.; LOZA, E.; CANTÓN, R.; BAQUERO, F. Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish University hospital: setting the scene for a future increase in vancomycin resistance? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. 2693–2700, 2005.

COURVALIN, P. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clinical Infection Disease*, v. 42, supl. 1, p. S25-S34, 2006.

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

DAROUICHE, R. O. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. *Clinical Infection Diseases*, v. 33, p. 1567–1572, 2001.

DeLISLE, S.; PERL, T.M. Vancomycin-resistant *enterococci*: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. *Chest*, v.123, supl. 5, p. 504-518, 2003.

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

DEPARDIEU, F.; REYNOLDS, P.E.; COURVALIN, P. VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* 10/96A. *Antimicrob Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 7-8, 2003.

DAUTLE, M.P.; WILKINSON, T.R.; GAUDERER, M.W. Isolation and identification of biofilm microorganisms from silicone gastrostomy devices. *Journal Pediatr Surgery*, v. 38, p. 216–220, 2003.

DEVER, L.L.; SMITH, S.M.; HANDWERGER, S., ENG, R.H.K. Vancomycin-dependent *Enterococcus faecium* isolated from stool following oral vancomycin therapy. *Journal Clinival Microbiology*, v. 33, p. 2770-2773, 1995.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DOWIDAR, N.; MOESGAARD, F.; MATZEN, P. Clogging and other complications of endoscopic biliary endoprostheses. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 26, p.1132–1136, 1991.

EATON, T.J.; GASSON, M.J. A variant enterococcal surface protein Esp_{fm} in *Enterococcus faecium*, distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. *FEMS Microbiology Letter*, v. 216, p. 269-275, 2002.

- ELSNER, H.A.; SOBOTTKA, I.; MACK, D.; CLAUSSEN, M.; LAUFS, R.; WIRTH, R. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 19, n. 1, p. 39-42, 2000.
- EVERS, S.; CASADEWALL, B.; CHARLES, M.; DUTKA-MALEN, S.; GALIMAND, M.; COURVALIN, P. Evolution of structure and substrate specificity en D-Alanine:D-Alanine lidases and related enzymes. *Journal of Molecular Evolution*. v. 42, p. 706-712, 1996
- 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, p. 1302-1309, 1996.
- EVERS, S.; QUINTILIANI JR., R.; COURVALIN, P. Genetics of glycopeptide resistance in enterococci. *Microbiology Drug Resistance*, v. 2, p. 219-223, 1996.
- FACKLAM, R.R.; COLLINS, M.D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *Journal Clinical Microbiology*, v. 27, n. 4, p. 731-734, 1989.
- FARRAG, N.; ELTRINGHAM, I.; LIDDY, H. Vancomycin-dependent *Enterococcus faecalis*. *Lancet*, v. 348, p. 1581-1582, 1996.
- FINKS, J.; WELLS, E.; DYKE, T.L.; HUSAIN, N.; PLIZGA, L.; HEDDURSHETTI, R.; WILKINS, M.; RUDRIK, J.; HAGEMAN, J.; PATEL, J.; MILLER, C. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, Michigan, USA, 2007. (DISPATCHES) *Emerging Infectious Diseases*, 2009
- FRAIMOW, S. H.; JUNGKIND, D. L.; LANDER, D. W.; DELSO, D. R.; DEAN, J. L. Urinary tract infection with an *Enterococcus faecalis* isolate that requires vancomycin for growth. *Annals of Internal Medicine*, v. 121, p. 22-26, 1994.
- FRAM, D. ; CASTRUCCI, F.M.; TAMINATO, M.; GODOY-MARTINEZ, P. ; FREITAS, M.C.S. ; BELASCO, A.; SESSO, R.; PACHECO-SILVA, A.; PIGNATAR, A.C. Cross-transmission of vancomycin-resistant *Enterococcus* in patients undergoing dialysis and kidney transplant. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.43, n.1, p. 115-119, 2010.
- GALES, A.C.; SADER, H.S.; RIBEIRO, J.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; PIGNATARI, A.C. Antimicrobial Susceptibility of Gram-Positive Bacteria Isolated in Brazilian Hospitals Participating in the SENTRY Program (2005-2008). *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 13, n. 2, p. 90-98, 2009.
- GALLI, D.; LOTTSPEICH, F.; WIRTH, R. Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. *Molecular Microbiology*, v. 4, p. 895-904, 1990.
- GHOLIZADEH, Y.; PREVOST, M.; VAN BAMBEKE, F.; CASADEWALL, B.; TULKENS, P.M.; COURVALIN, P. Sequencing of the *ddl* gene and modeling of the mutated D-alanine:D-alanine ligase in glycopeptide-dependent strains of *Enterococcus faecium*. *Protein Society*, v. 10, n. 4, p. 836-844, 2001.

GIACOMETTI, A.; CIRIONI, O.; SCHIMIZZI, A.M.; DEL PRETE, M.S.; BARCHIESI, F.; D'ERRICO, M.M.; PETRELLI, E.; SCALISE, G. Epidemiology and microbiology of surgical wound infections. *Journal Clinical Microbiology*, v. 38, p. 918–922, 2000.

GILMORE, M.S.; SEGARRA, R.A.; BOOTH, M.C. An HlyB-type function is required for expression of the *Enterococcus faecalis* hemolysin/bacteriocin. *Infection and Immunity*, v. 58, p. 3914-3923, 1990.

GILMORE, M.S.; SEGARRA, R.A.; BOOTH, M.C.; BOGIE, C.P.; HALL, L.R.; CLEWELL, D.B. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *Journal Bacteriology*, v. 176, p. 7335-7344, 1994.

GILMORE, M. S.; FERRETTI, J. J. Microbiology, the thin line between gut comensal and pathogen. *Science*, v. 299, n. 5615, p. 1999-2002, 2003.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 26, n. 2, p. 163-171, 2002.

GIRIDHARA UPADHYAYA, P.M.; RAVIKUMAR, K.L.; UMAPATHY, B.L; Review of virulence factors of enterococcus : An emerging nosocomial pathogen Year : *Indian Journal of Medical Microbiology*, v. 27, n. 4, p. 301-305, 2009.

GOLD, H.S. Vancomycin-resistant enterococci: mechanisms and clinical observations. *Clinical Infection Diseases*, v. 33, p. 210-210, 2001.

GOLDMANN, D. Vancomycin resistant *Enterococcus faecium*: Headline News. *Infection control and Hospital Epidemiology*, Boston, v. 13, n. 12, p. 695-699, 1992.

GREEN, M.; SHLAES, J.H.; BARBADORA, K.; SHLAES, D.M. Bacteremia due to vancomycin-dependent *Enterococcus faecium*.. *Clinical Infection Diseases*, v. 20, p. 712-714, 1995.

GU, L.; CAO, B.; LIU, Y.; GUO, P.; SONG, S.; LI, R.; DAI, H.; WANG, C. A new Tn1546 type of VanB phenotype-vanA genotype vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in mainland China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 63, p. 70–75, 2009.

GUZMAN, C.A.; GUZMÀN, C.A.; PRUZZO, C.; LIPIRA, G.; CALEGARI, L. Role of adherence in pathogenesis of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection and endocarditis. *Infection and Immunity*, v. 57, p. 1834–1838, 1989.

HACKER, J.; KAPER, J.B.; Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Review of Microbiology*, v. 54, p. 641-679, 2000.

HALLE, E.; PADBERG, J.; ROSSEAU, S.; KLARE, I.; WERNER, G.; WITTE, W. Linezolid-Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Isolated from a Septic Patient: Report of First Isolates in Germany. *Infection*, v. 32, n. 3, p. 182-183, 2004.

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

Enterococcus strains result in high-level vancomycin resistance and low-level teicoplanin resistance. *FEMS Microbiology Letters*, v. 185, p. 247-254, 2000.

HAYDEN, M.K.; BONTEN, J.M.; BLOM, D.W.; LYLE, E.A.; VAN DE VIJVER, D.A.; WEINSTEIN, R.A. Reduction in acquisition of vancomycin-resistant *enterococcus* after enforcement of routine environmental cleaning measures. *Clinical Infection Diseases*, v.42, p.1552-1560, 2006.

HAYDEN, M.K.; BLOM, D.W.; LYLE, E.A.; MOORE, C.G.; WEINSTEIN, R.A. Risk of hand or glove contamination after contact with patients colonized with vancomycin-resistant *enterococcus* or the colonized patients' environment . *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 29, p. 149-154, 2008.

Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 29, n. 11, 2008.

HEIKENS, E.; BONTEN, M.J.; WILLEMS, R.J. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *Journal of Bacteriology* 189: 8233-8240, 2007.

HENRIQUE, P.M.; PALAZZO, I.C.V.; ZANELLA, R.C.; DARINI, A.L.C. Molecular characterization of enterococci harboring genotype and phenotype incongruence related to glycopeptide resistance isolated in Brazilian hospitals. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 301-305, 2008.

HERMAN, D.J.; GERDING, D.N. Screening and treatment of infections caused by resistant enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 35, p. 215-219, 1991.

HIDRON, A.I.; EDWARDS, J.R.; PATEL, J.; HORAN, T.C.; SIEVERT D.M.; POLLOCK, D.A.; FRIDKIN, S. K.; Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reporter to the national healthcare safety network at the center for disease control and prevention, 2006-2007. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. v. 29, n.11, p. 996-1011, 2008.

HIGAKI, S.; MOROHASHI, M.; YAMAGISHI, T. Isolation of *Enterococcus* species from infectious skin lesions. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, v. 28, p. 91–93, 2002.

HOTA, B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clinical Infection Diseases*, v. 39, p. 182–189, 2001.

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

IKE, Y.; HASHIMOTO, H.; CLEWELL, D. B. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infections. *Journal Clinical Microbiology*, v. 25, p. 1524-1528, 1987.

IWEN, P.C.; KELLY, D.M.; LINDER, J.; HINRICHS, S.H.; DOMINGUEZ, E.A.; RUPP, M.E.; PATIL, K.D. Change in prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from blood cultures over an 8-year period. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, p. 494-495, 1997.

JETT, B.D.; Jensen, H.G.; Nordquist, R.E.; Gilmore, M.S. Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infection Immunology*, v. 60, p. 2445-2452, 1992.

JOHNSON, A.P.; TYSALL, L., STOCKDALE, M.V.; WOODFORD, N.; KAUFMANN, M.E.; WARNER, M.; LIVERMORE, D.M.; ASBOTH, F.; ALLERBERGER, F.J. Emerging linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from two Austrian patients in the same intensive care unit. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 21, n. 10, p. 751-754, 2002.

JOYANES, P.; JOYANES, P.; PASCUAL, A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; HEVIA, A., PEREA, E.J. *In vitro* adherence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* to plastic biomaterials. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 5, n. 6, p. 382–386, 1999.

KACICA, M; McDONALD, L.C. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Morbidity and Mortality Weekly Report. MMWR-CDC*, v. 53, p. 322-323, 2004.

KAWALEC M, GNIADKOWSKI M, ZALESKA M, OZOROWSKI T, KONOPKA L, HRYNIEWICZ W. Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the phenotype VanB in a hospital in Warsaw, Poland: probable transmission of the resistance determinants into an endemic vancomycin-susceptible strain. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, p.1781-1787, 2001.

KEANE, P.F.; BONNER, M.C.; JOHNSTON, S.R.; ZAFAR, A.; GORMAN, S.P. Characterization of biofilm and encrustation on ureteric stents in vivo. *Brazilian Journal of Urology*, v. 73, p. 687–691, 1994.

KIRKPATRICK, B. D.; HARRINGTON, S. M.; SMITH, D.; MARCELLUS, D.; MILLER, C.; DICK, J.; KARANFIL, L.; PERL, T.M. An outbreak of vancomycin-dependent *Enterococcus faecium* in a bone marrow transplant unit. *Clinical Infectious Diseases*, v. 29, p.1268-1273, 1999.

KRISTICH , C.J.; LI, Y.H.; CVITKOVITCH, D.G.; DUNNY, G.M. Esp-Independent Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, v. 186, n.1, p. 154-163, 2004.

KOH, T.H.; HSU, L.Y.; CHIU, L.L.; LIN, R.V. Emergence of epidemic clones of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Singapore. *Journal Hospital Infection*, v. 63, p. 234-236, 2006.

KOLAR, M.; PANTUCEK, R.; VAGNEROVA, I.; SAUER, P.; KESSELOVA, M.; CEKANOVA, L.; KOUKALOVA, D.; DOSKAR, J.; RUZICKOVA, V. Prevalence of vancomycin-resistant *enterococci* in hospitalized patients and those living in the community in the Czech Republic. *New Microbiology*, v. 29, p. 121-125, 2006.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; JR, W.; WASHINGTON, C. *Diagnóstico Microbiológico- Texto e Atlas Colorido*. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

KOTZAMANIDIS, C.; ZDRAGAS, A.; KOURELIS, A.; MORAITOU, E.; PAPA, A.; YIANTZI, V.; PANTELIDOU, C.; YIANGOU, M. Characterization of vanA-type *Enterococcus faecium* isolates from urban and hospital wastewater and pigs. *Journal Applied Microbiology*, v.107, n. 3, p. 997-1005, 2009.

KREFT, B. et al. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infection and Immunity*, v. 60, p. 25–30, 1992.

LAI, M. H.; KIRSCH, D. R. Induction signals for vancomycin resistance encoded by the vanA gene cluster in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 40, p. 1645-1648, 1996.

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

LAUTENBACH, E.; BILKER, W.B.; BRENNAN, P.J. Enterococcal bacteremia: risk factors for vancomycin resistance and predictors of mortality. *Infection Control Hospital Epidemiology*, v. 20, p. 318–323, 1999.

LEAVIS, H. L. ROB J.L.; TOP, W.J.; SPALBURG, E.; MASCINI, E.M.; FLUIT, A.C.; HOEPELMAN, A.; NEELING, A.J.; BONTEN, M.J.M. Evolutionary insights in the emergence of epidemic and non-epidemic multi-resistant *Enterococcus faecium*. *Emerging Infectious Diseases*, v. 9, p. 1108-1115, 2003.

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

LECLERCQ, R.; DERLOT, E.; DUVAL, J. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *The New England Journal of Medicine*, v. 319, p.157-161, 1988.

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

LOW, Y.L.; JAKUBOVICS, N.S.; FLATMAN, J.C.; JENKINSON, H.F.; SMITH, A.W. Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 52, p. 113-119, 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, p. 703-706, 1995.

MAJUMDAR, A.; LIPKIN, G. W.; ELIOTT, T. S. J.; WHEELER, D. C. Vancomycin-dependent enterococci in a uraemic patient with sclerosing peritonitis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v.14, p.765-7, 1999.

MAK, A.; MILLER, M A.; CHONG, G.; MONCZAK, Y. Comparison of PCR and culture for screening of Vancomycin-Resistant Enterococci: highly disparate results for *vanA* and *vanB*. *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 12, p. 4136-4137, 2009.

MANSON, J.M.; SMITH, J.M.B.; COOK, G.M. Persistence of vancomycin-resistant in New Zeland Broilers after Discontinuation of avoparcin use. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 10, p. 5764-5768, 2004.

MARÍN, M.E.; MERA, J.R.; ARDUINO, R.C.; CORREA, A.P.; COQUE, T.M.; STAMBOULIAN D, MURRAY BE. First report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated in Argentina. *Clinical Infection Diseases*, v. 26, p.235-236, 1998.

MCKESSAR, S.J.; BERRY, A.M.; BELL, J.M.; TURNIDGE, J.D.; PATON, J.C. Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.44, p. 3224-3228, 2000.

MOELLERING, R.C. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clinical Infection Diseases*, v.14, p.1173-1178, 2000.

MOHAMED, J.A.; HUANG, D.B. Biofilm formation by enterococci. *Journal of Medical Microbiology*, v. 56; p. 1581–1588, 2007.

MONTERO, C.I.; STOCK, F.; MURRAY, P.R. Mechanisms of resistance to daptomycin in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, n. 3, p. 1167-1170, 2008.

MURDOCH, D.R.; MIRRETT, S.; HARRELL, L.J.; MONAHAN, J.S.; RELLER, L.B. Sequential emergence of antibiotic resistance in enterococcal blood-stream isolates over 25 years. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 46, p. 3676-3678, 2002.

MURRAY, B. E. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 3, p. 45-65, 1990.

MURRAY, B. E. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerging Infectious Diseases*, v. 4, n. 1, p. 37-47, 1998.

MURRAY, B. E.; WEINSTOCK, G. M. Enterococci: new aspects of an old organism. *Proceedings of the Association of American Physicians*, v. 111, p. 328-334, 1999.

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

MUNDY, L.M.; SAHM, D.F.; GILMORE, M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, n. 4, p. 513-522, 2000.

NAILOR, M.D.; SOBEL, J.D. Antibiotics for gram-positive bacterial infections: vancomycin, teicoplanin, quinupristin/dalfopristin, oxazolidinones, daptomycin, dalbavancin, and telavancin. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 23, n. 4, p. 965-982, 2009.

NALLAPAREDDY, S. R., K. V. SINGH, AND B. E. MURRAY. Construction of improved temperature-sensitive and mobilizable vectors and their use for constructing mutations in the adhesin-encoding acm gene of poorly trans-formable clinical *Enterococcus faecium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p.334–345, 2006.

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.

NALLAPAREDDY, S.R.; SINGH K.V.; OKHUYSEN, P.C.; MURRAY, B.E. A Functional Collagen Adhesin Gene, acm, in Clinical Isolates of *Enterococcus faecium* Correlates with the Recent Success of This Emerging Nosocomial Pathogen. *Infection and Immunity*, v. 76, n. 9, p. 4110–4119, 2008.

NAKAYAMA, J.; KARIYAMA, R.; KUMON, H. Description of a 23,9-kilobase chromosomal deletion containing a region encoding 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.

National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1992—June 2001, issued August 2001. *American Journal Infection Control*, v. 29, p.400-42, 2001.

NAVARRO, F.; COURVALIN, P. Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 38, p. 1788-1793, 1994.

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

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

OPREA, S.F.; ZAIDI, N.; DONABEDIAN, S.M.; BALASUBRAMANIAM, M.; HERSHBERGER, E.; ZERVOS M.J. Molecular and clinical epidemiology of vancomycin-resistant. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 53, p. 626-630, 2004.

OZOROWSKI, T.; KAWALEC, M.; ZALESKA, M.; KONOPKA, L.; HRYNIEWICZ, W. The effect of an antibiotic policy on the control of vancomycin-resistant enterococci outbreak and on the resistance patterns of bacteria isolated from the

blood of patients in a hematology unit . *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, v. 11, p. 119, 2009.

PATEL, R. Clinical impact of vancomycin-resistant *enterococci*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. v. 51, supl 3, p.13-21. 2003.

PARSEK, M.R.; SINGH, P K.. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, v. 57, p. 677–701, 2003.

PAULSEN, I.T.; BANERJEE, L.; MYERS, G.S.; NELSON, K.E.; SESHADRI, R.; REAS, T.D.; FOUTS, D.E.; EISEN, J.A.; GILL, S.R.; HEIDELBERG, J.F.; TETTELIN, H.; DODSON, R.J.; UMayAM, L.; BRINKAC, L.; BEANAN, M.; DAUGHERTY, S.; DEBOY, R.T.; DURKIN, S.; KOLONAY, J.; MADUPU, R.; NELSON, W.; VAMATHEVAN, J.; TRAN, B.; UPTON, J.; HANSEN, T.; SHETTY, J.; KHOURI, H.; UTTERBACK, T.; RADUNE, D.; KETCHUM, K.A.; DOUGHERTY, B.A.; FRASER, C.M.; Role of mobile DNA in the evolution of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*, v. 299, p. 2071-2074, 2003.

PERUGINI, M.R.E. Avaliação do impacto de medidas de intervenção no controle de *Enterococcus* spp. resistente a vancomicina em unidade de terapia intensiva. São Paulo, 2008. Tese. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

PILAI, S.K.; SAKOULAS, G.; GOLD, H.S.; WENNERSTEN, C.; ELIOPOULOS, G.M.; MOELLERING, R.C.J, INOUE, R.T. Prevalence of the *fsr* locus in *Enterococcus faecalis* infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 7, p. 2651-2652, 2002.

QU, T.; ZHANG, J.; ZHOU, Z.; WEI, Z.; YU, Y.; CHEN LI, Y.L. Heteroresistance to Teicoplanin in *Enterococcus faecium* Harboring the *vanA* Gene. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 47, n. 12, p. 4194–4196, 2009.

REYNOLDS, P.E.; COURVALIN, P. Vancomycin resistance by synthesis of precursors terminating in D-Alanyl-D-Alanine. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, p. 21-25, 2005.

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

RICE, L.B.; HUTTON-THOMAS, R.; LAKTICOVA, V. Beta-lactam antibiotics and gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant *enterococci*. *Journal of Infectious Diseases*, v. 189, p. 1113-1118, 2004.

ROSATO, A.; PIERRE, J.; BILLOT-KLEIN, D.; BUU-HOI, A.; GUTMANN, L. Inducible and constitutive expression of resistance to glucopeptides and vancomycin dependence in glycopeptide-resistant *Enterococcus avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 4, p.830-833, 1995.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D.B. Cocos Gram-positivos: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. e *Streptococcus pneumoniae* e os principais mecanismos de resistência in: *Resistência bacteriana: Interpretando o antibiograma*. São Paulo, Editora Atheneu, 2005.

ROSSNEY, A.S.; MCCONKEY, S.J.; KEANE, C.T. Vancomycin-dependent *Enterococcus*. *Lancet*, p. 349:430. 1997.

RUZON, F.I. Caracterização fenotípica e molecular de fatores de virulência de *Enterococcus faecium* de origem hospitalar. Londrina, 2009. Tese. Mestrado em Microbiologia. Universidade Estadual de Londrina.

SALGADO, C.D.; FARR, B.M.; Outcomes associated with vancomycin-resistant enterococci: a meta-analysis. *Hospital Epidemiology and Infection Control*, v. 24, p. 690-698, 2003.

SANDOE, J.A.T.; WITHERDEN I.R.; COVE J.H.; HERITAGE, J.; WILCOX, M.H. Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medical-device-related infection potential in vivo. *Journal of Medical Microbiology*, v. 52, p. 547-550, 2003.

SANDOE, J.A.; WITHERDEN, I.R.; AU-YEUNG, H.K.; KITE, P.; KERR, K.G.; WILCOX, M.H. Enterococcal intravascular catheter-related bloodstream infection: management and outcome of 61 consecutive cases. *Journal of Antimicrobial and Chemother*, 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, p. 2325-2330, 1997.

SCHABERG, D.R.; ZERVOS, M.J. Intergeneric and interspecies gene exchange in gram-positive cocci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 30, n. 6, p. 817-822, dez. 1986.

SCHLEIFER, K.H.; KLIPPER-BALZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 34, p. 31-34, 1984.

SCHULTSZ, C.; MEESTER, H.H.; KRANENBURG, A.M.; SAVELKOUL, P.H.; BOEIJEN-DONKERS, L.E.; KAISER, A.M.; DE BREE, R.; SNOW, G.B.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.J. Ultra-sonic nebulizers as a potential source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing an outbreak in a university tertiary care hospital. *Journal of Hospital Infection*. v. 55, p. 269-275, 2003.

SEEDAT, J.; ZICK, G.; KLARE, I.; KONSTABEL, C.; WEILER, N.; SAHLY, H. Rapid emergence of resistance to linezolid during linezolid therapy of an *Enterococcus faecium* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, n. 12, p. 4217-4219, 2006.

SGHIR, A.; GRAMET, G.; SUAU, A.; ROCHET, V.; POCHART, P.; DORE, J. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 2263-2266, 2000.

SHANKAR, V.; BAGHDAYAN, A.S.; HUYCKE, M.M.; LINDAHL, G.; GILMORE, M.S. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and Immunity*, v. 67, p. 193-200, 1999.

SHANKAR, N.; LOCKATELL, C.V.; BAGHDAYAN, A.S.; DRACHENBERG, C.; GILMORE, M.S.; JOHNSON, D.E. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infection and Immunity*, v. 69, 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.

SHERMAN, J.M. The streptococci. *Bacteriological Reviews*, v. 1, p. 3-97, 1937.

SIEVERT, D.M.; RUDRIK, J.T.; PATEL, J.B.; L. MCDONALD, C.; WILKINS, M.J. HAGEMAN, J.C. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002–2006. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, p. 668–674, 2008.

SINGH, K.V.; COQUE, T.M.; WEINSTOCK, G.M.; MURRAY, B.E. In vivo testing of an *Enterococcus faecalis* *efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 21, p. 323-331, 1998.

SNG, L.H.; CÓRNICO, N.; KNAPP, C.C.; LUDWIG M.D.; HALL, G.S.; WASHINGTON, J.A. Antimicrobial susceptibility testing of a clinical isolate of vancomycin-dependent enterococcus using D-alanine-D-alanine as a growth supplement. *American Journal of Clinical Pathology* v.109, p.399-403, 1998.

SU, Y.A.; SULAVIK, M.C.; HE, P.; MAKINEN, K.K.; MAKINEN, P.L.; FIEDLER, S.; WIRTH, R.; CLEWELL, D.B. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infection and Immunity*, v. 59, p. 415-420, 1991.

SONG, J.H.; KO, K.S.; OH, W.S.; PARK, S.; HEO, S.T.; KWON, K.T.; RYU, S.Y.; PECK, K.R.; LEE, N.Y. High frequency of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates with VanB phenotype and vanA genotype in Korean hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. v. 56, p. 401–406, 2006.

STEWART, B.; HALL, L.; DUKE, B.; BALL, D. Vancomycin-dependent enterococci: curious phenomenon or serious threat? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.40, p. 734-735, 1996.

TAMBYAH, P.A.; MARX, Nosocomial Infection with Vancomycin-dependent Enterococci. *Emerging Infectious Diseases*, p.10-7 , 2004.

TANNOCK, G.W.; COOK, G. Enterococci as members of the intestinal microflora of humans, p. 101-132. In: GILMORE, M. S. et al. Determination of *Enterococcus faecalis* *groESL* full-length sequence and application for species identification. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 9, p. 3326-3331, 2001.

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

- TENDOLKAR, P.M.; BAGHDAYAN, A.S.; GILMORE, M.S.; SHANKAR, N.; Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 10, p. 6032-6039, 2004.
- TENG, F.; KAWALEC, M.; WEINSTOCK, G.M.; HRYNIEWICZ, W.; MURRAY, B. An Enterococcus faecium Secreted Antigen, SagA, Exhibits Broad-Spectrum Binding to Extracellular Matrix Proteins and Appears Essential for E. faecium Growth. *Infection and Immunity*, v. 71, n.9, p. 5033-5041, 2003.
- TOLEDO-ARANA, A.; VALLE, J.; SOLANO, C.; ARRIZUBIETA, M.J.; CUCARELLA, C.; LAMATA, M.; AMORENA, B.; LEIVA, J.; PENADÉS, J.R.; LASA, I. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 4538-4545, 2001.
- TOP, J.; WILLEMS, R.; BONTEN, M. Emergency of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 52, p. 297-308, 2008.
- TORRES, C.; ESCOBAR, S.; PORTILLO, A.; TORRES, L.; REZUSTA, A.; RUIZ-LARREA, F.; REVILLO, M.J.; ASPIROZ, C.; ZARAZAGA, M. Detection of clonally related vanB2-containing *Enterococcus faecium* strains in two Spanish hospitals. *Journal of Medical Microbiology*, v. 55, p. 1237-1243, 2006.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 4. Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.
- UTTLEY, A.H.; COLLINS, C.H.; NAIDOO, J.; GEORGE, R.C. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*. v.1, p 57-58, 1988.
- VAN BAMBEKE, F.; CHAUVEL, M.; REYNOLDS, P.E.; FRAIMOW, H.Y.S.; COURVALIN, P. Vancomycin-Dependent *Enterococcus faecalis* Clinical Isolates and Revertant Mutants *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v. 43, n. 1, p. 41-47, 1999.
- VAN SCHAİK, W.; TOP, J.; RILEY, D.R. BOEKHORST, J., VRIJENHOEK, J.E.P., SCHAPENDONK, C.M.E.; HENDRICKX, A. P. A.; NIJMAN, I. J.; BONTEN, M.J.M.; TETTELIN, H.; WILLEMS, R.J.L. Pyrosequencing-based comparative enomeanalysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. *Biomedical Central Genomics*, 11:239, 2010
- VAN WAMEL, W.J.; HENDRICKX, A.P.; BONTEN, M.J.; TOP, J.; POSTHUMA, G.; WILLEMS, R.J.; Growth condition-dependent Esp expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. *Infection and Immunity* 75: 924-931, 2007
- VERGIS, E. N.; SHANKAR, N.; CHOW, J. W.; HAYDEN, M. D.; SNYDMAN, D. R.; ZERVOS, M. J.; LINDEN, P. K.; WAGNER, M. M.; MUDER, R. R. 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, n. 5, p. 570-575, 2002.

WEBB, G.F.; D'AGATA, E.M.; MAGAL, P.; RUAN, S. 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.; JECHOREK, R.P.; ERLANDSEN, S.L. Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. *Journal of Infectious Diseases*, v. 162, n. 1, p. 82-90, 1990.

WERNER, G.; KLARE, I.; SPENCKER, F.B.; WITTE, W. Intra-hospital dissemination of quinupristin/dalfopristin and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a paediatric ward of a German hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.52, n. 1, p. 113-115, 2003.

WERNER, G.; GFRÖRER, S.; FLEIGE, C.; WITTE, W.; KLARE, I. Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from a German ICU patient. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 61, p. 1182-1183, 2008a.

WERNER, G.; COQUE, T.M.; HAMMERUM, A.M, HOPE, R, HRYNIEWICZ, W. ; JOHNSON A.; KLARE,I.; KRISTINSSON, K.G, LECLERCQ, R.; LESTER, C.H, LILLIE M.; NOVAIS,C.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PEIXE, L. V, SADOWY, E.; SIMONSEN, G.S.; TOP, J. VUOPIO-VARKILA, J.; WILLEMS, R.J.; WITTE, W.; WOODFORD, N. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Eurosurveillance*. v. 13, n. 47, 2008b. Disponível em: www.eurosurveillance.org

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

WERNER, G., STROMMENGER, B., WITTE, W. Acquired vancomycin resistance in clinically relevant pathogens. *Future Microbiology*, v. 3, p. 547-562, 2008.

WESTENFELDER, G.O., PATERSON, P.Y.; REISBERG, B.E.; CARLSON, G.M. Vancomycin-streptomycin synergism in enterococcal endocarditis. *Journal Of the American Medical Association*, v. 223, p. 37-40, 1973.

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

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

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

WITTE, W.; KLARE, I. Glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* outside the hospitals: a commentary. *Microbial Drug Resistance*, v. 1, p. 259-263, 1995.

WOODFORD, N.; JOHNSON, A. P.; MORRISON, D.; HASTINGS, J. G. M.; ELLIOT, T. S. J.; WORTHINGTON, A; STEPHENSON, J.R.; CHIN, A.T.; TOLLEY, J.L. Vancomycin-dependent enterococci in the United Kingdom. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 33, p.1066. 1994.

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

WRIGHT, G.D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, p. 175-186, 2007.

YOWLER, C.J.; BLINKHORN, R.J.; FRATIANNE, R.B. Vancomycin-dependent enterococcal strains: case report and review. *Journal of Trauma*.v. 48, p.783-5, 2000.

ZENG, J.; TENG, F.; WEINSTOCK, G. M.; MURRAY, B. E. Translocation of *Enterococcus faecalis* strains across a monolayer of polarized human enterocyte-like T84 cells. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 3, p. 1149-1154, 2004.

4 TRABALHO CIENTÍFICO

Title: Vancomycin-dependent *Enterococcus faecium vanA*: characterization of the first case isolated at the University Hospital in Brazil.

Running title: Vancomycin Dependent *Enterococcus faecium*

Gilselena Kerbauy Lopes¹,
Sueli Fumie Yamada-Ogatta^{1,2}

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina,
Londrina, PR, Brasil.

ABSTRACT: In this study *Enterococcus faecium vanA* which grow only in the presence of vancomycin (VDEfm-UEL) was isolated from the feces of a patient receiving intravenous vancomycin therapy for MRSA. The isolated bacterium was also shown to be resistant to ampicillin, ciprofloxacin, chloramphenicol, erythromycin, levofloxacin, penicillin, rifampicin and teicoplanin. It also harbored the putative virulence genes *efaA*, *gelE* and *esp*. The vancomycin dependence seems to be associated with an insertion of one base pair nucleotide at the *ddl* gene sequence which resulted in a frame-shift mutation, introducing a premature stop codon. This is the first report of VDE isolation in a the University Hospital in Brazil.

Keywords: *Enterococcus faecium*. Vancomycin. Dependence. *VanA* genotype. Virulence factors.

INTRODUCTION

Over the last decades infections due to glycopeptides-resistant enterococci in healthcare-associated settings have been reported worldwide. Among enterococci, glycopeptides resistance is detected most commonly in *Enterococcus faecium*, which is often resistant to other classes of antimicrobials (TREITMAN et al., 2005; BIEDENBACH et al., 2007; DESHPANDE et al., 2007; GALES et al., 2009; BILLSTRÖM et al., 2010; PANESSO et al., 2010; PROTONOTARIOU et al., 2010),

¹ Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina

and this feature has resulted in limited therapeutic options. Besides the antimicrobial resistance, enterococci that require glycopeptides for growth have been isolated, particularly from patients on previous vancomycin therapy (FRAIMOW et al., 1994; WOODFORD et al., 1994; GREEN et al., 1995; DEVER et al., 1995; FARRAG; ELTRINGHAM; LIDDY, 1996; STEWART et al., 1996; ROSSNEY; McCONKEY; KEANE, 1997; SNG et al., 1998; KIRKPATRICK et al., 1999; MAJUMDAR et al., 1999; YOWLER; BLINKHORN; FRATIANNE, 2000; CHACHATY et al., 2001; TAMBYAH; MARX; MAKI, 2004; BERT et al., 2009).

This study reports the isolation and characterization of vancomycin dependent *Enterococcus faecium* (VDEfm) isolated from rectal swab of a patient who had received prolonged intravenous vancomycin therapy for the treatment of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. This is the first case of the isolation of VDEfm at the University Hospital of Londrina, Paraná Brazil.

Case Report

A 65-year-old female patient was admitted at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil, for surgery treatment of Reinke tumor. During six days she stayed in a nursing home to carry out the pre-operative analysis. After the surgical procedure, on day seven, she was transferred to the intensive care unit where she stayed during four days. Her clinical course was complicated by development of meningitis and sepsis on 5th day post surgery. MRSA was isolated from blood culture and according to antimicrobial susceptibilities of the etiological agent, intravenous vancomycin (500 mg every 6 hours) and meropenem (2,000 mg every 8 hours) were used during 22 days die infection treatment. At the 16th day of antimicrobial therapy, a rectal swab was taken from the patient as part of the hospital surveillance study for vancomycin-resistant *enterococci* (VRE). Colonies growing on VRE agar (Oxoid,

² Corresponding author: Sueli Fumie Yamada-Ogatta, Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia. Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380. CEP 86055-900. Tel: +55-43-3371-4297; fax: +55-43-3371-4788. e-mail: ogatta@uel.br

United Kingdom) supplemented with vancomycin 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were identified as *E. faecium* which was found to be growing around the glycopeptides-impregnated discs in the agar diffusion assay. The *E-test* further showed the bacteria's growth contiguous to the end of the strips containing the highest concentration of vancomycin (Figure 1). Administration of antibiotics was discontinued because therapy was complete and the subsequent blood culture was sterile. The patient has evolved to cure of infectious complication and left the hospital after 40 days of hospitalization. After 6 months rectal swab culture for VRE was negative, indicating that cessation of vancomycin leading to clearance of VRE.

MATERIALS AND METHODS

Hospital, Surveillance and Microorganism Isolation

The University Hospital of Londrina city is a 353-bed tertiary care center that serves the city of Londrina, besides several localities of Paraná, São Paulo and Mato Grosso do Sul states. The intensive care center houses 35 patients distributed in 17-beds for general, 6-beds for burn, 7-beds for neonatal and 5-beds for pediatric cases. Surveillance cultures of stool were carried out weekly for all patients housed in intensive care units and for all patients found to be colonized or infected with VRE, as recommended by Centers for Disease Control and Prevention-CDC (Management of Multi-drug Resistant Organisms in Healthcare Settings, 2006). A rectal swab was collected from the patient and the sample was inoculated on VRE broth (Oxoid, United Kingdom) supplemented with vancomycin 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ciprofloxacin 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and colistin 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$. After 18 h incubation at 37 °C, a 100- μl sample was spread on VRE agar supplemented with vancomycin 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The culture was further incubated at 37 °C for 24 h under aerobic conditions. Bacteria were kept in 20% glycerol-Brain Heart Infusion broth (Himedia, India) supplemented with vancomycin 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ at -80 °C.

Phenotypic Characterization

Species identification was based on the profile generated by the automated MicroScan WalkAway 96 Instrument (Dade MicroScan, USA). Concomitantly, colony morphology, Gram stain, catalase assay, tolerance to bile-aesculin, growth in 6.5% NaCl, and pyrrolidonyl aminopeptidase activity (PYRase) were also determined. The disk diffusion method on Muller Hinton agar medium (Himedia, India) was carried out according to Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2009) in order to determine the antimicrobial susceptibility profile for linezolid (30 μ g), teicoplanin (30 μ g), tigecycline (15 μ g) and vancomycin (30 μ g). However, bacteria's growth was detected around the glycopeptides-impregnated discs. These bacteria were further tested by vancomycin *E-test* (AB Biodisk, Sweden). The isolate was tested for susceptibility against 10 antimicrobials (ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, levofloxacin, linezolid, penicillin, rifampin, streptomycin, tetracycline and tigecycline), using the automated broth microdilution panel of the MicroScan WalkAway 96, according to the manufacturer's recommendations. The results reported here were those recorded after 24 h of incubation. The susceptibility breakpoints used were those recommended by CLSI. *E. faecalis* ATCC 29212 and ATCC51299 were used for quality control.

Genotypic Characterization

Vancomycin-resistance genotype and putative virulence genes *cyiA* (activator of cytolysin, a secreted protein with hemolysin/bacteriocin activities), *efaA* (*E. faecalis* antigen A, an endocarditis-associated virulence factor), *esp* (enterococcal surface protein), and *gelE* (gelatinase) (Table 1) were determined by PCR. The vancomycin resistance gene was determined using multiplex PCR described by Petrich et al., (1999). Genomic DNA of the enterococcal strain was extracted by the boiling method and the virulence genes were determined as described by Ruzon et al., (2010).

Cloning and Sequencing of the *ddl* gene

Amplification of the DNA fragments to be sequenced was carried out with primers based on *ddl* gene from *E. faecium* BM 4339 (GHOLIZADEH et al., 2001) and were the following ones: forward 5' GAGTAAATCACTGAACGATT 3' and reverse 5' GGTTACGCAATCACTCCAGCCT 3'. PCR was performed in a final volume of 20 μ L containing 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M of each dNTP, 10 μ mol of each forward and reverse primer, 2.5 U Pfx DNA polymerase (Invitrogen, Brazil), and 10 μ L of genomic DNA. The PCR product was purified from an agarose gel with Qlquick Gel Extraction Kit (Qiagen, USA) and was inserted into the pCR[®]2.1 vector using The Original TA Cloning Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. The insert was sequenced with 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA) using Big Dye[®] Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit. Sequence analysis was performed with the University of Wisconsin GCG software package (DEVERAUX et al., 1984). Search for homologies in the GenBank/EMBL databases was carried out with the Blast algorithm (ALTSCHUL et al., 1997). The deduced amino acid sequence was analyzed with the ExpASy-Prosit program of the Swiss Institute of Bioinformatics and the alignment of the sequences was carried out with the ClustalW of EMBL-EBI software package.

RESULTS AND DISCUSSION

The first VDE was isolated from the urine of a female patient receiving long-term vancomycin therapy (FRAIMOW et al., 1994). Since then, other cases of VDE isolation from different clinical specimens of patients receiving previous vancomycin therapy have been reported (WOODFORD et al., 1994; GREEN et al., 1995; DEVER et al., 1995; FARRAG; ELTRINGHAM; LIDDY, 1996; STEWART et al., 1996; ROSSNEY; McCONKEY; KEANE, 1997; SNG et al., 1998; KIRKPATRICK et al., 1999; MAJUMDAR et al., 1999; YOWLER; BLINKHORN; FRATIANNE, 2000; CHACHATY et al., 2001; TAMBYAH; MARX; MAKI, 2004; BERT et al., 2009). A *vanA* type *E. faecalis* vancomycin dependent from a non-human source was also reported by Tanimoto et al., (2005). In this case, VDE was isolated from chicken meat imported from China. For the cases of VDE infected/colonized patients, seven were in use of vancomycin to treat infections caused by non-enterococcal

infections: one for diarrhea caused by *Clostridium difficile* (DEVER et al., 1995), five for staphylococcal invasive infections (FARRAG; ELTRINGHAM; LIDDY, 1996; STEWART et al., 1996; SNG et al. 1998; MAJUMDAR et al., 1999; BERT et al., 1999), and one for bacteremia by *Corynebacterium* spp. resistant to β -lactam antibiotics (TAMBYAH; MARX; MAKI, 2004). The remaining cases, VDE was considered the immediate cause of infections.

In this study *E. faecium* UEL which grow only in the presence of vancomycin (VDEfm-UEL) was isolated from the feces of a patient receiving intravenous vancomycin therapy for MRSA. The detection of VDE was possible due the use of VRE medium supplemented with vancomycin which is used to detect VRE by the surveillance control staff. Besides glycopeptides, the isolated bacterium was also resistant to ampicillin, ciprofloxacin, chloramphenicol, erythromycin, levofloxacin, penicillin, rifampicin and teicoplanin. The mechanism of glycopeptide-resistance is mediated by *vanA* type gene. This is the first report of VDE isolation at the University Hospital in Brazil.

Although the isolated bacterium was considered colonizing *Enterococcus* according to CDC definitions of healthcare-associated infections (HORAN et al., 2008) it harbors the putative virulence *efaA*, *gelE* and *esp* genes, indicating the potential risk of infection. Several screenings using *E. faecium* isolates from different sources have shown the low prevalence of the virulence markers in this species (CAMARGO; GILMORE; DARINI, 2006; BILLSTRÖM et al., 2008, VANKERCKHOVEN et al., 2008, WORTH et al., 2008, HÄLLGREN et al., 2009). In contrast to those results, we previously demonstrated high prevalence of *E. faecium* harboring virulence genes isolated from different sources of the University Hospital of Londrina, including the *efaA*, *gelE* and *esp* genes (RUZON et al., 2010). The gene *efaA* encodes a 37-kDa cell wall protein which was first detected in the serum of a patient with *E. faecalis* endocarditis (AITCHISON et al., 1987). Studies with *E. faecalis efaA*⁻ mutant showed an attenuation of virulence in a mouse peritonitis model when compared to wild type strain, suggesting that EfaA is a virulence factor (SINGH et al., 1998a). The chromosomal *gelE* encodes an extracellular zinc metalloprotease that can cleave a number of substrates, including gelatin, casein, hemoglobin, fibrin, small peptides and components from human complement (MAKINEN; CLEWELL; MÄKINEN, 1989; SU et al., 1991; WATERS et al., 2003; PARK et al., 2007). In addition, this enzyme can participate in the translocation of

the bacteria across intestinal cell layers (ZENG et al., 2004) and can contribute to its virulence in a mouse peritonitis model (SINGH et al., 1998b). The presence of gene *esp*, that encodes an enterococcal surface protein, has been associated with colonization and persistence of enterococci during ascending urinary tract infection in mice (SHANKAR et al., 2001) and biofilm formation on abiotic surface (TENDOLKAR et al., 2004; HEIKENS; BONTEN; WILLEMS, et al., 2007).

Acquired vancomycin resistance in enterococci depends on the transcription of the operon *van* leading the production of alternative dipeptide D-Ala-D-Lac, instead of the D-Ala-D-Ala found in susceptible bacteria, and which can be used as a cell wall constituent (COURVALIN, 2006). On the other hand, the vancomycin dependence has been associated with mutations in the *ddl* gene which coding for D-Ala-D-Ala ligase, an enzyme that plays a key role in cell wall biosynthesis (VAN BAMBEKE et al., 1999; GHOLIZADEH et al., 2001; TANIMOTO et al., 2005; BERT et al. 2009). In absence of vancomycin, VDE are unable to biosynthesis both dipeptides, D-Ala-D-Ala or D-Ala-D-Lac, and could explain the glycopeptides dependence (VAN BAMBEKE et al., 1999). By using genomic DNA and a pair of primers derived from *ddl* gene from *E. faecium* BM4339 (GHOLIZADEH et al., 2001), a fragment of 1.15 kb was amplified and cloned into pCR® 2.1 vector. The nucleotide sequence of this fragment showed 98% identity to *ddl* gene from *E. faecium* BM4147 (EVERS et al., 1996). The alignment of both nucleotide sequences showed several mutations in *ddl* gene from VDEfm-UEL compared to that of VRE BM4147 strain and most of them are silent point mutations. The insertion of one adenosine monophosphate at the 710 position of *ddl* gene from VDEfm-UEL VDE-UEL resulted in a frame-shift mutation, introducing a premature stop codon at the 733 position of the sequence (Table 2), inactivating the enzyme.

The clinical impacts of VDE remain unclear; however this phenomenon raises important questions about the management of infections, mainly in the healthcare-associated setting. The current surveillance practices should be able to detect VDE and effective antimicrobial use policies are needed to prevent VDE, VRE and other MDROs.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPPG) of Universidade Estadual de Londrina (UEL). This work was part of the M.Sc. dissertation of G.K. Lopes which received fellowship from CAPES. We thank Dr. A. Leyva for English editing of the manuscript, and Ediel Clementino da Costa and Jussevania Pereira Santos for technical support.

Figure 1 – Growth dependence of *vanA* *Enterococcus faecium* UEL (VDEfm-UEL). Colonies growing around VAN-impregnated disc were further analyzed by E-test, that shows the bacteria growth contiguous to the end of the strips containing the highest concentration of vancomycin. Isolated colonies growing far from the strip may represent revertants of vancomycin-dependence.

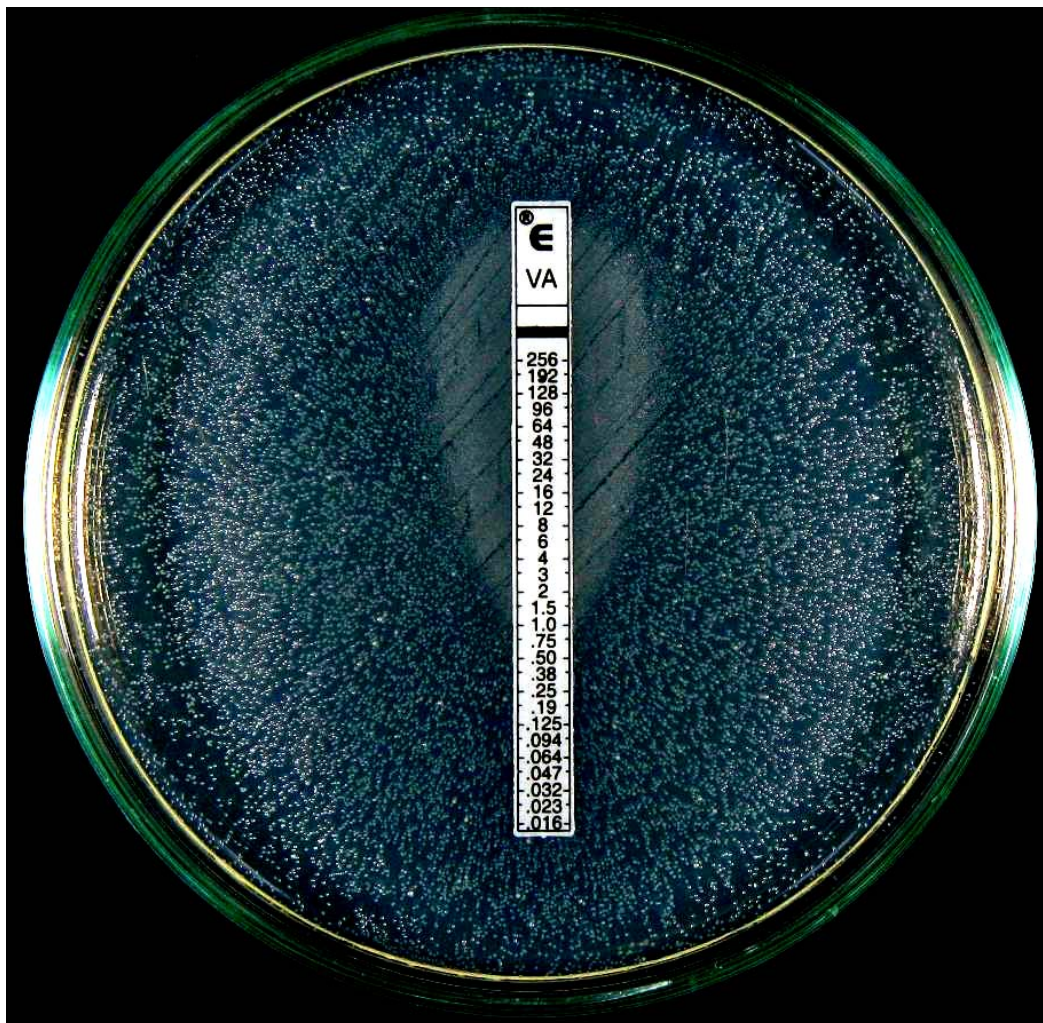


Table 1 – Description of primers used in PCR for detection of putative virulence markers and vancomycin-resistance genes of *Enterococcus faecium* from different sources.

Target gene ^a	Sequence of the primer (5' to 3')	Amplicon size (bp)	Accession number ^b
<i>cylA</i>	F: TAAGGTGATGGATGGGACAGATG	216	L37110.1
	R: GCGACTCATTTCCTGCTGATG		
<i>efaA</i>	F: TCGTACCAGTCGGAACAGATCCGCAT	235	AF042288
	R: GGTGAAGAACATACAAAAGCGGATCC		
<i>esp</i>	F: CTAATGCAAGTCCACGTCCAGTCG	243	AY322499
	R: GTGATGGAAACCCTGACGATAAAGAAG		
<i>gelE</i>	F: CGCCAAGTAAACACGGACAACCAGA	247	M37185
	R: GTGATGCGATGCTTGCTGCTGTC		
<i>vanA</i>	F: GCTGCGATATTCAAAGCTCA	545	*
	R: CAGTACAATGCGGCCGTTA		
<i>vanB</i>	F: ATGGGAAGCCGATAGTCTC	368	*
	R: GTTACGCCAAAGGACGAAC		

^a *cylA*: activator of cytolysin, *efaA*: *E. faecalis* antigen A, *esp*: enterococcal surface protein, *gelE*: gelatinase, *vanA* and *vanB*: vancomycin resistance type A and B, respectively. ^b The nucleotide sequences of *E. faecium* genes deposited in the GenBank/EMBL databases used for specific primer design. * According to Petrich et al. (1999).

Table 2 – Point mutations in the *ddl* gene from *Enterococcus faecium* vancomycin-dependent.

Mutation (BM4147 → VDEfm UEL)	Position	Mechanism	Amino acid change
GTT → GTG	91	Transversion	NC
GCT → GCC	113	Transition	NC
GGA → GGC	294	Transversion	NC
CAC → CAT	336	Transition	NC
CCT → CCG	582	Transversion	NC
AGC → AAC	615	Transition	Ser → Asp
- → A	710	Insertion	Frame-shift
TGT → CGT	739	Transition	Cys → Arg
CGA → TGA	760	Transition	NC
C → -	799	Deletion	Frame-shift
CCG → CCA	846	Transition	NC
GGA → GTA	911	Transversion	Gly → Val
ACG → CCG	988	Transversion	Thr → Arg
ATT → ATC	1062	Transition	NC
CAA → CAG	1065	Transition	NC
-- → CC	1155	Insertion	
	1156		

- Abcense / NC – not changed

REFERENCES

- AITCHISON, E.J. LAMBERT, P.A.; SMITH, E.G.; FARRELL, I.D. Serodiagnosis of *Streptococcus faecalis* endocarditis by immunoblotting of surface protein antigens. *Journal Clinical Microbiology*, v. 25, p. 211-215, 1987.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.
- BERT, F.; LEFLON-GUIBOUT, V.; LE GRAND, J.; BOURDON, N.; NICOLAS-CHANOINE, M. H. Émergence d'entérocoque dépendant de la vancomycine à la suite d'un traitement par glycopeptide: cas clinique et revue Emergence of vancomycin-dependent enterococci following glycopeptide therapy: Case report and review. *Pathologie Biologie*, v.57, p. 56–60, 2009.
- BIEDENBACH, D.J.; BELL, J.M.; SADER, H.S.; FRITSCH, T.R.; JONES, R.N.; TURNIDGE, J.D. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacterial isolates from the Asia-Pacific region and an in vitro evaluation of the bactericidal activity of daptomycin, vancomycin, and teicoplanin: a SENTRY Program Report (2003-2004). *Internal Journal Antimicrobial Agents*, v. 30, p. 143-149, 2007.
- BILLSTRÖM, H.; LUND, B.; SULLIVAN, A.; NORD, C.E. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 32, p. 374-377, 2008.
- BILLSTRÖM, H.; TOP, J.; EDLUND, C.; LUND, B. Frequent occurrence of multidrug-resistant CC17 *Enterococcus faecium* among clinical isolates in Sweden. *Journal of Applied Microbiology*, v. 108, n. 5, p.1810-1816, 2010.
- CAMARGO, I.L.; GILMORE, M.S.; DARINI, A.L. Multilocus sequence-typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*, v.12, p. 1123-1130, 2006.
- Centers for Disease Control and Prevention-CDC. *Guidelines for Management of Multidrug-Resistant Organisms In Healthcare Settings*, 2006. Advisory Committee (HICPAC). CDC *MMWR-Morb Mortal Wkly Rep*. 2006.
- CHACHATY, E.; CIUPEK, C.; SCHOEPFER, C.; HARTMANN, O.; TANCREDE, C. *Glycopeptide-dependent vanA Enterococcus faecium bacteremia after prolonged treatment with teicoplanin*. In: Program and abstracts of the 38th interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy; San Diego, p. 94, 2001.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Approved standard M100-S20-U— 2009.
- COURVALIN, P. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clinical Infection Disease*, v. 42, suppl. 1, p. S25-S34, 2006.

DESHPANDE, L.M.; FRITSCH, T.R.; MOET, G.J.; BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N. 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.

DEVER, L.L.; SMITH, S.M.; HANDWERGER, S., ENG, R.H.K. Vancomycin-dependent *Enterococcus faecium* isolated from stool following oral vancomycin therapy. *Journal Clinical Microbiology*, v. 33, p. 2770-2773, 1995.

DEVEREUX, J.; HAEBERLI, P.; SMITHIES, O. *Nucleic Acids Research*. v. 12, p. 387-395, 1984.

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, p. 1302-1309, 1996.

FARRAG, N.; ELTRINGHAM, I.; LIDDY, H. Vancomycin-dependent *Enterococcus faecalis*. *Lancet.*, v. 348, p. 1581-1582, 1996.

FRAIMOW, S. H.; JUNGKIND, D. L.; LANDER, D. W.; DELSO, D. R.; DEAN, J. L. Urinary tract infection with an *Enterococcus faecalis* isolate that requires vancomycin for growth. *Annals of Internal Medicine*, v. 121, p. 22-26, 1994.

GALES, A.C.; SADER, H.S.; RIBEIRO, J.; ZOCCOLI, C.; Barth, A.; Pignatari, A.C. Antimicrobial Susceptibility of Gram-Positive Bacteria Isolated in Brazilian Hospitals Participating in the SENTRY Program (2005-2008). *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 13, n. 2, p. 90-98, 2009.

GHOLIZADEH, Y.; PREVOST, M.; VAN BAMBEKE, F.; CASADEWALL, B.; TULKENS, P.M.; COURVALIN, P. Sequencing of the *ddl* gene and modeling of the mutated D-alanine:D-alanine ligase in glycopeptide-dependent strains of *Enterococcus faecium*. *Protein Science*, v. 10, n. 4, p. 836-844, 2001.

GREEN, M.; SHLAES, J.H.; BARBADORA, K.; SHLAES, D.M. Bacteremia due to vancomycin-dependent *Enterococcus faecium*. *Clinical Infectious Diseases*, v. 20, p. 712-714, 1995.

HÄLLGREN, A.; CLAEISSON, C.; SAEEDI, B.; MONSTEIN, H.J.; HANBERGER, H.; NILSSON, L.E. Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of clinical origin. *International Journal of Medical Microbiology* doi: 10.1016/j.ijmm.2008.10.001, 2008.

HEIKENS, E.; BONTEN, M.J.; WILLEMS, R.J. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *Journal of Bacteriology*, v. 189, p. 8233-8240, 2007.

HORAN, T.C.; ANDRUS, M.; DUDECK, M.A. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *American Journal of Infection Control*, v. 36, p. 309-332. 2008.

KIRKPATRICK, B. D.; HARRINGTON, S. M.; SMITH, D.; MARCELLUS, D.; MILLER, C.; DICK, J.; KARANFIL, L.; PERL, T.M. An outbreak of vancomycin-dependent *Enterococcus faecium* in a bone marrow transplant unit. *Clinical Infectious Diseases*, v.29, p.1268-1273, 1999.

MAJUMDAR, A.; LIPKIN, G. W.; ELIOTT, T. S. J.; WHEELER, D. C. Vancomycin-dependent enterococci in a uraemic patient with sclerosing peritonitis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 14, p.765-167, 1999.

MÄKINEN, P.L.; CLEWELL, D.B.; AN, F.; MÄKINEN K.K. Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10). *Journal of Biological Chemistry*, v. 264, p. 3325-3334, 1989.

PANESSO, D.; REYES, J.; RINCÓN, S.; DÍAZ, L.; GALLOWAY-PEÑA, J.; ZURITA, J.; CARRILLO, C.; MERENTES, A.; GUZMÁN, M.; ADACHI, J.A.; MURRAY, B.E.; ARIAS, C.A. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in South American hospitals. *Journal Clinical Microbiology*. v. 48, n. 5, p.1562-1569, 2010.

PARK, S.Y.; KIM, K.M.; LEE, J.H.; SEO, S.J.; LEE, I.H. Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infection and Immunity*. v. 75, p. 1861-1869, 2007.

PETRICH, A.K.; LUINSTR, K.E.; GROVES, D.; CHERNESKY, M.A.; MAHONY, J.B. Direct detection of *vanA* and *vanB* genes in clinical specimens for rapid identification of vancomycin resistant enterococci (VRE) using multiplex PCR. *Molecular and Cellular Probes*, v. 13, p. 275-281, 1999.

PROTONOTARIOU, E.; DIMITROULIA, E.; POURNARAS, S.; PITIRIGA, V.; SOFIANO, D.; TSAKRIS, A. Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Greece between 2002 and 2007. *Journal Hospital Infection*, v.75, n. 3, p. 225-227, 2010.

ROSSNEY, A.S.; MCCONKEY, S.J.; KEANE, C.T. Vancomycin-dependent *Enterococcus*. *Lancet*, p. 349:430. 1997.

RUZON, F.I.; PAULA, S.B.; KANOSHIKIA, R.L.; SANTOS, J.P.; LOPES, G.K.; KOBAYASHI, R.K.T.; YAMAUCHI, L.M.; PERUGINI, M.R.E.; OGATTA, S.F.Y. Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* *vanA* isolated from different sources at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. *Journal of Microbiology* (submetido, 2010)

SHANKAR, N.; LOCKATELL, C.V.; BAGHDAYAN, A.S.; DRACHENBERG, C.; GILMORE, M.S.; JOHNSON, D.E. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infection and Immunity*, v. 69, p. 4366–4372, 2001.

SINGH, K.V.; COQUE, T.M.; WEINSTOCK, G.M.; MURRAY, B.E. *In vivo* testing of an *Enterococcus faecalis* *efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 21, p. 323-331, 1998a.

SINGH, K.V.; Qin, X.; Weinstock, G.M.; Murray, B.E. Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *Journal of Infection Disease*, v. 178, p. 1416-1420, 1998b.

SNG, L.H.; CÓRNICO, N.; KNAPP, C.C.; LUDWIG M.D.; HALL, G.S.; WASHINGTON, J.A. Antimicrobial susceptibility testing of a clinical isolate of vancomycin-dependent enterococcus using D-alanine-D-alanine as a growth supplement. *American Journal of Clinical Pathology*, v.109, p.399-403, 1998.

STEWART, B.; HALL, L.; DUKE, B.; BALL, D. Vancomycin-dependent enterococci: curious phenomenon or serious threat? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.40, p. 734-735, 1996.

SU, Y.A.; SULAVIK, M.C.; HE, P.; MAKINEN, K.K.; MAKINEN, P.L.; FIEDLER, S.; WIRTH, R.; CLEWELL, D.B. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infection and Immunity*, v. 59, p. 415-420, 1991.

TAMBYAH, P.A.; MARX, J.A.; MAKI, D.G. Nosocomial Infection with Vancomycin-dependent Enterococci. *Emerging Infectious Diseases*, v. 10, n.7, p.1277-12781, jul. 2004.

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

TENDOLKAR, P.M.; BAGHDAYAN, A.S.; GILMORE, M.S.; SHANKAR, N.; Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 10, p. 6032-6039, 2004.

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

VAN BAMBEKE, F.; CHAUVEL, M.; REYNOLDS, P.E.; FRAIMOW, H.Y.S.; COURVALIN, P. Vancomycin-Dependent *Enterococcus faecalis* Clinical Isolates and Revertant Mutants *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*., v. 43, n. 1, p. 41-47, 1999.

VANKERCKHOVEN, V.; HUYS, G.; VANCANNEYT, M.; SNAUWAERT, C.; SWINGS, J.; KLARE, I.; WITTE, W.; VAN AUTGAERDEN, T.; CHAPELLE, S.; LAMMENS, C.; GOOSSENS, H. Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, p. 4247-4255, 2008.

WATERS, C.M.; ANTIPORTA, M.H.; MURRAY, B.E.; DUNNY, G.M.; Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *Journal of Bacteriology*, v. 185, p. 3613-3623, 2003.

WOODFORD, N.; JOHNSON, A. P.; MORRISON, D.; HASTINGS, J. G. M.; ELLIOT, T.S.J.; WORTHINGTON, A; STEPHENSON, J.R.; CHIN, A.T.; TOLLEY, J.L. Vancomycin-dependent enterococci in the United Kingdom. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 33, p.1066, 1994.

WORTH, L.J.; SLAVIN, M.A.; VANKERCKHOVEN, V.; GOOSSENS, H.; GRABSCH, E.A.; THURSKY, K.A. 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.

YOWLER, C.J.; BLINKHORN, R.J.; FRATIANNE, R.B. Vancomycin-dependent enterococcal strains: case report and review. *Journal of Trauma*. v. 48, p.783-5, 2000.

ZENG, J.; TENG, F.; WEINSTOCK, G. M.; MURRAY, B. E. Translocation of *Enterococcus faecalis* strains across a monolayer of polarized human enterocyte-like T84 cells. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 3, p. 1149-1154, 2004.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A significância clínica da cepa VDEfm reflete as dificuldades no isolamento destas cepas, que raramente são identificadas nas análises laboratoriais convencionais, tendo em vista as características particulares de nutrição deste mutante que requer para o seu crescimento um meio suplementado com D-Ala-D-Ala, vancomicina ou outro indutor dos genes de resistência *van* (Van Bambeke, 1999). A falha na identificação impossibilita descontinuidade do uso da vancomicina, levando a falha terapêutica.

O isolamento de cepa dependente de antimicrobiano nos atenta para a importante prática do controle das infecções associadas aos serviços de saúde, que deve ser estruturada em uma política efetiva no controle do uso de antimicrobianos, somado a vigilância dos microrganismos multi-drogas resistentes em parceria a um laboratório capacitado a identificar as características fenotípicas de resistência e também dependência aos antimicrobianos, sustentando uma rotina de identificação precoce dos isolados MDRO para o manejo adequado do tratamento e adoção precoce de medidas de precaução.

ANEXOS

ANEXO I

Dados Complementares

Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos do gene *ddl* de *E. faecium* dependente de vancomicina UEL (VDE-UEL). com a sequência homóloga de *E. faecium* BM4147 resistente a vancomicina genótipo vanA). As letras em negrito correspondem aos aminoácidos conservados que apresentam papel importante na atividade enzimática.

```

VDE-UEL      LKITLLYGGRSAEHEVSILSAFVSLNAIYYNYYQVQLVFIITKEGQWVKGPLLTEKPASKD 60
BM4147      LKITLLYGGRSAEHEVSILSAFVSLNAIYYNYYQVQLVFIITKEGQWVKGPLLTEKPASKD 60
*****

VDE-UEL      VLHLSWDPSGQTEEGFTGKVINPGEIKEEGAIVFPVLHGPNGEDGTIQGFLETLNMPYVG 120
BM4147      VLHLSWDPSGQTEEGFTGKVINPGEIKEEGAIVFPVLHGPNGEDGTIQGFLETLNMPYVG 120
*****

VDE-UEL      AGVLTSAACAMDKIMTKYILQAAGVPQVPYVPVLKNQWKENPKKVFQCEGSLLYPMFVKP 180
BM4147      AGVLTSAACAMDKIMTKYILQAAGVPQVPYVPVLKNQWKENPKKVFQCEGSLLYPMFVKP 180
*****

VDE-UEL      ANMGSSVGITKAENREELQNALATAYQYDSRAIVEQGIARENRSCCIRKRRSDDFAWSR 240
BM4147      ANMGSSVGITKAENREELQNALATAYQYDSRAIVEQGIAREIEVAVLGNEDVRTTLPGE 240
*****
. . : : . .

VDE-UEL      KRRSILLS---KYINNKIEMQIPAEVPEEVYQKAQEYAKLAYTMLGGSVLSRCDFFLTN 296
BM4147      VVKDVAFYDYEAKYINNKIEMQIPAEVPEEVYQKAQEYAKLAYTMLGGSGLSRCDFFLTN 300
: . :      *****

VDE-UEL      KNEFLNELNSMPGFPEFSMYPLLWENMGLKYGDLEELIQLGMNRYHQRSFFFEKNERE 356
BM4147      KNEFLNELNSMPGFTEFSMYPLLWENMGLKYGDLEELIQLGMNRYHQRSFFFEKNE-- 358
*****

VDE-UEL      IKKRLELRN 365
BM4147      -----

```

ANEXO II

Manuscrito em fase de redação

Título: Formação de biofilme por *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina em cateter urinário de longa permanência

Introdução: As infecções urinárias relacionadas a cateteres representaram 30% das infecções reportadas ao *National Nosocomial Infections Surveillance* (NNIS) entre os anos de 2006 e 2007. *Enterococcus* spp foi isolado em 14,9% dos casos, e classificado como o terceiro agente etiológico mais freqüente. *E. faecium* foi a espécie mais frequentemente isolada, entre elas 81% apresentaram resistência a vancomicina. As infecções relacionadas a cateteres estão intimamente associadas a capacidade de formação de biofilme pelos microorganismos.

Objetivo: Analisar a formação de biofilme em cateter ureteral de longa permanência por *E. faecium* resistente a vancomicina isolado de infecção urinária (VREfm-UEL) de paciente internado no Hospital Universitário de Londrina, Paraná, Brasil; Caracterizar o perfil de sensibilidade e detectar os genótipos de virulência.

Método: Determinação da curva de crescimento em Agar Muller-Hinton por contagem indireta do número de unidades formadoras de colônias (UFC) nos tempos 6, 12 e 24 h; Caracterização do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos (ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina, estreptomicina, gentamicina, tetraciclina, rifampicina e vancomicina) pelo método de microdiluição em caldo. Detecção dos genes que codificam fatores de virulência (*esp*, *geIE*, *cyIA*, *efaA*) e resistência (*vanA*) por PCR; Avaliar por microscopia eletrônica de varredura os aspectos morfológicos durante a formação do biofilme por VREfm.

Resultados: A fase de crescimento exponencial de VREfm-UEL foi identificada em 18 h de crescimento (Figura 1). A cepa apresentou fenótipo de resistência a ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina, estreptomicina, tetraciclina e sensibilidade a rifampicina e gentamicina. O genótipo de resistência a vancomicina foi determinado pelo gene *vanA*. Foram detectados genes de virulência para citolisina (*cyIA*) e proteína de superfície de enterococos (*esp*), relacionada a formação de biofilme. O isolado foi capaz de aderir e formar biofilme na superfície de poliestireno e látex siliconado (Figura2).

Conclusão: As características fenotípicas e genotípicas da cepa VREfm-UEL podem contribuir para formação de biofilme, e conseqüente desenvolvimento de infecção. Seu perfil de resistência limita as opções terapêuticas e pode somar mais um agravante a infecção.

Figura 1 – Curva de crescimento de VREfm-UJEL. A bactéria foi cultivada em caldo BHI a 37 °C durante 6, 12 e 24 h. A determinação do número de unidades formadoras de colônias foi realizada em meio BHI ágar.

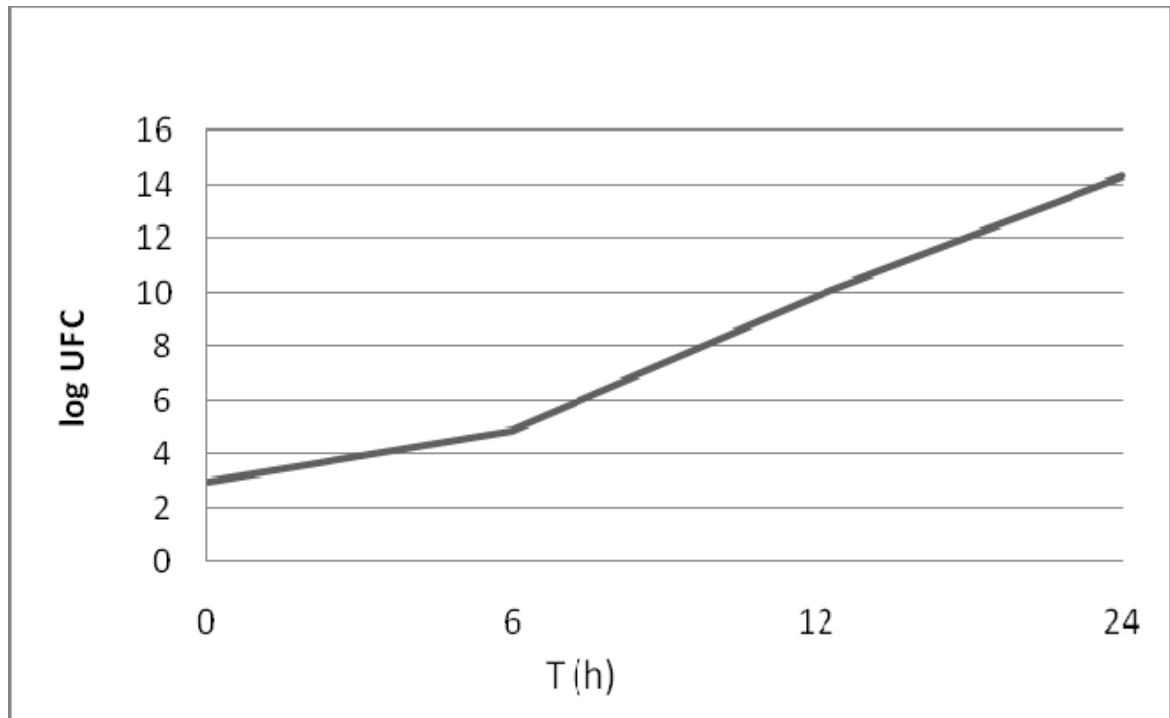


Figura 2 – Análise por microscopia eletrônica de varredura da formação de biofilme por VREfm-UEL. O biofilme foi gerado pelo crescimento em 24 horas em cateter de látex siliconizado. A mesma área é mostrada nas seis imagens nas respectivas ampliações: x40 (A), x500 (B), x1000 (C), x2000 (D), x3000 (E), x5000 (F).

