



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUDMILA VILELA PEREIRA GOMES

***ENTEROCOCCUS FAECIUM* RESISTENTES A
VANCOMICINA ISOLADOS NO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DE LONDRINA-PR:
PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS,
VIRULÊNCIA E GENOTIPAGEM**

LUDMILA VILELA PEREIRA GOMES

***ENTEROCOCCUS FAECIUM* RESISTENTES A
VANCOMICINA ISOLADOS NO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DE LONDRINA-PR:
PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS,
VIRULÊNCIA E GENOTIPAGEM**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Curso de Pós Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta.

Londrina
2013

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G633e Gomes, Ludmila Vilela Pereira.

Enterococcus faecium resistentes a vancomicina isolados no Hospital Universitário de Londrina-PR : perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, virulência e genotipagem / Ludmila Vilela Pereira Gomes. – Londrina, 2013.
82 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, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Enterococcus – Teses. 2. Bactérias gram-positivas – Teses. 3. Genética bacteriana – Teses. 4. Virulência (Microbiologia) – Teses. 5. Drogas – Resistência em microorganismos – Teses. 6. Microbiologia médica – Teses. I. Ogatta, Sueli Fumie Yamada. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579.86

LUDMILA VILELA PEREIRA GOMES

***ENTEROCOCCUS FAECIUM* RESISTENTES A VANCOMICINA
ISOLADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE LONDRINA-PR:
PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS, VIRULÊNCIA E
GENOTIPAGEM**

Dissertação de Mestrado apresentado 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.
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dr. Juscélio Donizete Cardoso
Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR

Londrina, 18 de abril de 2013.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por conceder a realização desse trabalho e abençoar o meu caminho;

À minha família, pela paciência, apoio e compreensão;

À minha orientadora, Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta, por sua confiança, incentivo e apoio;

À Profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi, pela contribuição e apoio;

Ao Prof. Alexandre Tadachi Morey, pela paciência, apoio, compreensão e amizade;

Aos mestrandos e graduandos do laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos Jussevania Pereira dos Santos, Caio Ferreira de Oliveira e Wallace Cardoso de Matos, pelo apoio, incentivo e amizade;

Ao pessoal do laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, pela colaboração.

GOMES, Ludmila Vilela Pereira Gomes. ***Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina isolados no Hospital Universitário de Londrina-PR: perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, virulência e genotipagem.** 2013. 82 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. 2013.

RESUMO

Enterococcus faecium resistente à vancomicina (VRE) é um importante agente de infecções associadas aos serviços de assistência à saúde humana. *E. faecium* pertencente a linhagem genética denominada CC17 [*clonal complex* 17] tem sido descrito mundialmente. Este complexo é um exemplo de processo evolutivo cumulativo no qual a resistência adquirida à ampicilina é seguida pela aquisição de elementos adaptativos como genes de resistência e virulência, contribuindo para a permanência destas bactérias em humanos e em ambientes hospitalares. Várias moléculas contribuem para a virulência de cepas adaptadas ao hospedeiro e dentre elas destacam-se *efaA* - antígeno a de *Enterococcus faecalis* associado a endocardite (gene *efaA*: *enterococcus faecalis* antigen a); *acm* - adesina que se liga ao colágeno (gene *acm*: adhesin of collagen from *enterococcus faecium*); gelatinase (gene *gelE*); citolisina (gene *cyl*); hialuronidase (gene *hyl*); proteína de superfície (gene *esp*); fator de agregação (gene *asa1*). Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina isolados no Hospital Universitário de Londrina (PR) quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, potencial de virulência e genótipo. O perfil de sensibilidade antimicrobiana foi analisado pelo método de difusão em disco, e todos os isolados mostraram-se resistentes à vancomicina, teicoplanina, ampicilina, eritromicina e ciprofloxacina. Apenas os genes *efaA*, *esp*, e *gelE* foram comumente encontrados em isolados de *E. faecium*, e a prevalência foi a seguinte: *efaA*, 100%; *esp* 75% e *gelE* 41,7%. A presença dos genes *asa1*, *acm*, *hyl* e o genótipo de resistência a eritromicina (*ermB*) foi detectada por PCR. O gene *asa1* estava presente em quatro (40%) isolados, enquanto que os genes *acm* e *hyl* não foram detectados nos isolados. A atividade de hialuronidase em meio BHI contendo hialuronato de sódio não foi observada para nenhum isolado. Alta diversidade genética foi observada entre os isolados pela metodologia de REP-PCR, no qual os isolados foram divididos em 7 grupos. Através da genotipagem por meio da metodologia MLST foi possível agrupar os isolados em 6 STs (“*sequence types*”) distintos (ST-203, ST-412, ST-596, ST-658, ST-730, ST-742). O ST-412 foi o mais frequente entre os isolados VREs analisados neste estudo, que pertence ao Complexo Clonal 17 (CC17). A presença desse complexo clonal corrobora a importância de medidas para identificação e controle desse microrganismo em serviços relacionados à assistência à saúde. O complexo clonal CC17 foi detectado no Hospital Universitário de Londrina, assim como em outros hospitais do Brasil. É importante ressaltar que os sistemas de controle de infecções relacionadas aos serviços de saúde devem ser capazes de identificar esse micro-organismo para que medidas adequadas de controle sejam implantadas.

Palavras-chave: *Enterococcus faecium*. Fatores de virulência. Genotipagem. MLST. CC17.

GOMES, Ludmila Vilela Pereira Gomes. **Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated in the University Hospital of Londrina-PR: genotypic diversity, antimicrobial resistance and virulence traits.** 2013. 82 p. (M.Sc. dissertation microbiology). Universidade Estadual de Londrina. 2013.

ABSTRACT

Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) is an important agent of infections associated with support services to human health. *E. faecium* belonging to CC17 genetic lineage called [clonal complex 17] have been described worldwide. This complex is an example of cumulative evolutionary process in which acquired resistance to ampicillin is followed by acquisition of adaptive elements such as resistance and virulence genes, contributing to the permanence of these bacteria in humans and in a hospital environment. Several molecules contribute to the virulence and host-adapted strains among which stand out *efaA* - the antigen of *E. faecalis* endocarditis associated (gene *efaA*: *Enterococcus faecalis* antigen a); *acm* - adhesin which binds to collagen (*acm* gene: adhesin of collagen from *Enterococcus faecium*), gelatinase (*gelE* gene); cytolysin (*cyl* gene), hyaluronidase (*hyl* gene); surface protein (*esp* gene); aggregation factor (gene *asa1*). The objective of this work was to characterize vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated in the University Hospital of Londrina (PR) as the profile of antimicrobial susceptibility, virulence potential and genotype. The antimicrobial susceptibility profile was analyzed by the disk diffusion method, and all isolates were resistant to vancomycin, teicoplanin, ampicillin, erythromycin and ciprofloxacin. Only genes *efaA*, *esp*, and *gelE* were commonly found in isolates of *E. faecium* and prevalence was as follows: *efaA*, 100%, *esp* 75% and *gelE* 41.7%. The presence of genes *asa*, *acm*, *hyl* and genotype for resistance to erythromycin (*ermB*) was detected by PCR. *asa1* gene was present in four (40%) isolated as the *acm* and *hyl* genes were not detected in these isolates. The activity of hyaluronidase on BHI containing sodium hyaluronate was not observed for any isolated. High genetic diversity was observed among isolates by REP-PCR methodology, in which the isolates were divided into 7 groups. Through genotyping by MLST methodology was possible to group the isolates into 6 STs ("sequence types") distinct (ST-203, ST-412, ST-596, ST-658, ST-730, ST-742). The ST-412 was the most frequent among isolates VREs analyzed in this study, belonging to clonal complex 17 (CC17). The presence of this clonal complex corroborates the importance of measures to identify and control this microorganism in services related to health care. The clonal complex CC17 was detected in the Londrina University Hospital, as well as other hospitals in Brazil. Importantly, the systems of infection control related to health services should be able to identify this micro-organism that adequate control measures are implemented.

Key words: *Enterococcus faecium*. Genotypic diversity. Virulence factors. MLST. CC17.

LISTA DE ABREVIATURAS

CC17	Complexo Clonal 17
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute
D-ALA	Dextrógino Alanina
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
L-Ala	Levógiro Alanina
MDRO	Multidrug-Resistant Organisms
MLST	Multilocus Sequence Typing
MR	Microrganismos Multirresistentes
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
REP-PCR	Reação em cadeia da polimerase de sequências palindrômicas extragênicas repetitivas
VRE	Vancomycin Resistance Enterococi.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DA LITERATURA	10
	2.1 <i>Enterococcus faecium</i>: de comensal a importante patógeno humano adaptado ao ambiente hospitalar	10
	2.2 Resistência a vancomicina e fatores de virulência	13
3	OBJETIVOS	21
	3.1 Objetivo geral	21
	3.1 Objetivos específicos	21
	REFERÊNCIAS	22
5	TRABALHO CIENTÍFICO 1	31
6	TRABALHO CIENTÍFICO 2	56
7	CONCLUSÃO	82

1 INTRODUÇÃO

Os enterococos fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal de seres humanos e de animais. Embora sejam considerados micro-organismos de baixo potencial de virulência, os enterococos vêm se destacando nas últimas duas décadas como importantes agentes etiológicos de Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde IRAS (SOOD et al., 2008, HIDRON et al., 2008; WOODFORD, 2009).

Algumas cepas têm potencial elevado para colonização nos tecidos do hospedeiro, persistindo por longos períodos, podendo invadir os mesmos e causar infecção quando em presença de fatores de risco. *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, são as espécies de maior importância clínica. Particularmente para *E. faecium* isso parece ocorrer pelo fato de serem resistentes a múltiplos antimicrobianos, inclusive à vancomicina (WOODFORD et al., 2009). Este cenário é preocupante, principalmente porque a vancomicina é o antimicrobiano de escolha para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias Gram-positivas, entre elas, os enterococos (NAILOR; SOBEL 2011).

A transmissão em ambiente hospitalar de *Enterococcus* spp., resistente a vancomicina (VRE) pode ocorrer diretamente entre os pacientes, indiretamente pelas mãos dos profissionais do hospital ou por contaminação ambiental (MOELLERING, 1998). A contaminação ambiental por VRE ocorre especialmente nos ambientes onde há paciente colonizado pelo micro-organismo com diarreia. Relatos indicam que a limpeza ou desinfecção do ambiente pode reduzir a incidência de colonização ou infecção por VRE (PERUGINE et al., 2011).

Enterococcus resistentes à vancomicina (VRE) têm causado surtos hospitalares em todo o mundo. Sua disseminação representa uma ameaça imediata para o atendimento ao paciente. Os enterococos apresentam vários sistemas de conjugação que podem disseminar os genes que conferem resistência antimicrobiana para outras bactérias. A possibilidade de transferência de resistência para outros micro-organismos possivelmente mais patogênicos é uma crescente preocupação em ambiente hospitalar. A aquisição de determinantes de virulência está envolvida na sobrevivência do micro-organismo em um ambiente altamente competitivo. Embora vários fatores de virulência tenham sido identificados o seu papel na patogênese das infecções enterocócicas ainda não está definido (ELSNER et al., 2000).

Por exemplo, o Complexo Clonal Epidêmico Virulento CC 17 de *E. faecium* é um exemplo da ocorrência de vários processos evolutivos que melhoraram a aptidão relativa dessas bactérias em ambientes hospitalares. *E. faecium* (CC 17) apresenta algumas características tais como resistência à ampicilina, ilha de patogenicidade, e uma associação

com surtos hospitalares. Portanto, o estudo epidemiológico de *Enterococcus* spp. resistente a vancomicina, em ambientes hospitalares, bem como análise do potencial de virulência dessas bactérias pode contribuir para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na patogênese das infecções enterocócicas, além de permitir a implementação de medidas de controle efetivas para prevenção das mesmas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Enterococcus faecium*: de comensal a importante patógeno humano adaptado ao ambiente hospitalar

Os enterococos são cocos Gram-positivos que fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal de seres humanos e de animais (SGHIR et al., 2000) e podem ser encontrados no solo (KIBLI et al., 2012), água e alimentos (RATHNAYAKE et al., 2012). Embora sejam considerados micro-organismos de baixo potencial de virulência, os enterococos vêm se destacando nas últimas décadas como importantes agentes etiológicos de Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde IRAS (HIDRON et al., 2008; WOODFORD; LIVERMORE, 2009; SHARIFI et al., 2012; THIERFELDER et al., 2012). *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* permanecem como as espécies de maior importância clínica. Entretanto a incidência de infecções ocasionadas por *E. faecium* vem aumentando significativamente nas duas últimas décadas, principalmente pelo fato desta espécie apresentar resistência a múltiplos antimicrobianos MDR: *multiple drug resistance*, (DALLA COSTA et al., 1998; HIDRON et al., 2008; WOODFORD; LIVERMORE, 2009).

O surgimento de cepas de bactérias MDRO é uma crescente ameaça, especialmente em ambientes hospitalares, constituindo uma situação alarmante para a saúde pública (WEBB et al., 2005). Vários surtos de infecção ocasionados por *Enterococcus* spp. MDR têm sido descritos em hospitais de muitos países, indicando uma disseminação clonal destas bactérias (KLARE et al., 2005; TORRES et al., 2006; NEBREDA et al., 2007, GALLOWAY et al., 2009, BRILLIANTOVA et al., 2010; PALAZZO et al., 2011; VALDEZATE et al., 2012). Surtos são caracterizados por taxas de um determinado tipo de infecção acima dos valores máximos esperados (MEDEIROS, 1997).

De fato, estudos de epidemiologia molecular sugerem que a emergência de *E. faecalis* (MCBRIDE et al., 2007) e *E. faecium* (WILLEMS et al., 2005; GALLOWAY-PEÑA et al., 2009) como importantes agentes de IRAS é resultado da evolução de uma linhagem genética ou complexo clonal específico que “acumulou” ao longo do tempo multirresistência aos antimicrobianos e determinantes de virulência. Mais especificamente, a partir de análises do tipo MLST (Multilocus sequence typing) de isolados de *E. faecium*, foi observado a existência de genogrupos hospedeiro-específico associados ao ambiente hospitalar e entre eles a linhagem genética denominada CC17 [*Clonal Complex 17* (WILLEMS et al., 2005)]. *E. faecium* pertencentes a este complexo caracterizam-se por apresentar resistência a ampicilina,

quinolonas e glicopeptídeos. Além disso, a maioria dos isolados possui elementos genéticos móveis, fagos, plasmídeos (TOP et al., 2008; LAM et al., 2012) e uma ilha de patogenicidade contendo o gene *esp enterococcal surface protein*, (LEAVIS et al., 2004) que codifica uma proteína de superfície envolvida na formação de biofilme (HEIKENS et al., 2007). Desde então essa linhagem tem sido amplamente detectada em ambientes hospitalares ao redor do mundo (MUNDY et al., 2000; KLARE et al., 2005; WILLEMS et al., 2005; BILLSTROM et al., 2008; GALLOWAY-PEÑA et al., 2009; BRILLIANTOVA et al., 2010; HSIEH et al., 2010; PANESSO et al., 2010; PALAZZO et al., 2011; VALDEZATE et al., 2012; SUN et al., 2012).

Dados limitados sobre a ocorrência de *E. faecium* CC17 na América do Sul estão disponíveis atualmente. Panesso et al. (2010) mostraram que *E. faecium* resistente a vancomicina isolados de hospitais da Colômbia, Equador, Peru e Venezuela apresentaram 11 perfis distintos de PFGE e a maioria pertencia ao ST 18 e 412. Também foram detectados genes plasmidiais que codificam resistência a vancomicina e fatores de virulências. Esses dados sugerem semelhanças genéticas entre esses isolados e aqueles pertencentes ao CC17.

No Brasil, foi reportado que isolados de *E. faecium* responsáveis por um surto e casos esporádicos em hospitais localizados na cidade de Campinas pertencem ao CC17. Também foram detectados nesses isolados genes que codificam fatores de virulência, entre eles proteínas de adesão (*acm*), proteína de superfície (*esp*) e hialuronidase (*hyl*) (PALAZZO et al., 2011).

E. faecium CC17 é um exemplo de processo evolutivo cumulativo no qual a resistência adquirida à ampicilina é seguida pela aquisição de elementos adaptativos como genes de resistência e virulência, contribuindo para a permanência destas bactérias bem adaptadas a humanos em ambientes hospitalares (TOP et al., 2008).

Em vista desse cenário, é importante conhecer a epidemiologia de *Enterococcus* spp. em ambientes hospitalares. Os resultados podem contribuir para a implementação de medidas de controle efetivas das infecções causadas por essas bactérias. Neste sentido, várias técnicas podem ser empregadas para o rastreamento do agente etiológico em determinado ambiente. Particularmente para *Enterococcus* spp., o perfil de bandas resultante da eletroforese em campo de pulsos alternados (PFGE) (“pulsed field gel electrophoresis”) tem sido considerada o “padrão ouro” para tipagem molecular é utilizada tanto para estudos de surtos hospitalares de pequenas proporções quanto na comparação de populações bacterianas, envolvendo micro-organismos de diferentes países (TOP et al., 2008; CHUANG et al., 2010).

Entretanto outras metodologias também têm sido empregadas para o mesmo fim. Entre elas destaca-se. O método REP-PCR (Reação em cadeia da polimerase de sequências palindrômicas extragênicas repetitivas) que é uma técnica baseada na amplificação do DNA é extremamente confiável, reproduzível (VERSALOVICK et al., 1991). Esta técnica faz uso de primers de DNA complementares àqueles de ocorrência natural, altamente conservados, com sequências repetitivas de DNA e presente em múltiplas cópias do genoma da maioria das bactérias Gram negativas e em muitas bactérias Gram positivas (VERSALOVICK et al., 1991). As identidades genômicas geradas pela técnica de REP-PCR permitem a diferenciação em nível de espécies, subespécies e cepa (VERSALOVICK et al., 1991). Primers para estas sequências são chamados de primers “de consenso” têm sido desenhados e utilizados para amplificar regiões entre estes elementos repetitivos por meio de PCR, gerando perfis específicos (fingerprinting) que podem ser utilizados para tipagem e identificação de espécies bacterianas. Esta técnica foi desenvolvida para estudos epidemiológicos global ou a longo termo e estudos de vigilância (JOLLEY et al., 2001).

No esquema de MLST para *E. faecium* descrito por Homan e colaboradores (2002) são analisados fragmentos internos de 7 genes *housekeeping*, *adk* (adenilato quinase), *atpA* (ATP sintase ,subunidade), *ddl* (D-alanina: D-alanina ligase), *gyd* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *gdh* (glicose 6- fosfato desidrogenase), *purK* (subunidade atpase phosphoribosylaminoimidazol carboxilase), *psts* (fosfato de transportador cassete de ligação ATP) (WIEGER et al., 2002).

Neste método, os fragmentos internos de *housekeeping*, são genes constitutivos conservados, de evolução lenta e normalmente codificantes de enzimas metabólicas ou proteínas de regulação. Uma das especificações na escolha destes genes prende-se com o fato de estes se encontrem dispersos no genoma, equidistantes entre si, de modo a que as alterações obtidas sejam representativas de todo o genoma.

Cada locus analisado apresenta uma determinada sequência que recebe um determinado número (número do alelo) com o propósito de identificação. Sequências que diferem em apenas um nucleotídeo são consideradas como alelos diferentes. O conjunto de números de todos os sete alelos representa um perfil alélico que define o *sequence type* (ST) de cada amostra bacteriana. O grande número de alelos em cada um dos loci estudados distingue bilhões de perfis alélicos, sendo que, uma amostra bacteriana com o alelo mais comum em cada locus, ocorre, aproximadamente, uma vez em dez mil bactérias. Desse modo, é improvável que bactérias não relacionadas apresentem o mesmo perfil alélico (HOMAN et al., 2002; FEIL et al., 2004; CAMARGO et al., 2006).

A metodologia MLVA (Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis) é considerada uma boa ferramenta para estudos epidemiológicos e filogenéticos em espécies bacterianas por revelar quantitativamente as similaridades e diferenças entre isolados (TOP et al., 2008).

Número Variável de Repetições em Tandem (VNTR) é utilizado como marcador molecular para identificação das diferenças genéticas entre bactérias patogênicas (TOP et al., 2008). Estudos dos VNTRs são realizados pelo MLVA (Análise dos VNTRs através da técnica da PCR). O MLVA baseia-se na identificação do polimorfismo no tamanho dos fragmentos amplificados, como resultados dos eventos de inserção e deleção dentro do VNTR (TOP et al., 2008). Esta técnica é utilizada como uma ferramenta para estudos epidemiológicos, especialmente por identificar polimorfismo no genoma de espécies bacterianas que são geneticamente homogêneas quando analisadas por outras técnicas moleculares como: REP-PCR e PFGE (TOP et al., 2008).

2.2 Resistência a vancomicina e fatores de virulência

A vancomicina é um antibiótico glicopeptídeo isolado inicialmente em 1956 a partir do actinomicete *Streptomyces orientalis*. Estruturalmente é composto por uma cadeia peptídica de sete membros e duas moléculas de açúcares, vancosamina e glicose Figura 1 (PFEIFFE., 1981). No entanto, devido a seu perfil de toxicidade não foi imediatamente utilizado para tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas. O uso clínico foi disseminado em 1958 com a emergência de *Staphylococcus aureus* produtor de penicilinase (NAILOR; SOBEL, 2011). Mais de 30 anos após sua descoberta, surgiram os primeiros relatos de enterococos resistente a esse antimicrobiano na Europa em 1988 (LECLERCQ et al., 1988; UTTLEY et al., 1988) e nos Estados Unidos em 1989 (FRIEDEN et al., 1993). Desde então, resistência a vancomicina em enterococos pode ser observada mundialmente (KLARE et al., 2005; WILLEMS et al., 2005; BILLSTROM et al., 2008 a; GALLOWAY-PEÑA et al., 2009; BRILLIANTOVA et al., 2010; HSIEH et al., 2010; PANESSO et al., 2010; RUZON et al., 2010; PALAZZO et al., 2011; CATTOIR, 2012; VALDEZATE et al., 2012; ARIAS , 2012).

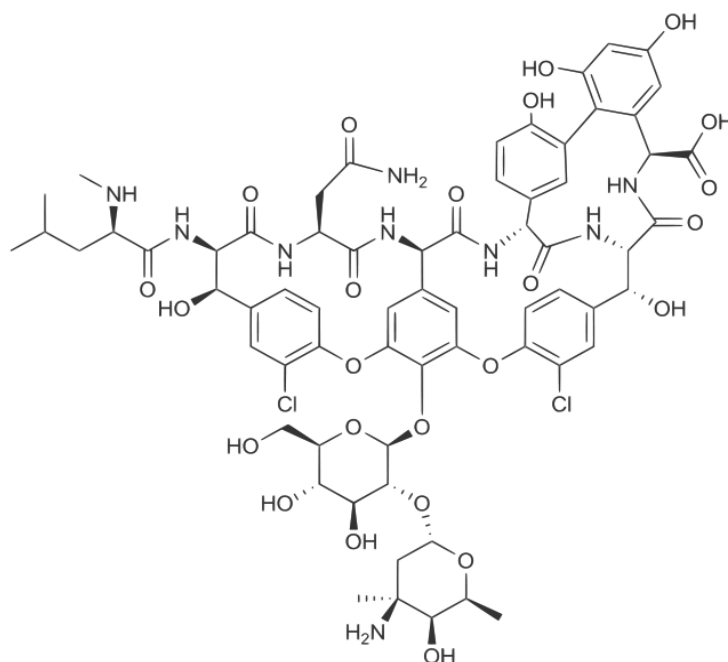
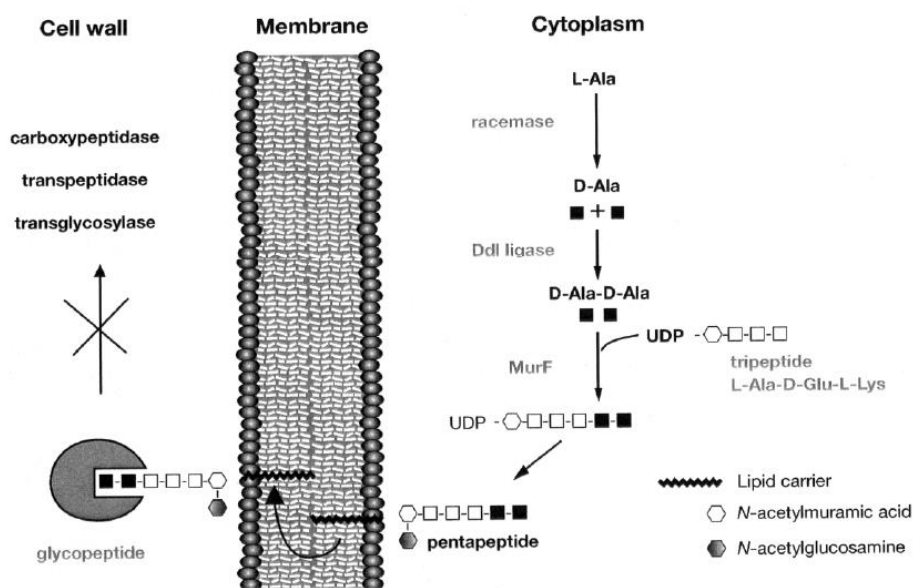


Figura 1: Estrutura do antimicrobiano vancomicina. Estruturalmente é composto por uma cadeia peptídica de sete membros e duas moléculas de açúcares, vancosamina e glicose.
Fonte: (SILVEIRA et al., 2006).

Em condições normais, a parede celular de *Enterococcus* (Figura 2) é formada pela síntese de peptidoglicano onde duas moléculas de D-alanina são ligadas por uma enzima ligase e formam D-Ala-D-Ala que é depois adicionada a um tripeptídeo, formando assim um pentapeptídeo (UDP-MurNac-L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala). Esse pentapeptídeo é incorporado a um peptideoglicano por um processo de transglicosilação e permite então a formação de pontes cruzadas que contribuem para a resistência da parede (CENTIKAYA et.al., 2000).

Os glicopeptídeos inibem a biossíntese do peptideoglicano uma vez que apresentam alta afinidade pelo dipeptídeo C-terminal D-alanil-D-alanil (D-Ala-D-Ala) de precursores do pentapeptídeo inibindo, as reações de transglicosilação e transpeptidação (REYNOLDS et al., 1989). Resistência a vancomicina pode ocorrer 1) devido a presença do operon *van*, localizado tanto em plasmídeo como no cromossomo bacteriano, onde os produtos participam da biossíntese de alvos com baixa afinidade pelo antimicrobiano, D-alanil-D-lactato (D-Ala-D-Lac) ou D-alanil-D-serina (D-Ala-D-Ser); 2) pela eliminação de precursores naturais D-Ala-D-Ala que são produzidos pelas bactérias (ARTHUR et al., 1996). Os glicopeptídeos têm grande afinidade com a terminação D-Ala-D-Ala precursora dos pentapeptídeos. Ao se ligar as

mesmas, o antibiótico impede a continuação da parede celular da bactéria (CENTIKAYA et.al., 2000).



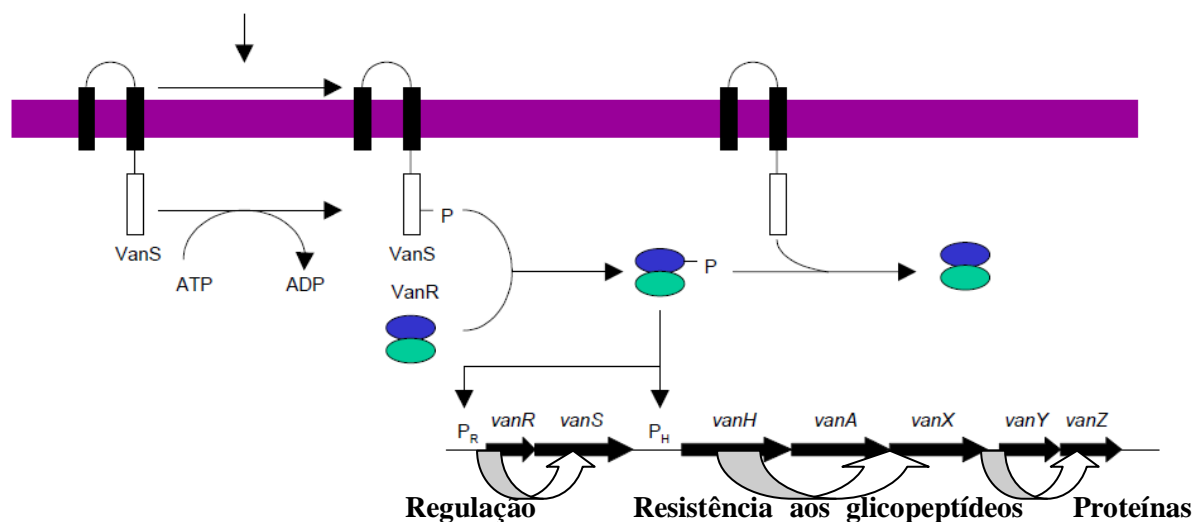
Fonte: (COURVALIN *et.al.*, 2006).

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

Ligação do antimicrobiano ao dipeptídeo D-Ala-D-Ala C- terminal de precursores do peptidoglicano impede reações catalisadas por transglicosilases, transpeptidases e D,D – carboxipeptidases. Ddl: D-Ala-D-Ala ligase; MurF: proteína sintetase, UDP: uracil difosfato. Os Beta lactâmicos inibem o crescimento de várias enzimas que participam da sua síntese final (TRABULSI et al., 2005).

Nove fenótipos de resistência são expressos pela transcrição do operon van: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanN e Van M (Tabela 1:), e essa classificação baseia-se na sequência primária dos genes que codificam as ligases. O fenótipo VanA foi o primeiro tipo de resistência descrito e é mediado pelo transposon Tn1546 e elementos intimamente relacionados a ele. A transcrição do operon *vanA* (Figura 3) pode ser induzida

tanto por vancomicina como por teicoplanina e será utilizada como modelo para compreensão do mecanismo de resistência aos glicopeptídeos.



acessórias

Figura 3: Organização do operon *vanA* e indução de sua transcrição pela vancomicina. *vanR* e *vanS* compõem o sistema regulatório do operon e são transcritos a partir do promotor R (P_R). *vanH*, *vanA*, *vanX* são requeridos para resistência aos glicopeptídeos, enquanto *vanY* e *vanZ* são proteínas acessórias, e esses genes são transcritos a partir do promoto H (P_H). Modificado de Boneca e Chiosis (2003).

A presença de vancomicina induz a autofosforilação de VanS, uma histidina quinase transmembrana sensora. Esta por sua vez fosforila o regulador transcricional VanR que ativa a transcrição a partir dos promotores R e H. Em ausência de vancomicina, VanS atua como uma fosfatase, depletando o conteúdo celular de VanR fosforilado e consequentemente inibe a transcrição do operon *van*. O gene *vanH* codifica uma desidrogenase (VanH) que reduz o piruvato a D-lactato, o qual é ligado a D-alanina pela atividade da VanA ligase (produto do gene *vanA*). A molécula resultante D-Ala-D-Lac é incorporada nos precursores do pentapeptídeo em substituição ao dipeptídeo C-terminal D-Ala-D-Ala, inibindo a ação do antimicrobiano e permitindo a síntese do peptideoglicano, uma vez que apresenta baixa afinidade pelos glicopeptídeos. Os genes *vanX* e *vanY* codificam D,D dipeptidase e D,D carboxipeptidase, respectivamente. Estas enzimas são responsáveis pela hidrólise dos

precursores naturais D-Ala-D-Ala que são produzidos pelas bactérias. A função de *vanZ* permanece desconhecida (COURVALIN, 2006).

Tabela 1: Características dos fenótipos de resistência a vancomicina. Modificado de Sujatha e Praharaaj (2012).

Fenótipo	Genótipo	Resistência			Produto	Referências
		Vancomicina	Teicoplanina	Tipo		
VanA *	<i>vanA</i>	Alto nível de resistência (CIM: 64 $\mu\text{g/mL}$ \geq 1000 $\mu\text{g/mL}$)	Alto nível de resistência (CIM: 16 $\mu\text{g/mL}$ -512 $\mu\text{g/mL}$)	Resistência induzível (alto nível)	D-Ala-D-Lac	Cetinka <i>et al.</i> , 2000
VanB *	<i>vanB</i>	Alto nível de resistência (CIM: 4 – 512 $\mu\text{g/mL}$)	Sensível (CIM \leq 0,5 $\mu\text{g/mL}$)	Resistência induzível (alto nível)	D-Ala-D-Lac	Cetinka <i>et al.</i> , 2000
VanC **	<i>vanC1</i> , <i>vanC2</i> , <i>vanC3</i> .	Baixo nível de resistência (CIM: 2 $\mu\text{g/mL}$ – 32 $\mu\text{g/mL}$)	Sensível (CIM \leq 0,5 $\mu\text{g/mL}$)	Resistência constitutiva (baixo nível)	D-Ala-D-Ser	Cetinka <i>et al.</i> , 2000
VanD	<i>vanD</i>	Moderado – Alto nível de resistência (CIM: 64 $\mu\text{g/mL}$ – 256 $\mu\text{g/mL}$)	Baixo nível de resistência (CIM – 4 $\mu\text{g/mL}$ – 32 $\mu\text{g/mL}$)	Resistência induzível	D-Ala-D-Lac	Lebreton <i>et al.</i> , 2011
VanE	<i>vanE</i>	Baixo nível de resistência (CIM: 16 $\mu\text{g/mL}$)	Sensível (CIM \leq 0,5 $\mu\text{g/mL}$)	Resistência induzível	D-Ala-D-Ser	Courvalin <i>et al.</i> , 2006
VanG	<i>vanG</i>	Baixo nível de resistência (CIM \leq 16 $\mu\text{g/mL}$)	Sensível (CIM \leq 0,5 $\mu\text{g/mL}$)	Resistência induzível	D-Ala-D-Ser	Courvalin <i>et al.</i> , 2006
VanL	<i>vanL</i>	Baixo nível de resistência (CIM 8 $\mu\text{g/mL}$)	Sensível	Resistência induzível	D-Ala-D-Ser	Boyd <i>et al.</i> , 2008
VanM	<i>vanM</i>	Alto nível de resistência (CIM $>$ 256 $\mu\text{g/mL}$)	Alto nível de resistência	Resistência induzível	D-Ala-D-Lac	XU <i>et al.</i> , 2010
VanN	<i>vanN</i>	Baixo nível de resistência (MIC - 16 $\mu\text{g/mL}$)	Sensível (CIM \leq 0,5 $\mu\text{g/mL}$)	Resistência constitutiva	D-Ala-D-Ser	Lebreton <i>et al.</i> , 2011

Detectado em * *E. faecalis* e *E. faecium*; ** *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*. CIM: concentração inibitória mínima

Como mencionado anteriormente, enterococos são comensais do trato gastrointestinal de humanos e animais e apresentam baixo potencial de virulência. Entretanto, várias moléculas contribuem para a virulência de cepas adaptadas ao hospedeiro e dentre elas destacam-se EfaA - antígeno A de *Enterococcus faecalis* associado a endocardite (gene *efaA*: *Enterococcus faecalis* antigen A); Acm - adesina que se liga ao colágeno (gene *acm*: adhesin of collagen from *Enterococcus faecium*); gelatinase (gene *gelE*); citolisina (gene *cyl*); hialuronidase (gene *hyl*); proteína de superfície (gene *esp*); fator de agregação (gene *asa1*).

O fator de virulência denominado *efaA*, apresenta a sequência de aminoácidos homóloga a proteínas de estreptococos com propriedades de adesão (MURRAY, 2000). Há relatos que a adesina responsável por ligação ao colágeno, expressa na superfície bacteriana foi identificada em *E. faecium* e denominada de acm. A deleção desse gene elimina a capacidade de aderência da bactéria ao colágeno e a colonização cardíaca em experimentos, indicando sua participação no desenvolvimento de endocardites por *Enterococcus* spp. (NALAPAREDDY et al., 2006).

A gelatinase, codificada pelo gene cromossomal (*gelE*), codifica uma metaloendopeptidase extracelular, também chamada de gelatinase, que é uma enzima que hidrolisa a gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros compostos bioativos (SU et al., 1991; VERGIS et al., 2002). Como a gelatinase pode degradar peptídeos diferentes além de gelatina (SU et al., 1991; WATERS et al., 2003), outros substratos devem ser avaliados para produção de gelatinase. No estudo realizado por Qin et al. (2000), os genes reguladores designados *fsr* (*fsrA*, *fsrB* e *fsrC*) foram encontrados em *E. faecalis*. Estes genes que regulam positivamente a expressão do gene *gelE* e *sprE* (gene da protease serina), parecem ser auto regulados e estão localizados antes do gene *gelE*. A ausência destes genes ou a presença de uma mutação em um ou mais destes três genes, pode comprometer a expressão da gelatinase (QIN et al., 2000).

Citolisina é uma toxina hemolítica descrita em enterococos que aparece em até 60% de *E. faecalis* isolados de surtos (MUNDY et al., 2000). A citolisina produzida em *E. faecalis* possui atividade de bacteriocina contra uma ampla faixa de bactérias Gram-positivas e também lisa células, tanto procarióticas como eucarióticas, apresentando atividade hemolítica. O operon da citolisina consiste em um grupo de oito genes: *cyLR1*, *cyLR2*, *cyLL*, *cyLS*, *cyLM*, *cyLB*, *cyLA*, *cyLI*. Este operon pode ser encontrado em plasmídeos ou pode estar integrado ao cromossomo bacteriano (GILMORE, 2003).

O gene cromossomal *hyl* descrito em *E. faecium*, apresenta homologia com hialuronidase, proposta como fator de virulência em *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*

pyogenes e *Streptococcus pneumoniae* pois pode contribuir para que haja invasão destes micro-organismos na nasofaringe que precede a infecção do sistema nervoso central e pode contribuir ainda, de maneira não explicada, para que ocorra pneumonia pneumocócica (RICE et al., 2003).

Proteína de superfície de enterococos (*esp*) é uma molécula associada à parede celular, codificada pelo gene cromossomal *esp*. Toledo-Arana et al. (2001) associaram a presença de *esp* com a formação de biofilme. A proteína *esp* permite a colonização da bexiga em modelos experimentais de infecção do trato urinário e confere aos enterococos a capacidade de produção de biofilmes (SHANKAR et al., 2002). A proteína *esp* altamente conservada é muito comum em linhagens de *E. faecium*, tanto sensíveis, como resistentes à vancomicina (SHANKAR et al., 2002). Tendolkar et al. (2004) mostraram que a presença do gene *esp* aumenta a capacidade de *E. faecalis* formar biofilme.

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 et al., 2003). Esta adesina faz parte da subfamília de adesinas de superfície bacteriana denominada MSCRAMMs (do inglês, *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) (NALLAPAREDDY et al., 2003). A deleção desse gene elimina a capacidade de aderência da bactéria ao colágeno e a colonização de válvula cardíaca de ratos experimentalmente infectados, indicando sua participação no desenvolvimento de endocardites por enterococos (NALLAPAREDDY et al., 2008).

O fator de agregação é uma proteína de superfície produto da expressão do gene *asa1*, carregado em um plasmídeo, e é induzida por feromônios (CLEWELL et al., 1993). *Asa1* promove a aglutinação entre os micro-organismos, facilitando a transferência de plasmídeos durante a conjugação (CLEWELL et al., 1981), além de aumentar a aderência bacteriana a células tubulares renais e cardíacas (GUZMAN et al., 1989)

Em um estudo realizado por Kwon e colaboradores (2012), 184 isolados de *E. faecium* provenientes de animais e humanos foram avaliados. A presença dos genes *esp* foi detectada em (76,2%) e *hyl* (66,7%) nos isolados humanos. Valdezate e colaboradores (2012), avaliaram a presença dos genes *esp* e *hyl* em 22 *Enterococcus faecium* isolados de pacientes hospitalizados na Espanha, todos os isolados apresentaram os genes *esp* e *hyl*.

Ahdal e colaboradores (2012), analisaram 29 *Enterococcus faecium*, provenientes de isolados clínicos, e todos apresentaram o gene *gelE*, *esp* e *efaA*. Apenas cinco isolados apresentaram o gene *cylA* e 24 isolados apresentaram o gene *hyl*.

Na cidade de Riberão Preto, Brasil, no período de 2005 a 2010, 53 isolados foram identificados como *E. faecium*. Os isolados não apresentaram os genes *cyl* e *hyl*. Em contraste todos os 53 isolados apresentaram o genes *esp*. O gene *acm* esteve presente em 11 isolados e 10 isolados apresentaram o gene *gel* (SILVA et al, 2012). Billstrom e colaboradores (2008 b) realizaram um estudo na Suécia no período de 2000 a 2005. Foram realizadas coletas de 263 pacientes hospitalizados e os isolados foram identificados como *E. faecium*. O gene *esp* foi encontrado em 56% dos isolados, *hyl* em apenas 4%.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Em vista do exposto, o objetivo principal desse trabalho foi caracterizar *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina isolados no Hospital Universitário de Londrina quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, potencial de virulência e genótipo.

3.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- Isolar e identificar as amostras;
- Determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e o genótipo de resistência a vancomicina e eritromicina;
- Detectar a presença de sequências nucleotídicas complementares aos genes que codificam fatores de virulência: *cylA*, *efaA*, *esp*, *gelE*, *hyl*, *asa* e *acm*;
- Determinar a capacidade dos isolados em aderir a células epiteliais de mamíferos *in vitro* e formar biofilme em poliestireno;
- Determinar a atividade de hialuronidase *in vitro*;
- Determinar o genótipo dos isolados utilizando-se as técnicas de REP-PCR e MLST.

REFERÊNCIAS

- 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, sept. 1997.
- AL-AHDAL, M. N.; ABOZAIID, S. M.; AL-SHAMMARY, H. F.; BOHOL, M. F.; AL-THAWADI, S. I.; AL-JABERI, A. A.; SENOK, A. C.; SHIBL, A. M.; AL-QAHTANI, A. A. Characterization of *Enterococcus faecium* isolates and first report of *vanB* phenotype–*vanA* genotype incongruence in the Middle East. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 11, p. 3223-3229, nov. 2012.
- ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 266-278, mar. 2012.
- ARTHUR, M.; REYNOLDS, P.; COURVALIN, P. Glycopeptide resistance in enterococci. **Trends in Microbiology**, v. 4, n. 10, p. 401-407, oct. 1996.
- BEDENDO, J.; PIGNATARI, A. C. Typing of *Enterococcus faecium* by polymerase chain reaction and pulsed field gel electrophoresis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 11, p. 1269-1274, nov. 2000.
- BOTES, M.; LOOS, B.; VAN REENEN, C. A.; DICKS, L. M. Adhesion of the probiotic strains *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. **Archives of Microbiology**, v. 190, n. 5, p. 573-584, nov. 2008.
- 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, jun. 2003.
- 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, jul. 2008.
- BRILLIANTOVA, A. N.; KLIASOVA, G. A.; MIRONOVA, A. V.; TISHKOV, V. I.; NOVICHKOVA, G. A.; BOBRYNINA, V. O.; SIDORENKO, S. V. Spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in two haematological centres in Russia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 2, p. 177-181, feb. 2010.
- BILLSTROM, M.; TOP, J.; EDLUND, C.; LUND, B. Frequent occurrence of multidrug-resistant CC17 *Enterococcus faecium* among clinical isolates in Sweden. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1810-1816, 2 out. 2008.(A)
- BILLSTROM, H.; LUND, B.; SULLIVANA A. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. **International Journal of Antimicrobial Agents** , v. 32, p. 374–377, 28 abril. 2008.(B)

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, n. 11, p. 1123-1130, nov. 2006.

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

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

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, G. Vancomycin-Resistant Enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4 , p.686-707, out. 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 7. ed. **CLSI Approved standard M7-A7**. Wayne, PA, 2011.

CHUANG, YC.; WANG, JT.; CHEN, ML.; CHEN, YC. Comparison of an automated repetitive-sequence-based PCR microbial typing system with pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 8, p. 2897-2901, aug. 2010.

COURVALIN, P. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. **Clinical Infectious Diseases**, p. 25-34, 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. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 160-163, jun. 1998.

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. 17, p. 39-42, 2000.

FEIL, E. J.; LI, B. C.; ANENSEN, D. M.; HANAGE, W. P.; SPRATT, B. G. eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 5, p. 1518-1530, 2004.

FRIEDEN, T. R.; MUNSIFF, S. S.; LOW, D. E.; WILLEY, B. M.; WILLIAMS, G.; FAUR, Y.; EISNER, W.; WARREN, S.; KREISWIRTH, B. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in New York City. **Lancet**, v. 342, n. 8863, p. 76-79, jul. 1993.

GALLOWAY-PENÁ, J. R.; NALLAPAREDDY, S. R.; ARIAS, S. A.; ELIOPOULOS, G. M.; MURRAY, B. E. Analysis of Clonality and Antibiotic Resistance among Early Clinical Isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 10, p. 1566-1573, 15 nov. 2009.

GHOLIZADEH, Y.; PREVOST, M.; BAMBEKE, F. V.; 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, abr. 2001.

GILMORE, M. S.; FERRETTI, J. J. The Thin Line Between Gut Commensal and Pathogen. **Science**, v. 299, n. 5615, p.1999-2002, mar. 2003.

GUZMAN, 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.

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, n. 22, p. 8233-8240, sep. 2007.

HIDRON, A. I.; EDWARDS, 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 reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 11, p. 996-1011, nov. 2008.

HSIEH, Y. C.; LEE, W. S.; OU, T. Y.; HSUEH, P. R. Clonal spread of CC17 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with multilocus sequence type 78 (ST78) and a novel ST444 in Taiwan. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 29, n. 1, p. 25-30, jan. 2010.

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

JOLLEY, K. A.; FEIL, E.J.; CHAN, M. S.; MAIDEN, M. C. Sequence type analysis and recombinational tests (START). **Bioinformatics**, v. 17, n. 12, p. 1230-1231, dec. 2001.

KLARE, I.; KONSTABEL, C.; MUELLER-BERTLING, S.; WERNER, G.; STROMMENGER, B.; KETTLITZ, C.; BORGMANN, S.; SCHULTE, B.; JONAS, D.; SERR, A.; FAHR, A. M.; EIGNER, U.; WITTE, W. Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 24, n. 12, p. 815-825, dec. 2005.

KLIBI, N.; SLIMEN, N. B.; FHOULA, I.; LÓPEZ, M.; SLAMA, K. B.; DAFFONCHIO, D.; BOUDABOUS, A.; TORRES, C.; OUZARI, H. Genotypic diversity, antibiotic resistance

and bacteriocin production of enterococci isolated from rhizospheres. **Microbes and Environments**, v. 27, n. 4, p.533-537, dec. 2012.

KWON, K. H.; MOON, B. Y.; HWANG, S. Y.; PARK, Y. H. Detection of CC17 *Enterococcus faecium* in dogs and a comparison with human isolates. **Zoonoses and Public Health**, v. 59, n. 6, p. 375-378, sep. 2012.

LAM, M. M.; SEEMANN, T.; BULACH, D. M.; GLADMAN, S. L.; CHEN, H.; HARING, V.; MOORE, R. J.; BALLARD, S.; GRAYSON, M. L.; JOHNSON, P. D.; HOWDEN, B. P.; STINEAR, T. P. Comparative Analysis of the First Complete *Enterococcus faecium* Genome. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 9, p. 2334-2341, may. 2012.

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, n. 3, p. 672-682, feb. 2004.

SILVA, L.; SILVA, A.; MARTINEZ, R.; DARINI, A. Genetic features and molecular epidemiology of *Enterococcus faecium* isolated in two university hospitals in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 74 .p. 267 – 271, nov. 2012.

LEBRETON, F.; DEPARDIEU, F.; BOURDON, N.; FINES-GUYON, M.; BERGER, P.; CAMIADE, S.; LECLERCQ, R.; COURVALIN, P.; CATTOIR, V. D-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4606–4612, oct. 2011.

LECLERCQ, R.; DERLOT, E.; DUVAL, J.; COURVALIN, P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. **The New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 3, p. 157-161, jul. 1988.

LIVERMORE, D. M.; MUSHTAQ, S.; WARNER, M.; WOODFORD, N. Activity of oxazolidinone TR-700 against linezolid-susceptible and -resistant staphylococci and enterococci. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 4, p. 713-715, apr. 2009.

MARQUES, E. B.; SUZART, S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 1069-1073, nov. 2004.

MCBRIDE, S. M.; FISCHETTI, V. A.; LEBLANC, D. J.; MOELLERING, R. C. JR.; GILMORE, M. S. Genetic Diversity among *Enterococcus faecalis*. **PLoS ONE**, v. 2, n. 7, 2007.

MEDEIROS, E. A. S. Investigação e Controle de Epidemias Hospitalares. In: RODRIGUES, E. A. C. et al. Infecções Hospitalares: prevenção e controle. São Paulo: **Sarvier**, 1997. p.76-85.

MOELLERING, R. C Vancomycin – resistant – enterococci. **Clinical Infection Diseases**,

v.26, p. 1196-9, 1998.

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, oct. 2000.

MURRAY, B. E. Vancomycin-Resistant Enterococcal Infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 10, p. 710-721, mar. 2000.

NAILOR, M. D.; SOBEL, J. D. Antibiotics for gram-positive bacterial infection: vancomycin, teicoplanin, quinupristin/dalfopristin, oxazolidinones, daptomycin, telavancin, and ceftaroline. **The Medical Clinics of North America**, v. 95, n. 4, p. 723-742, jul. 2011.

NALLAPAREDDY, S. R.; SINGH, K. V.; MURRAY, B. E. Construction of improved temperature-sensitive and mobilizable vectors and their use for constructing mutations in the adhesin-encoding *acm* gene of poorly transformable clinical *Enterococcus faecium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 334-345, jan. 2006.

NALLAPAREDDY, S. R.; SINGH, K. V.; 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. 1733-1744, 2003.

NALLAPAREDDY, S. R.; SINGH, K. V.; MURRAY, B. E. A Functional collagen adhesion gene, *acm*, in Clinical Isolates of *Enterococcus faecium* Correlates with the Recent Success on This Emerging Nosocomial Pathogen. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 4110-4119, 2008.

NALLAPAREDDY, S. R.; SINGH, K. V.; 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. 1733-1744, 2003.

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, n. 4, p. 806-807, apr. 2007.

NILSSON, O. Vancomycin resistant enterococci in farm animals – occurrence and importance. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 2, april. 2012.

PALAZZO, I. C.; PITONDO-SILVA, A.; LEVY, C. E.; DA COSTA DARINI, A. L. Changes in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing outbreaks in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, v. 79, n. 1, p. 70-74, sep. 2011.

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

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, n. 4, p. 275-281, aug. 1999.

PERUGINI, E.R.M.; NOMI, S.M.; LOPES, K.G.; BELEI, A.R.; MOSTACHIO, Q.K.; GRION, C. E.; COUTO, E. B. Impact of the reduction of environmental and equipment contamination on vancomycin-resistant enterococcus rates, **Infection**, 2011.

PFEIFFER, R. R. Structural features of vancomycin. **Reviews of infectious diseases**, v. 3, p. S205-S209, dec. 1981.

REYNOLDS, P. E. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 8, n. 11, p. 943-950, nov. 1989.

QIN, X.; SINGH, K. V.; WEINSTOCK, G. M.; MURRAY, B. E. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* Genes on Production of Gelatinase and a Serine Protease and Virulence. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2579–2586, may. 2000.

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

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, *hylEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. 3, p. 508-512, feb. 2003.

RUZON, F. I.; DE PAULA, S. B.; KANOSHIKI, R. L.; PEREIRA-SANTOS, J.; KERBAUY, G.; KOBAYASHI, R. K.; YAMAUCHI, L. M.; PERUGINI, M. R.; YAMADA-OGATTA, S. F. Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* *vanA* isolated from different sources at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 814-821, dec. 2010.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. **Biotechnology (Reading, Mass)**, v. 24, p. 104-108, 1992.

SGHIR, A.; GRAMET, G.; SUAUA, 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, n. 5, p. 2263-2266, may. 2000.

SHANKAR, N.; BAGHDAYAN, A. S.; GILMORE, M. S. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Nature**, v. 417, n. 6890, p. 746-750, jun. 2002.

SHARIFI, Y.; HASANI, A.; GHOTASLOU, R.; VARSHOCHI, M.; HASANI, A.; AGHAZADEH, M.; MILANI, M. Survey of Virulence Determinants among Vancomycin Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Clinical Specimens

of Hospitalized Patients of North west of Iran. **The Open Microbiology Journal**, v. 6, p. 34-39, 2012.

SILVA, L. P.; PITONDO-SILVA, A.; MARTINEZ, R.; DARANI, A. L. Genetic features and molecular epidemiology of *Enterococcus faecium* isolated in two university hospitals in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 74, n. 3, p. 267-271, nov. 2012.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, mar. 2006.

SMITH, R. F.; WILLETT, N. P. Rapid plate method for screening hyaluronidase and chondroitin sulfatase-producing microorganisms. **Applied Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 1434-1436, sept. 1968.

SOOD S, MALHOTRA M, DAS BK, KAPIL A. Enterococcal infections and antimicrobial resistance. **Indian J Med Res**. 111-121, 2008.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, apr. 2000.

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, n. 1, p. 415-420, jan. 1991.

SUN, H.; WANG, H.; XU, Y.; JONES, R. N.; COSTELLO, A. J.; LIU, Y.; LI, G.; CHEN, M.; MENDES, R. E. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus spp.* clinical isolates recovered from hospitalized patients among several medical institutions in China. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 74, n. 4, p. 399-403, dec. 2012.

SUJATHA, S.; PRAHARAJ, I. Glycopeptide Resistance in Gram-Positive Cocci: A Review. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2012, p.1-10, 2012.

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, oct. 2004.

THIERFELDER, C.; KELLER, P. M.; KOCHER, C.; GAUDENZ, R.; HOMBACH, M.; BLOEMBERG, G. V.; RUEF, C. A multiple-strain outbreak of eight weeks duration at a Swiss tertiary care hospital. **The European Journal of Medical Sciences**, may. 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

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, n. 10, p. 4538-4545, oct. 2001.

TOP, J.; WILLEMS, R.; BONTEN, M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium* : from commensal to hospital-adapted pathogen. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 297-308, apr. 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, sep. 2006.

UTTLEY, A. H.; GEORGE, R. C.; NAIDOO, J.; WOODFORD, N.; JOHNSON, A. P.; COLLINS, C. H.; MORRISON, D.; GILFILLAN, A. J.; FITCH, L. E.; HEPTONSTALL, J. High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections. **Epidemiology and Infection**, v. 103, n. 1, p. 173-181, aug. 1988.

VALDEZATE, S.; MIRANDA, C.; NAVARRO, A.; FREITAS, A. R.; CABRERA, J. J.; CARRASCO, G.; COQUE, T. M.; JIMÉNEZ-ROMANO, E.; SAÉZ-NIETO, J. A. Clonal outbreak of ST17 multidrug-resistant *Enterococcus faecium* harbouring an Inc18-like: Tn1546 plasmid in a haemo-oncology ward of a Spanish hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 832-836, apr. 2012.

VERGIS, E. N.; SHANKAR, N.; CHOW, J. W.; HAYDEN, M. K.; SNYDMAN, D. R.; ZERVOS, M. J.; LINDEN, P. K.; WAGENER, 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, sep. 2002.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, nov. 1991.

WATERS, C. M.; ANTIPOORTA, 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, n. 12, p. 3613-3623, jun. 2003.

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 of the United States of America**, v. 102, n. 37, p. 13343-13348, sep. 2005.

WERNER G, KLARE I, FLEIGE C, et al. 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. **Int J Med Microbiol**. 298:515-27, 2008.

WIEGER L. HOMAN, D, POZNANSKI S , SPALBURG E. Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium*, **Journal of clinical Microbiology**, p. 1963-1971, 2002.

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, n. 6, p. 821-828, jun. 2005.

WOODFORD, N.; LIVERMORE, D. M. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. **Journal of Infection**, v. 59, p. s4-s16, sep. 2009.

XU, X.; LIN, D.; YAN, G.; YE, X.; WU, S.; GUO, Y.; ZHU, D.; HU, F.; ZHANG, Y.; WANG, F.; JACOBY, G. A.; WANG, M. *vanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p.4643-4647, nov. 2010.

5 TRABALHO CIENTÍFICO 1

Title: Commensal and environmental vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated in hospital settings: genotypic diversity, antimicrobial resistance and virulence traits

Gomes, L.V.P.¹; Morey, A.T.¹; Santos, P.J ; Cardoso, J.D³, Perugini, M.R. ²; Yamauchi, L.M.¹; Yamada-Ogatta, S.F.¹

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

²Laboratório de Microbiologia Clínica, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

³ Instituto Agrônômico do Paraná, Departamento de Microbiologia do Solo, CEP 86047-902. Londrina, Paraná, Brazil.

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 86057-970.

Tel: +55-43-3371-5503; fax: +55-43-3371-4788.

e-mail: ogatta@uel.br

ABSTRACT

In this study, the occurrence of the putative virulence genes *acm*, *asa1*, *cylA*, *efaA*, *esp*, *gelE* and *hyl* in twenty four *Enterococcus faecium* *vanA/ermB*-type isolates from rectal swab of hospitalized patients ($n = 14$) and their environmental vicinity ($n = 10$) was investigated by molecular methods. The antimicrobial susceptibility profile was analyzed by a disk-diffusion method, and all isolates were shown to be resistant to vancomycin, teicoplanin, ampicillin, erythromycin and ciprofloxacin. Thirteen different clusters were detected among the isolates, and 16 (66.7%) were clustered in five genotypes. The other eight (33.3%) isolates had unique banding profiles. Only the genes *efaA*, *esp*, and *gelE* examined were commonly found in *E. faecium* isolates, and the prevalence was as follows: *efaA*, 100%; *esp*, 75%; *gelE* and 41.7%. All isolates harbored at least one putative virulence marker. These results show the potential virulence of multiple antimicrobial resistant *E. faecium* isolated from stool and hospital environment. These results corroborate the importance of the control of healthcare-associated infections.

Key words: *Enterococcus faecium*, antimicrobial resistance, REP-PCR, *vanA* genotype, virulence factors.

INTRODUCTION

Enterococci are commensals of the gastrointestinal and urogenital tracts of healthy humans and animals (SGHIR et al. 2000). However, as opportunistic pathogen, they are among the most important etiological agents of healthcare-associated infections (HAI), including urinary tract, intra-abdominal and pelvic infections, neonatal sepsis, bacteremia and endocarditis (HIDRON et al., 2008; WERNER et al., 2012).

Enterococcus faecalis and *Enterococcus faecium* remain the most common etiological agents of enterococcal infections. However, a significant increase of *E. faecium* infections has been observed over the last two decades and this may be associated with its capacity of acquiring resistance to many antimicrobials, including vancomycin [VRE, vancomycin-resistant enterococci (HIDRON et al., 2008; SUNDSFJORD; WILLEMS 2010; de KRAKER et al., 2012; MCCRACKEN et al., 2013).

Although enterococci display low levels of virulence, these microorganisms may express some virulence factors that contribute to the pathogenesis of infection. The microbial adhesion to host tissues is an important step in the pathogenesis of infectious diseases. Several molecules with adhesion properties have been shown in enterococci. Enterococcal surface protein (Esp) is encoded by the *esp* gene that is located within a pathogenicity island (SHANKAR et al., 2001; LEAVIS et al., 2004). The expression of this cell surface protein has been associated with initial adherence and biofilm formation *in vitro* (HEIKENS et al., 2007), and virulence in urinary tract (SHANKAR et al., 2001) and endocarditis experimental infections (HEIKENS et al., 2011). The gene *acm* (adhesin of collagen from *E. faecium*) encodes another cell-surface protein in *E. faecium*. The nucleotide sequence of this gene shares similarity with collagen-binding adhesins of *E. faecalis* (*ace*, 47%) and *Staphylococcus aureus* (*cna*, 62%) (NALLAPAREDDY et al., 2003), which are members of the MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) and specifically bind

to host extracellular matrix (PATTI et al., 1992; RICH et al., 1999). In addition, expression of *acm* contributes to pathogenesis of *E. faecium* in experimental endocarditis (NALLAPAREDDY et al., 2008). Aggregation substance proteins comprise a family of surface adhesins that are encoded by pheromone-responsive conjugative plasmids and contribute to both bacterial aggregation and internalization by eukaryotic cells (WATERS et al., 2004), and experimental endocarditis (SCHLIEVERT et al., 1997). *Enterococcus faecalis* antigen A (EfaA) is another a surface protein that was first identified in the serum of a patient with endocarditis caused by *E. faecalis* (LOWE et al., 1995), and has also been associated with peritonitis experimental infection (SINGH et al., 1998).

Hemolysin-cytolysin (Cyl) is a secreted toxin that is encoded by the *cyl* operon located either on pheromone-responsive plasmids or integrated into the bacterial chromosome within a pathogenicity island (SHANKAR et al., 2001). Cyl is toxic on a broad range of prokaryotic and eukaryotic cells of different origins (COX et al., 2005) and have an important role in experimental mammalian models of enterococcal infections (JETT et al., 1992; SINGH et al., 1998). Gelatinase is a secreted protease encoded by the chromosomal *gelE* gene (SU et al., 1991) that was be able to hydrolyze a number of substrates (SU et al., 1991; WATERS et al., 2003). In addition, gelatinase activity has been showed to contribute to biofilm formation (THOMAS et al., 2009), *in vitro* translocation of bacteria across intestinal cell layers (ZENG et al., 2005) and virulence in peritonitis (SINGH et al., 1998), endophthalmitis (ENGELBERT et al., 2004) and endocarditis (THURLOW et al., 2010) experimental infections. Compared to *E. faecalis*, relatively little is known about the virulence attributes of *E. faecium*. Several putative virulence encoded genes have been detected in *E. faecium* genome (RUZON et al., 2010; da SILVA et al., 2012; LAM et al., 2012), however their role on bacterium pathogenesis are not yet well understood.

Persistent VRE colonization in the human gastrointestinal tract, the presence of multiple VRE genotypes and environmental contamination may all contribute to spread of VRE in hospital settings (BONTEN et al., 1997; DREES et al., 2008; RUIZ-GARBAJOZA et al., 2012). In this context, the aim of the present study was to evaluate the presence of seven putative virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREfm) isolated from hospitalized-human fecal carriage and hospital environmental settings. The antimicrobial susceptibility pattern and genotypes were also determined.

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms

A total of 24 non-duplicates VREfm isolated at University Hospital of Londrina, Londrina, Paraná, Brasil during 2009 and 2010 were included in this study. Human isolates were classified according to CDC definitions of healthcare-associated infections (HORAN *et al.*, 2008). Fourteen isolates were recovered from stool cultures of rectal swab specimens as the routine of hospital surveillance for the control of HAI. Ten isolates were obtained by rubbing pre-moistened swabs over the sites in the immediate vicinity of the patient and the general areas in patients' rooms.

DNA extraction

Whole DNA of all enterococcal strains was extracted by the boiling method as described in RUZON et al., (2010) with modifications. Briefly, a single bacterial colony was added to 2 ml BHI broth and incubated at 37 °C for 24 h. The cells were centrifuged at 10,000×g for 5 min, resuspended in 200 µl sterile ultrapure water and boiled (100 °C) for 10 min. Cellular debris was removed by centrifugation and a 10-µl aliquot of supernatant was used in all amplification reactions.

Species identification

Presumptive colonies of enterococci growing on VRE agar (Oxoid®, UK) supplemented with 6 µg/mL of vancomycin were identified by standard morphological, and biochemical analysis using automated MicroScan WalkAway 96 Instrument (Dade MicroScan, USA). The species identification was also confirmed by PCR using the specific primers (Table 1) complementary to the *ddl* gene of *E. faecium* (Gholizadeh et al., 2001). The amplification reactions were performed in a Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) in a final volume of 50 µL containing 1.5 mM MgCl₂, 200 µM each dNTP, 10 pmol of each primer, 6 U *Taq* DNA polymerase and 100 ng of genomic DNA. PCR cycling was carried out under the following conditions: an initial denaturation step at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, annealing at 50 °C for 30 s and an extension step at 72 °C for 30 s. Simultaneously, reactions with DNA from *E. faecium* ATCC and without any template DNA were carried out as positive and negative controls.

Antimicrobial susceptibility and vancomycin and erythromycin resistance genes

The isolates were tested for antimicrobial susceptibility to 7 agents (ampicillin, ciprofloxacin, erythromycin, rifampicin, teicoplanin, tetracycline, and vancomycin), using the disk diffusion method according to Clinical Laboratory Standard Institutes (CLSI, 2011) recommendations. The results reported here were those recorded after 24 h of incubation. The interpretative criteria for susceptibility pattern were those recommended by the CLSI (2011). *E. faecalis* ATCC 29212 and 51299 were used for quality control. The vancomycin resistance gene was determined using multiplex PCR as described by Petrich *et al.* (1999). The primer nucleotide sequences and expected size of amplicons for each PCR assay are showed in Table 1.

Table 1: Description of primers used in PCR for detection of putative virulence markers and erythromycin-resistance genes of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*.

TargetGene	Sequence of the primer (5'→3')	Amplicon (pb)	Reference
<i>efaA</i>	F: TGCTACCAGTCGGAACAGATCCGCAT R: GGTGAAGAACATACAAAAGCGGATCC	235	RUZON et al., 2010
<i>esp</i>	F: CTAATGCAAGTCCACGTCCAGTCG R: TGATGGAAACCCTGACGATAAAGAAG	243	RUZON et al., 2010
<i>gelE</i>	F: CGCCAAGTAAACACGGACAACCAGA R: GTGATGCGATGCTTGCTGCTGC	247	RUZON et al., 2010
<i>cylA</i>	F: TAAGGTGATGGATGGGACAGATG R: GCGACTCATTTCCTGCTGATG	216	RUZON et al., 2010
<i>hyl</i>	F: GAGTAGAGGAATATCTTAGC R: AGGCTCCAATTCTGT	260	This study
<i>ermA</i>	F: CCGGCAAGGAGAAGGTTATAATGA R: GCATTCACCCGTTGACTCATTTC	225	This study
<i>ermB</i>	F: GCTCTTGCACACTCAAGTCTCGAT R: ACATCTGTGGTATGGCGGGTAAGT	117	This study
<i>vanA</i>	F: GCTGCGATATTCAAAGCTCA R: CAGTACAATGCGGCCGTTA	545	PETRICH et al., 1999
<i>asal</i>	F: CACGCTATTACGAACTATGA R: TAAGAAAGAACATCACCACGA	375	BILLSTROM et al., 2008
<i>acm</i>	F: GATGCAGGCAGAGATATCAGC R: TTATTTATTTATTCTCATTGTGTAACGACTAG	1503	NALLAPAREDDY et al., 2003
<i>ddl-</i> <i>E. faecium</i>	F: GATGCAGGCAGAGATATCAGC R: TTATTTATTTATTCTCATTGTGTAACGACTAG	1150	GHOLIZADEH et al., 2001
REP-PCR	F: CGICGICATCIGCC R: ICGICTTATCIGGCCTAC	-	VERSALOVIC et al., 1991

Genotyping

Clonal relatedness of the isolates was analyzed by Repetitive Extragenic Palindromic elements-PCR (REP-PCR) using the primers REP1R and REP2 as described by Versalovic et al., (1991), with minor modifications. Briefly, PCR was performed in a final volume of 25 μ L containing 1,5mM MgCl₂, 1.25 mM each dNTP, 50 pmol of each primer, 1 U *Taq* DNA polymerase and 100 ng of genomic DNA. The amplification reactions were performed with an initial denaturation step at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, annealing at 48 °C for 1 min, extension at 72 °C for 3 min, and a single final extension step at 72 °C for 7 min. After amplification, 8 μ L of each PCR sample and a 100-bp DNA molecular weight ladder were separated in a 1.0% agarose gel (Invitrogen) in TBE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.3) at 4.8 V/cm for 2 h, and the gel was stained with ethidium bromide. Banding patterns were categorized using the UPGMA algorithm and Jaccard coefficient (Sneath; Sokal 1973) of the Bionumerics v. 4.6 software (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium), with the band tolerance set at 3% and the threshold cutoff value was set at 85% (PANESSO et al., 2010).

Amplification of putative virulence genes

The detection of nucleotide sequences corresponding to the genes encoding putative virulence factors was carried out by PCR. The nucleotide sequence encoding the hyaluronidase (*hyl*) of *E. faecium* deposited in the GenBank/EMBL database under accession number AF544400 was used for specific primer design with Primer Select software (DNASTAR Lasergene). For *cyIA* (activator of cytolysin), *efaA* (*E. faecalis* antigen A), *esp* (enterococcal surface protein) and *gelE* (gelatinase) genes, the amplification reactions were performed as described by Ruzon et al., (2010). PCR for the *asa* (aggregation substance) and *acm* (adhesin of collagen from *E. faecium*) genes were performed as described by Vankerchhoven et al., (2004) and

Nallapareddy et al., (2003), respectively. The primer sequences and expected size of amplicons for each PCR assay are showed in Table 1.

RESULTS

Identification and typing

All isolates were identified at the species level as *E. faecium* by phenotypic and PCR-based methods. Cluster analysis and visual observation of bands generated by REP-PCR typing revealed low relatedness among the isolates. Those isolates showing 85% similarity were considered similar, so the analysis of the dendrogram resulted in 13 different genotypes. Among the isolates, 16 were clustered in five genotypes, one with five (20.8%), four (16.7%) and three (12.5%) isolates each, and two with two (8.3% each) isolates. The other eight (33.3%) isolates had unique banding profiles (Table 2).

Table 2: Putative virulence factors, antimicrobial susceptibility pattern and REP-PCR fingerprinting pattern obtained from 24 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from fecal carriage of hospitalized patients and environment of Hospital Universitário de Londrina. Cluster analysis was performed using UPGMA algorithm and Jaccard coefficient of the Bionumerics v. 4.6 software, with band tolerance set to 3%.

	<i>E.faecium</i>	Source	Date	Susceptibility profile							Virulence factors and resistance genes										
				AP	ER	TET	TEC	VAN	CIF	RIF	vanA	vanB	ermB	hyl	cylA	efaA	esp	gelE	asa	acm	
	2361	2361	ENV	2010	R	R	R	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
	2429	2429	ENV	2010	R	R	R	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
	1934	1934	ENV	2009	R	R	R	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
	2076	2076	RET	2009	R	R	S	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
	2332	2332	RET	2009	R	R	S	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
	2433	2433	ENV	2010	R	R	R	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
	2452	2452	ENV	2010	R	R	S	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	2387	2387	ENV	2010	R	R	S	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
	2548	2548	RET	2010	R	R	R	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
	1304	1304	RET	2010	R	R	S	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
	2369	2369	ENV	2010	R	R	S	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
	2373	2373	ENV	2010	R	R	R	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	1286	1286	RET	2009	R	R	R	R	R	R	R	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
	1327	1327	RET	2009	R	R	R	R	R	R	R	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
	1411	1411	RET	2009	R	R	R	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	1791	1791	RET	2009	R	R	R	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
	2408	2408	RET	2009	R	R	R	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
	1798	1798	RET	2009	R	R	S	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	1939	1939	RET	2010	R	R	R	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
	1621	1621-2	RET	2009	R	R	R	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
	1797	1797	RET	2009	R	R	R	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
	2180	2180-1	RET	2010	R	R	S	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
	2421	2421	ENV	2010	R	R	R	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
	2440	2440	ENV	2010	R	R	R	R	R	R	S	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-

Antimicrobial susceptibility pattern

All *E. faecium* isolates were resistant to vancomycin, teicoplanin, ampicillin, erythromycin and ciprofloxacin. The mechanisms of glycopeptides and erythromycin resistance were mediated by *vanA* type and *ermB* genes, respectively. The isolates were classified into three groups (I – III) according to the phenotypic resistance profile (Table 3), and the majority of them were clustered into the group II displaying resistance to ampicillin, ciprofloxacin, erythromycin, tetracycline, vancomycin and teicoplanin.

Table 3: Phenotypic antimicrobial resistance profile of *Enterococcus faecium* isolates from fecal carriage of hospitalized patients and environment of Hospital Universitário de Londrina.

Group	Phenotypic antimicrobial resistance	Environment	Colonization
I	amp, eri,tetra,tei,vanc,cip,rif	-	2
II	amp, eri,tetra,tei,vanc,cip	7	7
III	amp, eri,tei,vanc,cip	3	5
Total		10	14

Detection of putative virulence genes

All isolates harboured at least one putative virulence determinant, although the genes *asa*, *acm* and *cylA* were not detected. The *efaA* gene was the most widespread putative virulence marker and it was found in all isolates. Of all 24 isolates, 18 (75%) were positive for *esp* and 10 (41.7%) were positive for *gelE*. Regarding the origin of the isolates, nine each of human (colonization) and environmental group harboured the *esp* gene, however the presence of *gelE* was higher in colonization isolates (8 colonization versus 2 environmental isolates). In addition, a significant correlation between the presence of the gene *efaA* and *esp* was observed in this study. Details of all detected virulence determinants are showed in Table 4.

Table 4: Clusters of virulence genes according to the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* origin

Virulence markers	Environment <i>n</i> = 10	Colonization <i>n</i> = 14	Total <i>n</i> = 24
<i>efaA</i>	2	2	4
<i>efaA, esp</i>	6	4	10
<i>efaA, gelE</i>	-	2	2
<i>efaA, esp, gelE</i>	2	6	8

DISCUSSION

The environmental contamination increases the risk of VREfm acquisition, and heavy stool colonization with this bacterium may contribute to development of HAI (BONTEN et al., 1997; DREES et al., 2008; RUIZ-GARBAJOZA et al., 2012). For VREfm, besides the capacity to acquire and disseminate determinants of antimicrobial resistance (CATTOIR; LECLERCQ ., 2013), their inherent ability to persist at the environmental abiotic surfaces during long periods of time in healthcare settings (WENDT et al., 1998), and the acquisition of virulence determinants (QIN et al., 2012) may all contribute to development of specific hospital-adapted microorganism.

In this study, the occurrence of seven virulence determinants in VREfm isolated from stool of hospitalized patients and their environmental vicinity was investigated. The mechanism of vancomycin resistance is mediated by the *vanA* genes, which is consistent with our previous study with VREfm isolated at the hospital settings during the period from 2002 to 2007 (RUZON et al., 2010), and other Brazilian hospitals (PALAZZO et al., 2011; da SILVA et al., 2012). Besides the glycopeptides resistance, all isolates were also resistant to ampicillin, and ciprofloxacin that are characteristics of hospital-adapted *E. faecium* (TOP et al., 2008). *E. faecium* are intrinsically resistant to β -lactam antimicrobials due to mutations in PBP5 resulting in lower affinity to the ampicillin (QIN et al., 2012; CATTOIR; LECLERCQ 2013; SADOWY et al., 2013), or by overproduction of PBP5 (Klare et al., 1992). Concerning ciprofloxacin, the

mechanism of resistance is mediated by mutations in *gyrA* and *parC* genes (QIN et al., 2012; SADOWY et al., 2013). All isolates also showed resistance to erythromycin, which is mediated by *ermB* gene, which seems to be more widely distributed among VRE isolates (VANKERCKHOVEN et al., 2008; QIN et al., 2012).

By using REP-PCR fingerprinting, a predominant clonal group was not observed among VREfm during the period analyzed in this study, although one cluster harboured five isolates. This result indicates the large genetic diversity among VREfm in this hospital. In contrast, results of molecular studies using Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) or Multilocus Sequencing Typing (MLST) methods suggested the presence and spread of one predominant clonal group of VREfm in other Brazilian hospitals (CAMARGO et al., 2006; PALAZZO et al., 2011; da SILVA et al., 2012). PFGE has been considered the reference method for typing enterococci chromosomes due to its high discriminative power and established interpretative criteria (MURRAY et al., 1990; TENOVER et al., 1995). However this method is labor-intensive and time-consuming, and is not suitable for long-term epidemiological studies (BONTEN et al., 1998). MLST is reproducible sequencing-based method, but it is also time-consuming, has a lower discriminatory power than PFGE and due to the high cost it is not suitable for routine outbreaks analysis. REP-PCR is based on the amplification of repetitive DNA sequence, which are present in prokaryotic genomes and has been used to determine the genetic diversity of several bacteria (VERSALOVIC et al., 1991; BEDENDO, 2000; TRINDADE et al., 2003; ISENDAHL et al., 2013). BEDENDO (2000) showed a good correlation between REP-PCR and PFGE for typing *E. faecium* isolates, although some discrepancies were detected. Similar results were obtained when comparing the semi-automated REP-PCR method to PFGE to evaluate clonal diversity of VRE in a large prospective surveillance study (CHUANG et al., 2010; BOURDON et

al., 2011). REP-PCR is easy to use, display good discriminatory power, shorter time of execution and can be applied to a large or small numbers of isolates (TRINDADE et al., 2003). So, this method is a usefull tool for rapid screening of VRE isolates during an outbreak, contributing for initial implementation of control measures.

Several putative virulence markers have been detected in genoma of *E. faecium* from different origins (RUZON et al., 2010; da SILVA et al., 2012; QIN et al., 2012) and this genetic feature seems to be enriched among *E. faecium* that causes hospital-associated infections (WILLEMS et al., 2001; NALLAPAREDDY et al., 2003; RICE et al., 2003; UPADHYAYA et al., 2011). The *efaA* gene was detected in all VREfm isolates. While the genes *cylA*, *hyl*, *acm* and *asa* were not detected in all isolates in this study, high prevalence of *efaA* gene in VREfm was also observed in our previous study (RUZON et al., 2010). The expression of *E. faecalis efaA* is induced in presence of human serum (AITCHISON et al., 1987) and is repressed by manganese (LOW et al., 2003). The deduced amino acid sequence of *E. faecium* EfaA display 73% similarity to homolog protein of *E. faecalis* and 42-63% similarities to members of ATP-binding cassette transport proteins with adhesion properties of different streptococcal species (SINGH et al., 1998). In addition, the results of *E. faecalis efaA*⁻ mutant suggested a role in a mouse peritonitis model (SINGH et al., 1998). Further studies are needed to understand the role of EfaA as virulence factor of *E. faecium*.

The sequence of *esp* gene was detected in the majority of VREfm isolates in this study. The presence of *esp* gene in commensal isolates from hospitalized individuals were also detected by others (CAMARGO et al., 2006; HALLGREN et al., 2009; RUZON et al., 2010; PALAZZO et al., 2011; da SILVA et al., 2012). In contrast, this gene was rarely detected in commensal isolates from non-hospitalized health individuals (WILLEMS et al., 2001; UPADHYAYA et al., 2011). Indeed, together with

ampicillin, quinolone and vancomycin resistance, *esp* has been considered an important marker in hospital-adapted VREfm isolates (TOP et al., 2008). As mentioned before, the expression of *esp* can contribute to initial adherence and biofilm formation in polystyrene surface (HEIKENS et al., 2007). Esp is also involved in bacterium adhesion to uroepithelial cells and persistence in kidneys and bladder of mice (LEENDERTSE et al., 2009; SAVA et al., 2010) and endocarditis experimental infections (HEIKENS et al., 2011). However, this surface protein seems not affect the adhesion of colonic carcinoma cells and intestinal colonization of mice (HEIKENS et al., 2009).

The gene encoding gelatinase was detected in 41.7% of the isolates in this study. This result contrast with those obtained by Camargo et al., (2006) and Vankerckhoven et al., (2008) which did not detected the *gelE* gene in any VREfm isolates. As mentioned above, the role of *gelE* in various processes that contributes to the pathogenesis of *E. faecalis* in peritonitis, endophthalmitis and endocarditis experimental infections have been showed. Although the presence of *gelE* in different isolates of *E. faecium* have been showed by different authors (RUZON et al., 2010; LIU et al., 2011), the function of this protein in the *E. faecium* pathogenesis is unclear.

The intestinal colonization of hospitalized patients with VREfm is a first and crucial step in the pathogenesis of enterococcal infections (WELLS et al., 1995; MATAR et al., 2006). From this site, the bacterium can translocate from the intestinal lumen to extraintestinal sites, or contaminate the environment and equipments constituting important sources of infection. The prevalence of *E. faecium* harbouring multiple antimicrobial resistance and putative virulence genes alert us for the potential risk of infection in hospitalized patients, corroborating to the importance of the control of healthcare-associated infections.

ACKNOWLEDGEMENTS

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 L.V.P. Gomes. We thank Dr. A. Leyva for English editing of the manuscript and Ediel Clementino da Costa for technical support.

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 of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 211-215, feb. 1987.
- BEDENDO, J.; PIGNATARI, A. C. Typing of *Enterococcus faecium* by polymerase chain reaction and pulsed field gel electrophoresis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 11, p. 1269-1274, nov. 2000.
- BILLSTROM, H.; LUND, B.; SULLIVANA A. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 374–377, 28 abril. 2008.
- BONTEN, M. J.; HAYDEN, M. K.; NATHAN, C.; RICE, T. W.; WEINSTEIN, R. A. Stability of vancomycin-resistant enterococcal genotypes isolated from long-term-colonized patients. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 2, p. 378-382, feb. 1997.
- BONTEN, M. J.; SLAUGHTER, S.; HAYDEN, M. K.; NATHAN, C.; VAN VOORHIS, J.; WEINSTEIN, R. A. External sources of vancomycin-resistant enterococci for intensive care units. **Critical care medicine**, v. 26, n. 12, p. 2001-2004, dec. 1998.
- BOURDON N, GUYON M, THIOLET J, MAUGAT S, COIGNARD B, **J Antimicrob Chemother** Changing trends in vancomycin-resistant enterococci in French hospitals, 2001–08, 2011.
- 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, n. 11, p. 1123-1130, nov. 2006.

CATTOIR, V.; LECLERCQ, R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce?. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 4, p. 731-742, apr. 2013.

CHUANG, YC.; WANG, JT.; CHEN, ML.; CHEN, YC. Comparison of an automated repetitive-sequence-based PCR microbial typing system with pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 8, p. 2897-2901, aug. 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE: **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**, 7. ed. CLSI Approved standard M7-A7. Wayne, PA, 2011.

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

DREES, M.; SNYDMAN, D. R.; SCHMID, C. H.; BAREFOOT, L.; HANSJOSTEN, K.; VUE, P. M.; CRONIN, M.; NASRAWAY, S. A.; GOLAN, Y. Antibiotic exposure and room contamination among patients colonized with vancomycin-resistant enterococci. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 8, p. 709-715, aug. 2008.

ENGELBERT, M.; MYLONAKIS, E.; AUSUBEL, F. M.; CALDERWOOD, S. B.; GILMORE, M. S. Contribution of gelatinase, serine protease, and *fsr* to the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 6, p. 3628-3633, jun. 2004.

GHOLIZADEH, Y.; PREVOST, M.; BAMBEKE, F. V.; 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, abr. 2001.

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 *E. faecium* of clinical origin. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 299, n. 5, p. 323-332, jun. 2009.

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, n. 22, p. 8233-8240, nov. 2007.

HEIKENS, E.; LEENDERTSE, M.; WIJNANDS, L. M.; VAN LUIT-ASBROEK, M.; BONTEN, M. J.; VAN DER POLL, T.; WILLEMS, R. J. Enterococcal surface protein Esp is not essential for cell adhesion and intestinal colonization of *Enterococcus faecium* in mice. **BMC Microbiology**, jan. 2009.

HEIKENS, E.; SINGH, K. V.; JACQUES-PALAZ, K. D.; VAN LUIT-ASBROEK, M.; OOSTDIJK, E. A.; BONTEN, M. J.; MURRAY, B. E.; WILLEMS, R. J. Contribution of the enterococcal surface protein Esp to pathogenesis of *Enterococcus faecium* endocarditis. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 14-15, p. 1185-1190, dec. 2011.

HIDRON, A. I.; EDWARDS, 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 reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 11, p. 996-1011, nov. 2008.

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, n. 5, p. 309-332, jun. 2008.

ISENDAHL, J.; TURLEJ-ROGACKA, A.; MANJUBA, C.; RODRIGUES, A.; GISKE, C. G.; NAUCLÉR, P. Fecal carriage of ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* in children in Guinea-Bissau: a hospital-based cross-sectional study. **PLoS One**, v. 7, n. 12, 2013.

JETT, B. D.; JENSEN, H. G.; NORDQUIST, R. E.; GILMORE, M. S. Contribution of the *pADI*-encoded cytolysin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 6, p. 2445-2452, jun. 1992.

KRAKER, M. E.; JARLIER, V.; MONEN, J. C.; HEUER, O. E.; VAN DE SANDE, N.; GRUNDMANN, H. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. **Clinical Microbiology and Infection**, oct. 2012.

KLARE, I.; RODLOFF, A. C.; WAGNER, J.; WITTE, W.; HAKENBECK, R. Overproduction of a penicillin-binding protein is not the only mechanism of penicillin resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 4, p. 783-787, apr. 1992.

LAM, M. M.; SEEMANN, T.; BULACH, D. M.; GLADMAN, S. L.; CHEN, H.; HARING, V.; MOORE, R. J.; BALLARD, S.; GRAYSON, M. L.; JOHNSON, P. D.; HOWDEN, B. P.; STINEAR, T. P. Comparative Analysis of the First Complete *Enterococcus faecium* Genome. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 9, p. 2334-2341, may. 2012.

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, n. 3, p. 672-682, feb. 2004.

LEENDERTSE, M.; HEIKENS, E.; WIJNANDS, L. M.; VAN LUIT-ASBROEK, M.; TESKE, G. J.; ROELOFS, J. J.; BONTEN, M. J.; VAN DER POLL, T.; WILLEMS, R. J. Enterococcal surface protein transiently aggravates *Enterococcus faecium*-induced urinary tract infection in mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 7, p. 1162-1165, oct. 2009.

LIU, Y.; CAO, B.; GU, L.; WANG, H. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci in a Chinese hospital between 2003 and 2009. **Microbial Drug Resistance**, v. 17, n. 3, p. 449-455, sep. 2011.

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, n. 2, p. 113-119, feb. 2003.

LOWE, A. M.; LAMBERT, P. A.; SMITH, A. W. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 2, p. 703-706, feb. 1995.

MATAR, M. J.; SAFDAR, A.; ROLSTON, K. V. Relationship of colonization with vancomycin-resistant enterococci and risk of systemic infection in patients with cancer. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 10, p. 1506-1507, may. 2006.

MCCRACKEN, M. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococcal bacteraemia: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, 1999-2009. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, mar. 2013.

MURRAY, B. E.; SINGH, K. V.; HEATH, J. D.; SHARMA, B. R.; WEINSTOCK, G. M. Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 9, p. 2059-2063, sept. 1990.

NALLAPAREDDY, S. R.; SINGH, K. V.; MURRAY, B. E. Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acn, a new member of the MSCRAMM family. **Molecular Microbiology**, v. 47, n.6, p. 1733-1744, 2003.

NALLAPAREDDY, S. R.; SINGH, K. V.; MURRAY, B. E. Contribution of the collagen adhesin Acn to pathogenesis of *Enterococcus faecium* in experimental endocarditis. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 4120-4128, sep. 2008.

NILSSON, O. Vancomycin resistant enterococci in farm animals – occurrence and importance. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 2, april. 2012.

PALAZZO, I. C.; PITONDO-SILVA, A.; LEVY, C. E.; DA COSTA DARINI, A. L. Changes in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing outbreaks in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, v. 79, n. 1, p. 70-74, sep. 2011.

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

PATTI, J. M.; JONSSON, H.; GUSS, B.; SWITALSKI, L. M.; WIBERG, K.; LINDBERG, M.; HÖÖK, M. Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 7, p. 4766-4772, mar. 1992.

PETRICH, A. K.; LUINSTRA, 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, n. 4, p. 275-281, aug. 1999.

QIN, X. Complete genome sequence of *Enterococcus faecium* strain TX16 and comparative genomic analysis of *Enterococcus faecium* genomes. **BMC Microbiology**, jul. 2012.

RICH, R. L.; KREIKEMEYER, B.; OWENS, R. T.; LABRENZ, S.; NARAYANA, S. V.; WEINSTOCK, G. M.; MURRAY, B. E.; HÖÖK, M. Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 38, p. 26939-26945, sep. 1999.

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, *hylEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. 3, p. 508-512, feb. 2003.

RUIZ-GARBAJOSA, P.; DE REGT, M.; BONTEN, M.; BAQUERO, F.; COQUE, T. M.; CANTÓN, R.; HARMSSEN, H. J.; WILLEMS, R. J. High-density fecal *Enterococcus faecium* colonization in hospitalized patients is associated with the presence of the polyclonal subcluster CC17. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p. 519-522, apr. 2012.

RUZON, F. I.; DE PAULA, S. B.; KANOSHIKI, R. L.; PEREIRA-SANTOS, J.; KERBAUY, G.; KOBAYASHI, R. K.; YAMAUCHI, L. M.; PERUGINI, M. R.; YAMADA-OGATTA, S. F. Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* *vanA* isolated from different sources at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 814-821, dec. 2010.

SADOWY, E.; SIENKO, A.; GAWRYSZEWSKA, I.; BOJARSKA, A.; MALINOWSKA, K.; HRYNIEWICZ, W. High abundance and diversity of antimicrobial resistance determinants among early vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Poland. **European Journal of Clinical Microbiology And Infectious Diseases**, april. 2013.

SAVA, I. G.; HEIKENS, E.; KROPEC, A.; THEILACKER, C.; WILLEMS, R.; HUEBNER, J. Enterococcal surface protein contributes to persistence in the host but is not a target of opsonic and protective antibodies in *Enterococcus faecium* infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 1001-1004, sep. 2010.

SCHLIEVERT, P. M.; GAHR, P. J.; ASSIMACOPOULOS, A. P.; DINGES, M. M.; STOEHR, J. A.; HARMALA, J. W.; HIRT, H.; DUNNY, G. M. Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 1, p. 218-223, jan. 1997.

SGHIR, A.; GRAMET, G.; SUAUA, 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, n. 5, p. 2263-2266, may. 2000.

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, n. 7, p. 4366-4372, jul. 2001.

SILVA, L. P.; PITONDO-SILVA, A.; MARTINEZ, R.; DARINI, A. L. Genetic features and molecular epidemiology of *Enterococcus faecium* isolated in two university hospitals in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 74, n. 3, p. 267-271, nov. 2012.

SINGH, K. V.; QIN, X.; WEINSTOCK, G. M.; MURRAY, B. E. Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 178, n. 5, p. 1416-1420, nov. 1998.

SHANKAR, N.; BAGHDAYAN, A. S.; GILMORE, M. S. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Nature**, v. 417, n. 6890, p. 746-750, jun. 2002.

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, n. 1, p. 415-420, jan. 1991.

SUNDSFJORD, A.; WILLEMS, R. Enterococcus research - recent developments and clinical challenges. **Clinical Microbiology and Infection**, mar. 2010.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, sept. 1995.

THOMAS, V. C.; HIROMASA, Y.; HARMS, N.; THURLOW, L.; TOMICH, J.; HANCOCK, L. E. A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. **Molecular Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 1022-1036, may. 2009.

THURLOW, L. R.; THOMAS, V. C.; NARAYANAN, S.; OLSON, S.; FLEMING, S. D.; HANCOCK, L. E. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 11, p. 4936-4943, nov. 2010.

TOP, J.; WILLEMS, R.; BONTEN, M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium* : from commensal to hospital-adapted pathogen. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 297-308, apr. 2008.

TRINDADE, P. A.; MCCULLOCH, J. A.; OLIVEIRA, G. A.; MAMIZUKA, E. M. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 32-43, feb. 2003.

UPADHYAYA, G. P.; LINGADEVARU, U. B.; LINGEGOWDA, R. K. Comparative study among clinical and commensal isolates of *Enterococcus faecalis* for presence of *esp* gene and biofilm production. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, n. 5, p. 365-369, may. 2011.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, nov. 1991.

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, n. 14, p. 4247-4255, jul. 2008.

VANKERCKHOVEN, V. Development of a Multiplex PCR for the Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* Genes in Enterococci and Survey for Virulence Determinants among European Hospital Isolates of *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4473-4479, oct. 2004.

WATERS, C. M.; ANTIPOORTA, 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, n. 12, p. 3613-3623, jun. 2003.

WATERS, C. M.; HIRT, H.; MCCORMICK, J. K.; SCHLIEVERT, P. M.; WELLS, C. L.; DUNNY, G. M. An amino-terminal domain of *Enterococcus faecalis* aggregation substance is required for aggregation, bacterial internalization by epithelial cells and binding to lipoteichoic acid. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1159-1171, may. 2004.

WELLS, C. L.; JUNI, B. A.; CAMERON, S. B.; MASON, K. R.; DUNN, D. L.; FERRIERI, P.; RHAME, F. S. Stool carriage, clinical isolation, and mortality during an outbreak of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized medical and/or surgical patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 45-50, jul. 1995.

WENDT, C.; WIESENTHAL, B.; DIETZ, E.; RÜDEN, H. Survival of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococci on dry surfaces. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 12, p. 3734-3736, dec. 1998.

WERNER, G.; KLARE, I.; FLEIGE, C.; GERINGER, U.; WITTE, W.; JUST, H. M.; ZIEGLER, R. Vancomycin-resistant *vanB*-type *Enterococcus faecium* isolates expressing varying levels of vancomycin resistance and being highly prevalent among neonatal patients in a single ICU. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 1, n. 1, may. 2012.

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, n. 9059, p. 853-855, mar. 2001.

ZENG, G.; TENG, F.; MURRAY, B. E. Gelatinase Is Important for Translocation of *Enterococcus faecalis* across Polarized Human Enterocyte-Like T84 Cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, oct. 2005.

6 TRABALHO CIENTÍFICO 2

Título: Detecção de *Enterococcus faecium* pertencente ao Complexo Clonal 17 no Hospital Universitário de Londrina

Gomes, L.V.P.¹; Morey, A.T.¹; Santos, P.J ; Cardoso, J.D³,M.¹ Perugini, M.R. ²; Yamauchi, L.M.¹; Yamada-Ogatta, S.F.¹

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

²Laboratório de Microbiologia Clínica, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

³ Instituto Agrônomo do Paraná, Departamento de Microbiologia do Solo, CEP 86047-902. Londrina, Paraná, Brazil.

Autor correspondente:

Sueli Fumie Yamada-Ogatta, Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia. Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380. CEP 86057-970.

Tel: +55-43-3371-5503; fax: +55-43-3371-4788.

e-mail: ogatta@uel.br

RESUMO

Enterococcus faecium resistente a vancomicina (VRE) é um importante agente de infecções associadas aos serviços de assistência à saúde humana. *E. faecium* pertencente a linhagem genética denominada CC17 [*Clonal Complex* 17] tem sido descrito mundialmente. Este complexo é constituído por genogrupos hospedeiro-específicos associados ao ambiente hospitalar. Os objetivos deste estudo foram: determinar o genótipo de resistência a eritromicina; detectar a presença de sequências nucleotídicas complementares aos genes que codificam os fatores de virulência *hyl*, *asa* e *acm*; determinar a capacidade dos isolados em aderir a células epiteliais de mamíferos *in vitro* e formar biofilme em poliestireno; determinar a atividade de hialuronidase *in vitro*; e determinar o genótipo dos isolados utilizando-se as técnicas de REP-PCR e MLST de dez *E. faecium* resistentes a vancomicina isolados de diferentes fontes no Hospital Universitário de Londrina (HUL). A presença dos genes *asa*, *acm* e *hyl*, e o genótipo de resistência a eritromicina foi detectada por PCR. A resistência a eritromicina, para todos isolados, é mediada pelo gene *ermB*. O gene *asa* estava presente em quatro isolados, enquanto que os genes *acm* e *hyl* não foram detectados nos isolados. A atividade de hialuronidase em meio contendo hialuronato de sódio não foi observada para nenhum isolado. Alta diversidade genética foi observada entre os isolados pela metodologia de REP-PCR, onde 7 grupos puderam ser observados. A análise por MLST mostrou que os isolados agruparam em 6 STs distintos (ST-203, ST-412, ST-596, ST-658, ST-730, ST-742). ST-412 foi o mais frequente entre os VREs e pertence ao complexo clonal 17 (CC17). A presença desse complexo clonal corrobora a importância de medidas para identificação e controle desse microrganismo em serviços relacionados à assistência à saúde.

Palavras-chave: *Enterococcus faecium* vanA/*ermB*, fatores de virulência, REP-PCR, MLST, CC17.

INTRODUÇÃO

Os enterococos são cocos Gram-positivos que fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal de seres humanos e de animais (SGHIR et al., 2000) e podem ser encontrados no solo (KIBLI et al., 2012), água e alimentos (RATHNAYAKE et al., 2012). Embora sejam considerados micro-organismos de baixo potencial de virulência, os enterococos vêm se destacando nas últimas décadas como importantes agentes etiológicos de Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde [IRAS (HIDRON et al., 2008; WOODFORD; LIVERMORE, 2009; SHARIFI et al., 2012; THIERFELDER et al., 2012)]. De fato, estudos de epidemiologia molecular sugerem que a emergência de *E. faecalis* (MCBRIDE et al., 2007) e *E. faecium* (WILLEMS et al., 2005; GALLOWAY-PEÑA et al., 2009) como importantes agentes de IRAS é resultado da evolução de uma linhagem genética ou complexo clonal específico que “acumulou” ao longo do tempo multirresistência aos antimicrobianos e determinantes de virulência. Mais especificamente, a partir de análises do tipo MLST (Multilocus sequence typing) de isolados de *E. faecium*, foi observado a existência de genogrupos hospedeiro-específico associados ao ambiente hospitalar e entre eles a linhagem genética denominada CC17 [*Clonal Complex 17* (WILLEMS et al., 2005)].

No Brasil, o primeiro caso de enterococos resistente a vancomicina foi reportado em 1996 na unidade de hematologia pediátrica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná (COSTA et al., 1998). Após esse caso, outros surtos foram descritos em diversas áreas do país (CEREDA et al., 2001; CAIAFFA FILHO et al., 2003).

Várias moléculas contribuem para a virulência de cepas adaptadas ao hospedeiro e dentre elas destacam-se EfaA - antígeno A de *Enterococcus faecalis* associado a endocardite (gene *efaA*: *Enterococcus faecalis* antigen A); Acm - adesina que se liga a colágeno (gene *acm*: adhesin of collagen from *Enterococcus faecium*); gelatinase (gene *gelE*); citolisina (gene *cyl*); hialuronidase (gene *hyl*); proteína de superfície (gene *esp*); fator de agregação (gene *asa1*).

Há necessidade de estudos epidemiológicos de *Enterococcus* spp., pois os relatos indicam que muitas cepas que causam surtos hospitalares em diferentes países representam a expansão clonal de uma única linhagem clonal. Em vista do exposto, o objetivo principal desse trabalho foi analisar a clonalidade de *Enterococcus faecium*

resistentes a vancomicina (VRE_{fm}) isolados no Hospital Universitário de Londrina por duas técnicas de genotipagem; detectar a presença dos genes que codificam os fatores de virulência *hyl*, *asa* e *acm* e correlacionar com o fenótipo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados bacterianos e identificação de *Enterococcus faecium*

Dez *E. faecium* isolados de diferentes origens no Hospital Universitário de Londrina no período de 2005 e 2007, entre os meses de junho e julho foram incluídos neste trabalho. Estes isolados foram previamente caracterizados por Ruzon et al., (2010) (Tabela 1). A identidade das espécies foi reavaliada por métodos fenotípicos e moleculares. Assim, colônias presuntivas de *Enterococcus* spp. crescidas em ágar VRE suplementado com 6 µg/ml de vancomicina (OXOID[®], Inglaterra) a 37 °C após 18 horas de incubação foram previamente identificadas por análise morfológica (coloração de Gram) e testes bioquímicos (tolerância ao NaCl 6,5% e hidrólise da esculina). A identificação da espécie foi realizada por crescimento em meio cromogênico CHROMagar[™] VRE e testes bioquímicos utilizando-se o método automatizado (MicroScan[®] - DADE Behring). A confirmação da identidade da espécie foi realizada por PCR. A sequência nucleotídica do gene *ddl* de *E. faecium* BM4147 depositada no banco de dados GenBank (número de acesso AF294727) foi utilizada para desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (GHOLIZADEH et al., 2001). A reação de amplificação foi realizada em volume final de 50 µL contendo 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador (F: 5'-GATGCAGGCAGAGATATCAGC-3' e R: 5'-TTATTTATTTATTCTCATTTGTAACGACTAG-3'), 6 U *Taq* DNA polimerase e 100 ng de DNA genômico em termociclador Veriti (Applied Biosystems). O esquema de amplificação foi temperatura inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, hibridação a 50 °C por 30 segundos, polimerização a 72 °C por 30 segundos. Reações sem acréscimo de DNA e com DNA genômico de *E. faecium* ATCC 29212 foram utilizados como controles negativo e positivo das PCRs, respectivamente.

Tabela 1: Caracterização dos 10 isolados de *Enterococcus faecium* selecionados

Isolado	Sexo	Idade	Setor	Data da coleta	Origem	PFGE ^a
17	M	82	UT2	22-07-2005	Urina	E
170	F	4	Ambulatório	27-04-2007	Urina	N
5	M	71	UT2	26-07-2005	Secreção de bolsa escrotal	B
167	M	43	UT2	11-04-2007	Urina	P
172	M	92	PS	14-08-2007	Urina	B
15	M	33	UT2	15-12-2005	Urina	B2
35	F	71	UD	30-10-2006	Sangue	B
176	M	68	UTI	16-07-2007	Sangue	B4
37	F	84	UTI	04-12-2006	Urina	B7
47	M	71	UTI2	26-03-2007	Swab retal	B7

^aFonte Ruzon et al., 2010.

Determinação da atividade de hialuronidase

A atividade da hialuronidase foi determinada pelo método em placa descrito por Smith e Willet (1968) utilizando-se hialuronato de sódio (2mg/mL) obtido de *Streptococcus equi* em substituição ao hialuronato de potássio de cordão umbilical humano.

Formação de biofilme

O ensaio qualitativo para a formação do biofilme foi realizado conforme metodologia descrita por Borges et al., 2012, em meio BHI com adição de 0,75% de glicose e incubação a 37 °C por 24 horas. Os testes foram feitos em triplicata. A densidade celular do biofilme foi avaliada em comprimento de onda de 570 nm em leitora de placa (EPSON Action Printer 2000) e o *cutt-off* (DOc) definido conforme metodologia descrita.

Adesão das bactérias a células LLC-MK2

A capacidade de adesão dos isolados a células LLC-MK2 (cérebro de macaco rhesus) foi determinada como descrito em Archimbaud et al. (2002) com modificações. As células LLC-MK2 foram previamente cultivadas em placas de poliestireno de 24 poços em meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina, 100 mg/mL estreptomicina e 0,25 mg/mL anfotericina B em presença de 5% de CO₂ à 37 °C por 24 horas. Para o teste de adesão, 5 x 10⁵ células epiteliais foram incubadas com aproximadamente 5 x 10⁷ bactérias a 37 °C por 2 h em uma atmosfera com 5% CO₂. Após esse período o meio de cultura foi aspirado e as células foram lisadas por tratamento com 1 mL 0,5% (v/v) Triton X-100 (VETEC). Diluições seriadas (1:10) foram inoculadas em placas contendo meio Mueller Hinton Agar (MHA, DIFCO) para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Os experimentos foram feitos em duplicata e em três diferentes ocasiões. A porcentagem de adesão foi calculada segundo a equação: % adesão = (UFC₁₂₀/UFC₀) x 100, em que UFC₁₂₀ se refere às bactérias aderidas após 2 horas e UFC₀ o número inicial de células inoculadas.

Detecção de genes que codificam fatores de virulência e resistência a eritromicina

Os genes pesquisados neste trabalho, bem como as sequências nucleotídicas dos oligonucleotídeos iniciadores estão mostrados na Tabela 2. As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 20 µL contendo 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 20 pmol de cada iniciador (senso e antisenso), 6 U *Taq* DNA polimerase, 100 ng de DNA genômico no em termociclador Veriti (Applied Biosystems). Para todos os genes, exceto *ermB* o esquema de amplificação foi temperatura inicial de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguido por 25 ciclos de 94 °C por 30 segundos, hibridação a 55 °C por 30 segundos, polimerização a 72 °C por 30 segundos. Para os genes *ermA/ermB*, a reação de amplificação ocorreu com temperatura inicial de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, seguido por 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, hibridação a 60 °C por 1 minuto, polimerização a 72°C por 45 segundos. O controle negativo foi constituído pelos reagentes da reação, exceto pelo DNA, substituído por igual volume de água ultrapura. Após amplificação, 3 µL de cada produto de PCR, e do marcador de massa molecular (1Kb plus DNA Ladder – Invitrogen) foram corados com GelRed™ e separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE (89 mM Tris, 89

mM ácido bórico e 2 mM EDTA pH 8,3) visualizados e fotografados sob transiluminação ultravioleta.

Tabela 2: Genes de *Enterococcus faecium* que codificam fatores de virulência e resistência a eritromicina, e oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR.

Gene	Sequência do iniciador (5'→3')	Amplicon (pb)	Referência
<i>hyl</i>	F: GAGTAGAGGAATATCTTAGC R: AGGCTCCAATTCTGT	260	Gomes et al., 2013
<i>asal</i>	F: CACGCTATTACGAACTATGA R: TAAGAAAGAACATCACCACGA	375	Billstrom et al., 2008
<i>acm</i>	F: GATGCAGGCAGAGATATCAGC R: TTATTTATTTATTCTCATTTGTAACGACTAG	1503	Nallapareddy et al., 2003
<i>ermA</i>	F: CCGGCAAGGAGAAGGTTATAATGA R: GCATTCACCCGTTGACTCATTTCC	225	Gomes et al., 2013
<i>ermB</i>	F: GCTCTTGCACACTCAAGTCTCGAT R: ACATCTGTGGTATGGCGGGTAAGT	117	Gomes et al., 2013

Genotipagem de *E. faecium*

O genótipo dos isolados foi determinado por REP-PCR [(*Repetitive Extragenic Palindromic elements*-PCR (VERSALOVIC et al., 1991)] e MLST [*Multilocus Sequencing Typing*, (HOMAN et al., 2002)]. Para REP-PCR, a reação foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 1,5 mM MgCl₂, 1 U *Taq* DNA polimerase, 1,25 mM de cada dNTP, 100 ng de DNA genômico, 50 pmol de cada iniciador (senso e antisenso). O esquema de amplificação foi o seguinte: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos a 94 °C por 1 minuto, hibridação a 48 °C por 1 minuto, polimerização a 72 °C por 3 minutos e um ciclo de extensão final a 72 °C por 7 minutos. Para MLST foram analisados fragmentos internos de 7 genes *housekeeping* (genes constitutivos conservados, de evolução lenta e normalmente codificantes de enzimas do metabolismo primário metabólicas ou proteínas de regulação) para a determinação do ST (*sequencing type*) dos isolados (Tabela 3). Inicialmente os

amplicons foram obtidos em volume final de 50 μ L contendo 1,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador (senso e antisenso), 1 U Platinum®Taq DNA Polymerase High Fidelity e 100 ng de DNA genômico. A amplificação foi realizada em termociclador Veriti com um ciclo inicial de desnaturação de 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos a 94 °C 30 segundos, 50 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos e um ciclo de extensão final 72 °C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se PureLink Quick Gel (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante.

A sequência nucleotídica dos amplicons foram determinada pelo método descrito por Sanger et al. (1977) modificado, utilizando o protocolo para BigDye™ Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. As reações foram aplicadas no sequenciador automático 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). A identidade das sequências será confirmada utilizando-se o algoritmo Blast (ALTSCHUL et al, 1997) da página do “National Center for Biotechnology Information – NCBI” vinculado ao “National Institute of Health – NIH” (www.ncbi.nlm.nih.org). Para a análise dos perfis alélicos foi realizado a análise computacional dos dados do MLST, utilizando o BioEdit software. O programa MEGA foi utilizado para calcular números médios das diferenças nucleotídicas entre alelos. Diferentes sequências de determinado *locus* receberam números de alelos, e a cada combinação única de alelos (perfil alélico) foram atribuídos um tipo de sequência (ST). O formato digital dos dados do MLST facilitará o estabelecimento de uma base de dados única para cada micro-organismo podendo ser consultada via internet para a comparação de alelos e obtenção rápida dos ST e seus complexos clonais, contribuindo para o entendimento da distribuição clonal dos agentes de doenças infecciosas.

Agrupamento dos isolados

A análise do agrupamento foi realizada com os perfis de bandas geradas por REP-PCR com auxílio do programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v.4.6), usando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J) (SNEATH, 1973) com tolerância de 3%.

Tabela 3: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para genotipagem de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina por REP-PCR (VERSALOVIC et al., 1991) e MLST (HOMAN et al., 2002).

Gene/Alvo	Sequência do iniciador (5'→3')	Amplicon (pares de bases)
REP-PCR	F:CGICGICATCIGCC R:ICGICTTATCIGGCCTAC	-
<i>adk</i>	F: TATGAACCTCATTTTAATGGG R: GTTGACTGCCAAACGATTTT	437
<i>atpA1n2n</i>	F: CGGTTCATACGGAATGGCACA R: AAGTTCACGATAAGCCACGG	556
<i>ddl</i>	F: GAGACATTGAATATGCCTTATG R: AAAAAGAAATCGCACCG	465
<i>gdh</i>	F: GGCGCACTAAAAGATATGGT R: CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	530
<i>gyd</i>	F: CAAACTGCTTAGCTCCAAGGC R: CATTTCGTTGTCATACCAAGC	395
<i>purk1n2n</i>	F: GCAGATTGGCACATTGAAAGT R: TACATAAATCCCGCCTGTTTCT	492
<i>psts</i>	F: TTGAGCCAAGTCGAAGCTGGAG R: CGTGATCACGTTCTACTTCC	583

RESULTADOS

Identificação de *Enterococcus faecium*

Os isolados de VREfm deste estudo, previamente caracterizados por Ruzon et al., (2010), foram incluídos de acordo com o perfil de PFGE e presença do gene *esp*. Assim, 10 isolados (8 provenientes de infecção e 2 de colonização) foram selecionados para detectar se o clone epidêmico CC17 encontra-se disseminado no Hospital Universitário de Londrina. Além disso, outras características fenotípicas e genotípicas também foram avaliadas.

Todos isolados foram reavaliados quanto a sua identidade por métodos fenotípicos e moleculares. Na Figura 1 pode-se observar o crescimento das colônias pequenas, características de *Enterococcus* spp. em ágar VRE, após cultivo prévio em caldo VRE (OXOID[®], Inglaterra) contendo 6 µg/ml de vancomicina, 6 µg/ml ciprofloxacino e 8 µg/ml de colistina, por 18 h a 37 °C. A análise morfológica confirmou a presença de cocos Gram-positivos dispostos em pares, e todos isolados foram capazes de crescer em presença de NaCl 6,5% e em CHROMagar[™] VRE, observando-se o crescimento de colônias pequenas e verdes. Também foram capazes de hidrolisar a esculina. Concomitantemente, *E. faecium* foi identificado por testes bioquímicos utilizando-se o método automatizado (MicroScan[®] - DADE Behring). A identidade da espécie foi confirmada por PCR utilizando o primer específico complementar ao gene *ddl*-ligase de *Enterococcus faecium* (*ddl* – *E.faecium*) que produz um fragmento de aproximadamente 1150 pb, e pode ser observado na Figura 2.



Figura 1: Crescimento de colônias características de *Enterococcus* spp, em ágar VRE contendo 6 µg/ml de vancomicina, de isolados de VRE VREHU/UEL.

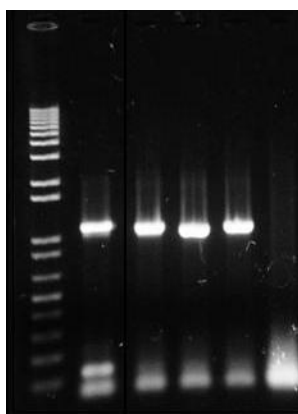


Figura 2: Perfil de amplificação do gene *ddl* *E.faecium* (1150pb). Canaleta 1: marcador de massa molecular 1kb-plus (Invitrogen®); Canaleta 2: controle positivo. Canaleta 3-4: isolados de colonização. Canaleta 5: isolado de infecção.. Canaleta 6: branco.

A concentração inibitória mínima (CIM) para vancomicina para as 10 amostras foram analisada por *E-Test*® macrométodo com leitura em 48 horas. Sendo as CIMs para todos isolados foram > 256 µg/ml.

Produção e quantificação do biofilme e adesão bacteriana em células LLC-MK2

Todos isolados foram capazes de aderir em células de mamífero, embora uma pequena porcentagem de bactérias aderidas pode ser observada. Seis isolados foram capazes de formar biofilme sobre a superfície de poliestireno e foram classificados como fracamente formador (1 isolado), moderadamente formador (1 isolado) e fortemente formador (4). A Tabela 4 mostra os resultados obtidos para todos isolados.

Tabela 4: Valores de DO obtidos no ensaio de formação de biofilme e porcentagem de adesão de *Enterococcus faecium* isolados no período de 2005 e 2007

Isolado	Origem	Biofilme ^a	Adesão ^b
17	Colonização	0,02± 0,006	2,59 ± 0,00127
170	Infecção	1,02± 0,059	4,665 ± 0,0094
5	Infecção	0,028± 0,024	4,515 ± 0,00212
167	Infecção	0,537± 0,16	1,14 ± 0,0019
172	Infecção	0,720± 0,083	3,765 ± 0,0061
15	Colonização	0,029± 0,016	7,635 ± 0,0164
35	Infecção	0,050± 0,014	4,605 ± 0,0017
176	Colonização	0,102± 21	7,93 ± 0,0046
37	Infecção	0,250± 0,14	4,755 ± 0,0034
47	Infecção	2,03± 0,61	3,9 ± 0,0014

^aA formação de biofilme foi avaliada sobre a superfície de poliestireno. Os isolados foram classificados de acordo com a densidade óptica (DO) obtida, conforme os seguintes critérios: DO < 0,100 = não formador de biofilme (NF); 0,101 a 0,250 = fracamente formador (FF); 0,250 a 0,500 = moderadamente formador (MF); > 0,500 = fortemente formador (FoF) (STEPANOVIC et al., 2000); ^bA porcentagem de adesão das bactérias sobre células LLC-MK2 foi calculada segundo a equação: % adesão = (UFC₁₂₀/UFC₀) x 100, em que UFC₁₂₀ se refere às bactérias aderidas após 2 horas e UFC₀ o número inicial de células inoculadas.

Identificação dos genes que codificam fatores de virulência e resistência a eritromicina

Os genes pesquisados neste estudo foram: *hyl* que codifica hialuronidase, *asa1* que codifica substância de agregação e *acm* que codifica proteína de ligação ao colágeno de *E. faecium*. Os 10 isolados apresentaram variações na presença dos fatores de virulência (Tabela 5). Enquanto os genes *acm* e *hyl* não foram detectados em nenhum isolado, o gene *asa1* foi detectado em quatro isolados.

Todos isolados apresentaram resistência fenotípica a eritromicina (RUZON et al., 2010) e o mecanismo envolvido nesse processo é mediado por *ermB*.

Tabela 5: Distribuição dos genes que codificam fatores de virulência e resistência a eritromicina em *Enterococcus faecium* isolados de diferentes fontes no Hospital Universitário de Londrina, Paraná, no período de 2005 e 2007.

Isolado	<i>asa1</i>	<i>acm</i>	<i>hyl</i>	<i>ermB</i>
17	-	-	-	+
170	-	-	-	+
5	+	-	-	+
167	-	-	-	+
172	-	-	-	+
15	-	-	-	+
35	-	-	-	+
176	+	-	-	+
37	+	-	-	+
47	+	-	-	+

Tipagem dos isolados utilizando a metodologia REP – PCR

A análise por REP-PCR permitiu a separação de acordo com o perfil das bandas e similaridade de 85% entre os isolados (Figura 6) para serem considerados como relacionados. Alta diversidade foi observada entre os isolados através dessa metodologia, onde 7 grupos foram observados. Um grupo foi constituído por dois isolados, outro com três e os demais foram únicos. Os isolados 17 e 170 apresentaram 92% de similaridade. O isolado 5 apresentou 71% de similaridade quando comparado aos isolados 17 e 170. Os isolados 167 e 172 apresentaram 100% de similaridade quando comparados entre eles. O isolado 15 apresentou 90% de similaridade quando comparado aos isolados 167 e 172, sendo considerado relacionado a este cluster. O isolado 35 apresentou 81 % de similaridade com os isolados 167, 172 e 15. Os isolados 176, 37 e 47 apresentaram similaridade inferior a 85% com os outros isolados.

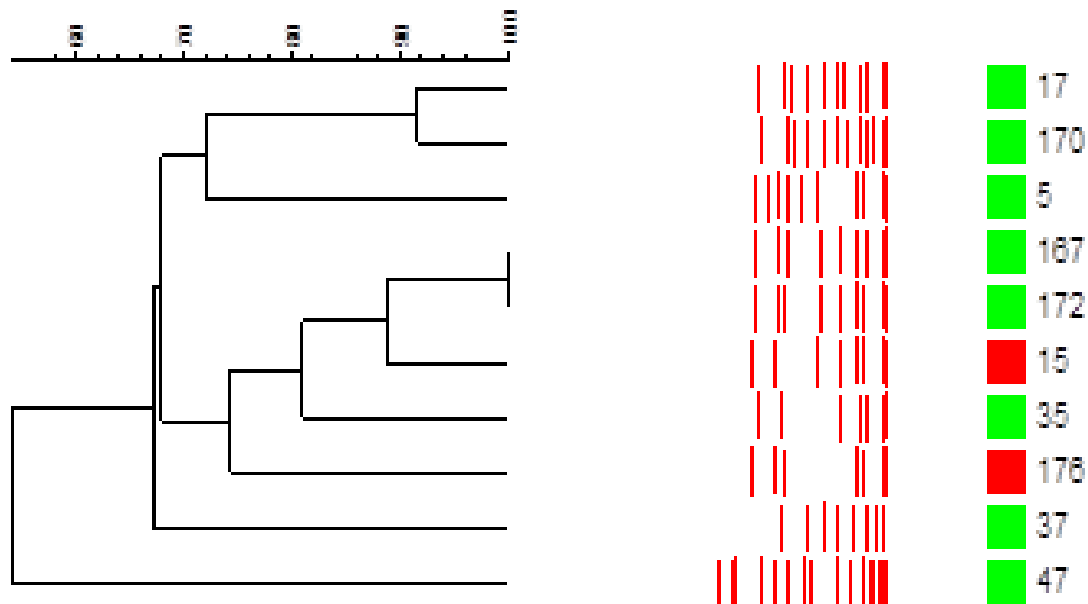


Figura 6 - Dendrograma construído a partir da análise dos produtos amplificados por REP-PCR dos 10 isolados dos períodos de 2005 e 2007, do hospital Universitário de Londrina. Os isolados (17, 170, 5, 167, 172, 35, 37 e 47 são isolados provenientes de infecção). Os isolados 15 e 176 provenientes de pacientes colonizados.

Tipagem dos isolados utilizando a metodologia de MLST

Foram analisados fragmentos internos de 7 genes *housekeeping*. Os produtos de amplificação dos genes analisados: *adk* (adenilato quinase), *atpA* (ATP sintase, subunidade), *ddl* (D-alanina: D-alanina ligase), *gyd* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *gdh* (glicose 6- fosfato desidrogenase), *purK* (subunidade atpase phosphoribosylaminoimidazol carboxilase), *pstS* (fosfato de transportador cassete de ligação ATP), podem ser observados na Figura 7.

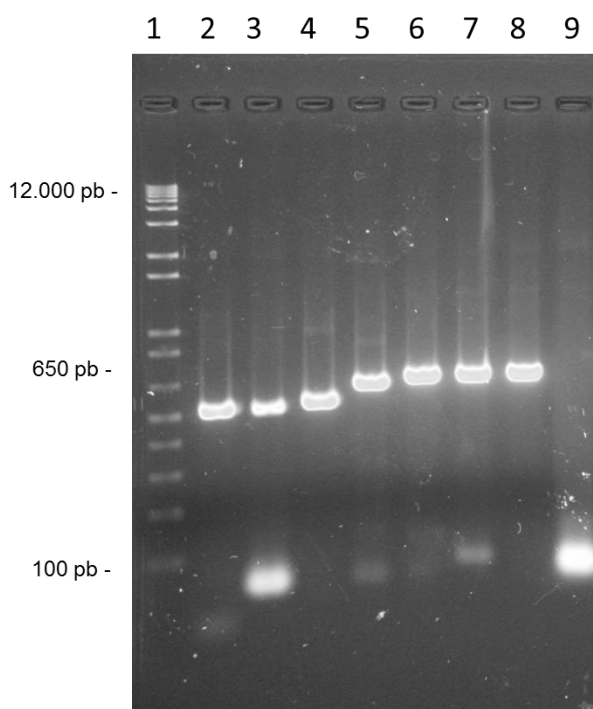


Figura 7: Amplificação dos fragmentos internos de 7 genes *housekeeping*. Canaleta 1: 1kb-plus (Invitrogen®); Canaleta 2: genes *adk* (437 pb); Canaleta 3: *gyd* (395 pb); Canaleta 4: *ddl* (465 pb), Canaleta 5 : *pstS* (583 pb), Canaleta 6: *gdh* (530 pb), Canaleta 7 : *atpA* (556 pb), Canaleta 8: *purK* (492 pb), Canaleta 9: branco.

A identidade das sequências nucleotídicas dos genes foi confirmada utilizando-se o algoritmo Blast (Altschul *et al*, 1997) da página do “National Center for Biotechnology Information – NCBI” vinculado ao “National Institute of Health – NIH” (www.ncbi.nlm.nih.org). Na Figura 8 pode ser observada a árvore filogenética concatenada de todos os genes.

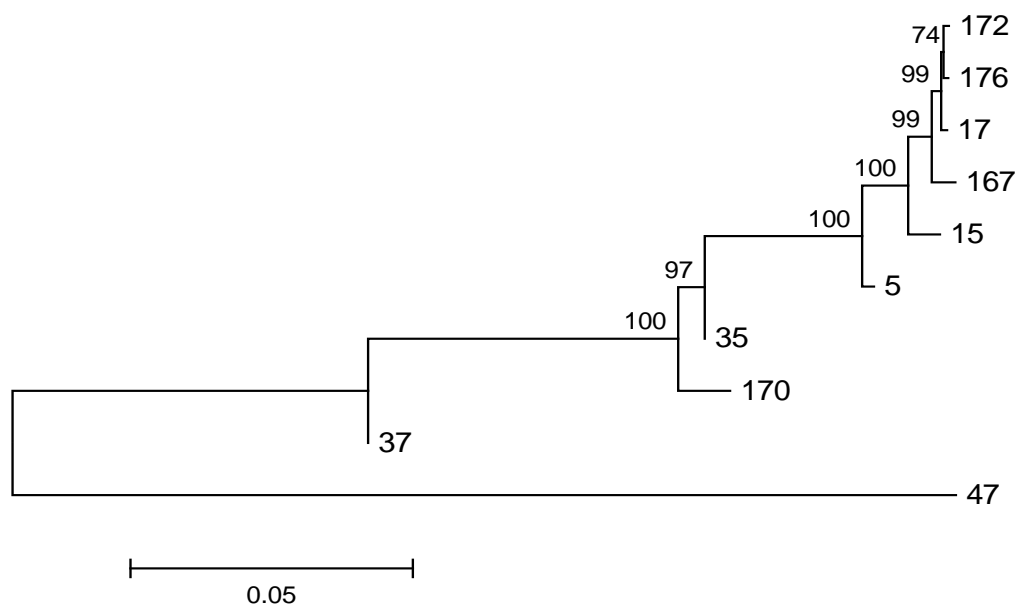


Figura 8 : Árvore filogenética concatenada dos 7 genes *housekeeping*, dos 10 isolados, 2005 e 2007.

Para a análise dos perfis alélicos foi realizada a análise computacional dos dados do MLST, utilizando o BioEdit software. O programa MEGA foi utilizado para calcular números médios das diferenças nucleotídicas entre as sequências. Diferentes sequências de determinado *locus* receberam números de alelos, e a cada combinação única de alelos (perfil alélico) (Tabela 7) representação dos 10 isolados (07 genes *housekeeping*) e seus respectivos genes. Cada gene recebeu um número de alelo, analisado no banco de dados mlst.net. foram atribuídos um tipo de sequência (ST) (Tabela 8). O ST 412 foi observado em 50% dos isolados. Os demais foram classificados e cinco STs diferentes (ST-203, ST-596, ST-658, ST-730, ST-742).

Tabela 7: Alelo (ST) de cada gene analisado pelo banco de dados mlst.net

Isolados	<i>atpa</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purk</i>	<i>gyd</i>	<i>psts</i>	<i>adk</i>
17	15	1	1	44	1	20	1
170	15	1	21	44	16	20	1
5	5	1	1	44	14	20	1
167	15	1	1	44	1	20	1
172	15	1	1	44	1	20	1
15	15	1	1	44	1	20	1
35	15	1	1	44	16	20	18
176	15	1	1	44	1	20	1
37	15	1	22	44	16	20	18
47	15	1	19	44	14	20	18

Tabela 8: Alelo (ST) de cada gene analisado pelo banco de dados mlst.net, associado aos fatores de virulência *esp* e *hyl* dos 10 isolados.

Isolado	<i>esp</i>	<i>hyl</i>	ST
17	+	-	412
170	+	-	658
5	+	-	730
167	+	-	412
172	+	-	412
15	+	-	412
35	+	-	203
176	+	-	412
37	+	-	742
47	+	-	596

DISCUSSÃO

As principais espécies causadoras de infecção enterocócica no homem são *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, representando cerca de 90% dos enterococos isolados na clínica (MAZAHARI et al., 2010).

No presente estudo oito isolados foram obtidos de pacientes hospitalizados infectados sendo provenientes de urina, sangue, secreção de bolsa escrotal, e dois isolados de pacientes colonizados (*swab* retal e urina). Todos isolados foram obtidos na unidade de terapia intensiva (UTI) como cultura de vigilância da Comissão de Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde do Hospital Universitário de Londrina. Essa unidade de tratamento é considerada o local de maior contaminação por VRE, e podendo ser foco de contaminação de pacientes que não eram colonizados. Krochmal e colaboradores (2011) e Shraifi e colaboradores (2012) em seus estudos detectaram predominantemente VRE em UTIs, correspondendo a 36% e 33% dos isolados de VRE identificados nos hospitais.

Os 10 isolados apresentaram crescimento em NaCl 6,5%, hidrólise da esculina e crescimento de colônias pequenas em ágar VREvcc, característico de *Enterococcus* spp. A identidade de *Enterococcus faecium* foi confirmada molecularmente por PCR do gene que codifica D-alanina-D-alanina ligase (*ddl*). Estes isolados apresentaram MICs de vancomicina com valores > 256 µg/ml, e aliado a resistência a teicoplanina detectada em estudo prévio (Ruzon et al., 2010), corroboram o genótipo de resistência *vanA* esses resultados são semelhantes aos obtidos por Araújo e colaboradores (2011) e Valdezate e colaboradores (2012) e com outros isolados de VRE de hospitais brasileiros (Camargo et al., 2006; da Silva et al., 2012). Além disso, resistência a eritromicina também foi detectado para todos isolados e o mecanismo de resistência é mediado por *ermB*, que parece ser mais amplamente difundido entre os isolados de *E. faecium* (Vankerckhoven et al., 2008; QU et al., 2012).

No presente estudo, somente o gene *asa1* foi detectado no genoma de quatro isolados de *Enterococcus faecium*. O gene *esp*, está envolvido na adesão inicial e formação de biofilmes em *E. faecium* (CAMARGO et al., 2006; CHANG et al., 2010) enquanto que o gene *asa1*, tem sido associado com a adesão de *E. faecium* (VANWAMEL et al., 2007; WERNER et al., 2008). O gene *hyl* e *acm* não foram detectados em nenhum isolado e resultado similar foi obtido por outros autores

(BILLSSTROM et al, 2008; PALAZZO et al, 2011). Um importante aspecto dos enterococcus é o fato de vários genes de virulência e genes de resistência estarem localizados em elementos genéticos móveis, podendo ser transferidos para outros microorganismos (MAZAHARI et al., 2010).

Segundo Hong–tao e colaboradores (2011), a análise de 32 VRE, indicou que 17 isolados apresentaram o gene *hyl*. Kwon e colaboradores (2012) relataram a presença do gene *esp* e *hyl* em todos os isolados estudados. Valdezate e colaboradores (2012) também detectaram a presença dos genes *esp* e *hyl* em *Enterococcus faecium*. Juntos, esses resultados indicam grande diversidade genética no potencial de virulência encontrado em diferentes isolados de VREfm ao redor do mundo.

Adesão e a formação de biofilme são ambos considerados importantes propriedades de enterococos que contribuem para a patogênese das infecções. A relevância de biofilmes em infecções enterocócicas foi recentemente mostrada no estudo de Necidova et al., (2009).

Os 10 isolados analisados no presente estudo apresentaram o seguinte perfil em relação a produção de biofilme: 04 amostras não foram formadoras de biofilme, 01 moderadamente formadora, 01 fracamente formadora, 04 fortemente formadora. Aparentemente, não há uma correlação entre presença do gene *esp* e formação de biofilme nestes isolados, indicando que este processo parece não depender exclusivamente da presença desse gene. No estudo realizado por Tsikrikonis e colaboradores (2012), os isolados mostraram uma alta produção de biofilme, e em 83,3% dos isolados o gene *esp* estava presente. Suzuki e colaboradores (2011) por outro lado observaram que isolados de *Enterococcus faecium* foram capazes de formar biofilme, entretanto em menos extensão (fracamente formadores).

A diversidade genética dos isolados foi avaliada por três: REP-PCR, PFGE e amplificação dos fragmentos internos de 7 genes *housekeeping* para realizar análise por MLST. Em geral, apesar de algumas incongruências foi possível observar uma correlação entre essas metodologias. A análise por MLST revelou o predomínio do tipo ST-412 entre os isolados de VREfm, que por sua vez pertence ao CC17, . Panesso et al. (2010) mostraram que ST412 também foi a mais frequente entre VREs isolados em quatro países da América do Sul. Este estudo confirma que VREfm isolado nos últimos anos no Brasil pertencem a CC17 e têm determinantes genéticos, como genes de virulência e de resistência antimicrobiana, que contribuem com a adaptação de *E. faecium* em ambiente hospitalar. O ST-658 foi observado em apenas um isolado e não

pertence ao CC17. Por outro lado, da Silva et al. (2012) mostraram que ST-658 foi o mais frequente entre VREs isolados em outro hospital brasileiro. Um isolado foi classificado como ST-203, esse ST foi relatado por (PANESSO et al., 2010., FREITAS et al., 2010). . Um isolado foi classificado como ST-596 e também não pertence a CC17, e também foi descrito por (WENG et al., 2012). Os STs 730 e 742 também foram descritos neste trabalho.

Em conclusão, o complexo clonal CC17 foi detectado no Hospital Universitário de Londrina o que já foi relatado em outros hospitais do Brasil (CAMARGO et al., 2006; PALAZZO et al., 2011). Assim, é importante ressaltar que os sistemas de controle de infecções relacionadas a serviços de saúde devem ser capazes de identificar esse microrganismo para que medidas adequadas de controle sejam implantadas.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

AL-AHDAL, M. N.; ABOZAIID, S. M.; AL-SHAMMARY, H. F.; BOHOL, M. F.; AL-THAWADI, S. I.; AL-JABERI, A. A.; SENOK, A. C.; SHIBL, A. M.; AL-QAHTANI, A. A. Characterization of *Enterococcus faecium* isolates and first report of *vanB* phenotype–*vanA* genotype incongruence in the Middle East. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 11, p. 3223-3229, nov. 2012.

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, sept. 1997.

ARÁUJO, C.; TORRES, C.; GONÇALVES, A.; CARNEIRO, C.; LÓPEZ, M.; RADHOUANI, H.; PARDAL, M.; IGREJAS, G.; POETA, P. Genetic Detection and Multilocus Sequence Typing of *vanA*-Containing *Enterococcus* Strains from Mullet Fish (*Liza ramada*). **Microbial Drug Resistance**, v. 17, n. 3, 2011.

AITCHISON, E. J.; LAMBERT, P. A.; SMITH, E. G.; FARRELL, I. D. Serodiagnosis of *Streptococcus faecalis* endocarditis by immunoblotting of surface protein antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 211-215, feb. 1987.

ARCHIMBAUD, C., N. SHANKAR, C. FORESTIER, A. BAGHDAYAN, M.S. GILMORE, F.. 2002. *In vitro* adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. **Res. Microbiol.** 153, 75-80, 2002.

BORGES, S.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P. Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at different pHs. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 3, p. 677-682, 2012.

BOURDON, N.; FINES-GUYON, M.; THIOLET, J.; MAUGAT, S.; COIGNARD, B.; LECLERCQ, R.; CATTOIR, V. Changing trends in vancomycin-resistant enterococci in French hospitals, 2001–08. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 713-721, 28 jan. 2011.

BILLSTROM, H.; LUND, B.; SULLIVANA A. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. **International Journal of Antimicrobial Agents** , v. 32, p. 374–377, 28 abril. 2008.

CHANG, C.,M., WANG L.R.,LEE, H.C.. 2010. Characterization of vancomycin-resistant enterococci from hospitalized patients at a tertiary centre over a seven-year period. **J. Hosp. Infect.** v. 10, p.1016, jun. 2010.

CAIAFFA FILHO, H. H. Molecular characterization of van genes found in vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. Isolated from hospital das clínicas, FMUSP, São Paulo, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v.7, n.3, p.173-174, june 2003.

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, n. 11, p. 1123-1130, nov. 2006.

CEREDA, R.F. *Enterococcus faecalis* resistant to vancomycin and teicoplanin (VanA phenotype) isolated from a bone marrow transplanted patient in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v.5, n.1,p.40-46, 2001.

COSTA, L.M.D. Vancomycin – Resistant *Enterococcus faecium*: First casa in Brazil. **The Brasilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v.2, n.3,p .160 – 13, 1998.

FREITAS, A. R.; TEDIM, A. P.; NOVAIS, C.; RUIZ-GARBAJOSA, P.; WERNER, G.; LAVERDE-GOMEZ, J. A.; CANTÓN, R.; PEIXE, L.; BAQUERO, F.; COQUE, T. M. Global Spread of the *hyl_{Efm}* Colonization-Virulence Gene in Megaplasms of the *Enterococcus faecium* CC17 Polyclonal Subcluster. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2660-2665, jun. 2010.

GALLOWAY-PENÃ, J. R.; NALLAPAREDDY , S. R.; ARIAS, S. A.; ELIOPOULOS, G. M.; MURRAY, B. E. Analysis of Clonality and Antibiotic Resistance among Early Clinical Isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 10, p. 1566-1573, 15 nov. 2009.

GHOLIZADEH, Y.; PREVOST, M.; BAMBEKE, F, V.; 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, abr. 2001.

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

HIDRON, A. I.; EDWARDS, 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 reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 11, p. 996-1011, nov. 2008.

KLIBI, N.; SLIMEN, N. B.; FHOULA, I.; LÓPEZ, M.; SLAMA, K. B.; DAFFONCHIO, D.; BOUDABOUS, A.; TORRES, C.; OUZARI, H. Genotypic diversity, antibiotic resistance and bacteriocin production of enterococci isolated from rhizospheres. **Microbes and Environments**, v. 27, n. 4, p.533-537, dec. 2012.

KROCHMAL, P. D.; BALLARD, S. A.; GRABSCH, E. A.; STINEAR, T. P.; SEEMANN, T.; YOUNG, H. L.; GRAYSON, M. L.; HOWD, B. P. A sustained hospital outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia due to emergence of *vanB E. faecium* sequence type 203. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 8, p. 1278-1286, oct. 2011.

KWON, K. H.; MOON, B. Y.; HWANG, S. Y.; PARK, Y. H. Detection of CC17 *Enterococcus faecium* in dogs and a comparison with human isolates. **Zoonoses and Public Health**, v. 59, n. 6, p. 375-378, sep. 2012.

MAZAHERI, D. et al. Activity of daptomycin against Gram-positive bacterial isolates from Indian medical centres (2006–2007). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 5, p. 497-499, nov. 2010.

MCBRIDE, S. M.; FISCHETTI, V. A.; LEBLANC, D. J.; MOELLERING, R. C. JR.; GILMORE, M. S. Genetic Diversity among *Enterococcus faecalis*. **PLoS ONE**, v. 2, n. 7, 2007.

NALLAPAREDDY, S. R.; SINGH, K. V.; 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. 1733-1744, 2003.

NECIDOVÁ¹, L.; JANŠTOVÁ, B.; KARPÍŠKOVÁ², S.; CUPÁKOVÁ, Š.; DUŠKOVÁ, M.; KARPÍŠKOVÁ, R. Importance of *Enterococcus spp.* for Forming a Biofilm. **Journal of Food Science**, v. 27, n. 2, p. S354-S356, 2009.

NILSSON, O. Vancomycin resistant enterococci in farm animals – occurrence and importance. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 2, april. 2012.

PALAZZO, I. C.; PITONDO-SILVA, A.; LEVY, C. E.; DA COSTA DARINI, A. L. Changes in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing outbreaks in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, v. 79, n. 1, p. 70-74, sep. 2011.

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

QU, TT.; YANG, Q.; SHEN, P.; WEI, ZQ.; YU, YS. Novel vancomycin-resistance transposon, plasmid replicon types, and virulence factors of vancomycin-resistant Enterococci in Zhejiang, China. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, n. 2, p. 183-188, apr. 2012.

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

RUZON, F. I.; DE PAULA, S. B.; KANOSHIKI, R. L.; PEREIRA-SANTOS, J.; KERBAUY, G.; KOBAYASHI, R. K.; YAMAUCHI, L. M.; PERUGINI, M. R.; YAMADA-OGATTA, S. F. Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* *vanA* isolated from different sources at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 814-821, dec. 2010.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. **Biotechnology (Reading, Mass.)**, v. 24, p. 104-108, 1992.

SGHIR, A.; GRAMET, G.; SUAUA, 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, n. 5, p. 2263-2266, may. 2000.

SHARIFI, Y.; HASANI, A.; GHOTASLOU, R.; VARSHOCHI, M.; HASANI, A.; AGHAZADEH, M.; MILANI, M. Survey of Virulence Determinants among Vancomycin Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Clinical Specimens of Hospitalized Patients of North west of Iran. **The Open Microbiology Journal**, v. 6, p. 34-39, 2012.

SILVA, L. P.; PITONDO-SILVA, A.; MARTINEZ, R.; DARANI, A. L. Genetic features and molecular epidemiology of *Enterococcus faecium* isolated in two university hospitals in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 74, n. 3, p. 267-271, nov. 2012.

SMITH, R. F.; WILLET, N. P. Rapid plate method for screening hyaluronidase and chondroitin sulfatase-producing microorganisms. **Applied Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 1434-1436, sept. 1968.

SNEATH, P. H., SOKAL, R. R. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. **San Francisco: W. H. Freeman**, p. 573, 1973.

SUZUKI, N.; YONEDA, M.; HATANO, Y.; IWAMOTO, T.; MASUO, Y.; HIROFUJI, T. *Enterococcus faecium* WB2000 Inhibits Biofilm Formation by Oral Cariogenic Streptococci. **International Journal of Dentistry**, v. 2011, p. 1-5, oct. 2011.

THIERFELDER, C.; KELLER, P. M.; KOCHER, C.; GAUDENZ, R.; HOMBACH, M.; BLOEMBERG, G. V.; RUEF, C. A multiple-strain outbreak of eight weeks duration at a Swiss tertiary care hospital. **The European Journal of Medical Sciences**, may. 2012.

TSIKRIKONIS, G.; MANIATIS, A. N.; LABROU, M.; NTOKOU, E.; MICHAIL, G.; DAPONTE, A.; STATHOPOULOS, C.; TSAKRIS, A.; POURNARAS, S. Differences in biofilm formation and virulence factors between clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin. **Microbial Pathogenesis**, v. 52, n. 6, p. 336-343, jun.2012.

VALDEZATE, S.; MIRANDA, C.; NAVARRO, A.; FREITAS, A. R.; CABRERA, J. J.; CARRASCO, G.; COQUE, T. M.; JIMÉNEZ-ROMANO, E.; SAÉZ-NIETO, J. A. Clonal outbreak of ST17 multidrug-resistant *Enterococcus faecium* harbouring an Inc18-like: Tn1546 plasmid in a haemo-oncology ward of a Spanish hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 832-836, apr. 2012.

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, n. 14, p. 4247-4255, jul. 2008.

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**, v. 75, n. 2, p. 924-931, feb. 2007.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, nov. 1991.

WENG, P. L. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of multi locus sequence type 18 in Malaysia. **Medical Journal of Malaysia**, v. 67, n. 6, p. 639-640, dec. 2012.

WERNER, G. et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. **Euro surveillance**, v. 13, n. 47, nov. 2008.

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, n. 6, p. 821-828, jun. 2005.

WOODFORD, N.; LIVERMORE, D. M. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. **Journal of Infection**, v. 59, p. s4-s16, sep. 2009.

7 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que o perfil de sensibilidade antimicrobiana demonstrou que todos os isolados mostraram-se resistentes à vancomicina, teicoplanina, ampicilina, eritromicina e ciprofloxacina.

A resistência à vancomicina foi comum para todos os isolados e eles apresentaram o gene *vanA*. O genótipo de resistência a eritromicina mediado por *ermB* foi detectado nos isolados.

A presença dos fatores de virulência *asa1*, *cyla*, *efaA*, *esp*, *gelE* foram detectadas nos isolados de *Enterococcus faecium*, o gene *asa1* estava presente em quatro isolados, enquanto que os genes *acm* e *hyl* não foram detectados nos isolados. A atividade de hialuronidase em meio contendo hialuronato de sódio não foi observada para nenhum isolado.

A alta diversidade genética foi observada entre os isolados pela metodologia de REP-PCR. A análise por MLST mostrou que os isolados agruparam em 6 STs distintos (ST-203, 14 ST-412, ST-596, ST-658, ST-730, ST-742). ST-412 foi o mais frequente entre os VREs e pertence ao complexo clonal 17 (CC17). A presença desse complexo corrobora a importância de medidas para identificação e controle desse microrganismo em serviços relacionados à assistência à saúde.