



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FLÁVIA IMANISHI RUZON

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE
FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Enterococcus faecium* DE
ORIGEM HOSPITALAR**

Londrina
2009

FLÁVIA IMANISHI RUZON

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE
FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Enterococcus faecium* DE
ORIGEM HOSPITALAR**

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

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta

Co-orientadora: Profa. Dra. Marcia Regina Eches Perugini

Londrina
2009

FLÁVIA IMANISHI RUZON

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE
FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Enterococcus faecium* DE
ORIGEM HOSPITALAR**

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

BANCA EXAMINADORA

Sueli Fumie Yamada Ogatta

Maria Cristina Bronharo Tognim

Renata Katsuko Takayama Kobayashi

Londrina, 19 de fevereiro de 2009.

“Ninguém é tão grande que não possa aprender, nem tão pequeno que não possa ensinar.”

(Autor desconhecido)

Aos meus pais, Cláudio e Vera Lúcia, e ao meu irmão, Fabrício.

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem tudo devemos;

À minha família, pela paciência, apoio e compreensão;

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

À Profa. Dra. Marcia Regina Eches Perugini, pela co-orientação, incentivo e amizade;

À Profa. Dra. Renata Katsuko Takayama Kobayashi pela contribuição e incentivo;

Às colegas do laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos Suelen e Renata, pelo apoio técnico, incentivo e amizade;

Aos funcionários do laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos Ediel e Jussevania, pelo apoio e convívio harmonioso;

Ao pessoal do laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, pelo apoio e incentivo;

Ao pessoal do Interlaboratório, pela colaboração;

Aos colegas do laboratório da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do Hospital Universitário (HU) de Londrina Adriana, Carolina, Sandra e Vitor, pelo auxílio;

Aos funcionários do laboratório da CCIH do HU de Londrina Fábio e Claudinéia, pela colaboração e incentivo;

Aos funcionários do HU de Londrina, pela colaboração;

Aos coordenadores do curso e aos professores, pela determinação e sabedoria;

Aos colegas de turma, pelo incentivo e colaboração;

A todos que colaboraram para a conclusão deste trabalho.

RUZON, Flávia I. **Caracterização fenotípica e molecular de fatores de virulência de *Enterococcus faecium* de origem hospitalar.** 2009. 65f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

Enterococos são cocos Gram-positivos comumente encontrados no trato gastrointestinal de humanos e animais bem como no solo, água e alimentos. Entretanto, eles estão atualmente entre as maiores causas de infecções hospitalares. Enterococo resistente a vancomicina (ERV) foi primeiramente identificado no final da década de 1980 em alguns países europeus. Os genes que codificam os seis tipos de resistência adquirida a vancomicina são tipicamente associados com elementos genéticos móveis. Muitos fatores de virulência foram descritos em enterococos, mas pouco se conhece a respeito da virulência de *Enterococcus faecium*. No presente estudo, quarenta isolados de *E. faecium* resistente a vancomicina (EFRV) obtidos de diferentes fontes no Hospital Universitário de Londrina, Paraná foram pesquisados quanto aos fatores de virulência putativos codificados pelos genes *cylA*, *efaA*, *gelE* e *esp* e seus genótipos de resistência. Esses isolados foram obtidos de pacientes hospitalizados (18 colonizantes e 12 pacientes com infecção enterocócica) e do respectivo ambiente vicinal (n=10). A resistência a vancomicina foi comum para todos os isolados e eles apresentaram o gene *vanA*. O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi analisado por método de microdiluição automatizado. A ocorrência de uma alta frequência de resistência múltipla aos antimicrobianos foi detectada entre esses isolados e esse fenótipo foi independente da origem dos mesmos. Os fatores de virulência foram investigados por métodos moleculares e fenotípicos. A prevalência dos genes de virulência foi a seguinte: *esp* (87,5%), *efaA* (82,5%), *gelE* (70%) e *cylA* (65%). Todos os isolados apresentaram pelo menos um marcador putativo de virulência e a presença de quatro genes foi observada em 32,5% dos isolados. Somente a presença do gene *gelE* foi significativamente mais alta em colonizantes e isolados de infecção em comparação aos isolados de ambiente. Além disso, a presença do gene *efaA* mostrou associação com a presença do gene *esp*, independente da origem dos isolados. Foi observada uma associação positiva entre a presença do gene *cylA* e atividade hemolítica no ensaio em agar-sangue de carneiro. Contrariamente, nenhuma associação foi encontrada tanto para o gene *gelE* e a produção de gelatinase no ensaio em placa como para o gene *esp* e a formação de biofilme em superfície de poliestireno. Esses resultados mostraram a potencial virulência de *E. faecium* hospitalar multirresistente isolado de diferentes fontes e o conhecimento acerca do seu papel na patogênese pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de combate a infecções enterocócicas.

Palavras-chave: *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (EFRV). Infecções hospitalares. Fatores de virulência.

RUZON, Flávia I. **Phenotypic and molecular characterization of nosocomial *Enterococcus faecium* virulence factors.** 2009. 65f. Dissertation (Master's degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

Enterococci are Gram-positive cocci commonly found in the gastrointestinal tract of humans and animals as well as in soil, water and food. However, they are now among the leading causes of nosocomial infections. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) were first identified in the late 1980s in a few European countries. The genes that encode the six types of acquired vancomycin resistance are typically associated with mobile genetic elements. Several virulence factors were described for enterococci, but little is known about the virulence of *Enterococcus faecium*. In the present study, forty *E. faecium* vancomycin-resistant (VREF) isolated from different sources at the University Hospital of Londrina, Paraná were examined for the putative virulence factors encoded by *cylA*, *efaA*, *gelE* and *esp* genes and their resistance genotype. These isolates were recovered from hospitalized patients (18 colonizers and 12 enterococci-infected patients) and their environment vicinity ($n = 10$). Resistance to vancomycin was common to all isolates and they harbored the *vanA* gene. Antimicrobial susceptibility profile was analyzed by automated microdilution method. The occurrence of a high frequency of multiple antimicrobial-resistance was detected among these isolates and this phenotype was independent of the origin from they were recovered. The virulence factors were investigated by molecular and phenotypic methods. The prevalence of the virulence genes was as follows: *esp* (87.5%), *efaA* (82.5%), *gelE* (70%) and *cylA* (65%). All isolates harbored at least one putative virulence marker and the presence of four genes was observed in 32.5% isolates. Only the presence of *gelE* gene was significantly higher in colonizers and infection-isolates compared to environmental isolates. In addition, the presence of *efaA* gene was associated with the presence of the *esp* gene, independent of the origins of the isolates. A positive association between the presence of *cylA* gene and hemolytic activity on sheep blood agar assay was observed. In contrast, no association was found either for *gelE* gene and gelatinase production on agar plate assay or for *esp* gene and biofilm formation on polystyrene surface. These results showed the potential virulence of nosocomial multiple-resistant *E. faecium* isolated from different sources and the knowledge about the role of them on its pathogenesis can contribute to develop new strategies for enterococci infection combat.

Keywords: *Enterococcus faecium* vancomycin-resistant (VREF). Nosocomial infections. Virulence factors.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de técnicas moleculares descritas para identificação de <i>Enterococcus</i> spp	11
Tabela 2 – Características de resistência aos agentes antimicrobianos em espécies de <i>Enterococcus</i>	15

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Biossíntese do peptidoglicano e mecanismo de ação da vancomicina.....	13
Figura 2 – Resistência aos glicopeptídeos do tipo VanA	17

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	10
1.2 RESISTÊNCIA A VANCOMICINA.....	13
1.3 EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR ERV.....	17
1.4 DETERMINANTES DE VIRULÊNCIA.....	19
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
4 TRABALHO CIENTÍFICO	38
5 CONCLUSÕES	65

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

Espécies do gênero *Enterococcus* são cocos Gram-positivos (isolados, aos pares ou em cadeias curtas), anaeróbicos facultativos, catalase-negativa que foram inicialmente incluídos no gênero *Streptococcus* (FACKLAM; COLLINS, 1989; MURRAY, 1990). Caracterizam-se por crescer em pH 9,6, em meio líquido suplementado com NaCl 6,5% e por sobreviver a 60°C por 30 minutos (Sherman, 1937). Sua temperatura ótima de crescimento é 35°C, mas pode variar de 10 a 45°C (Facklam; Collins, 1989). São capazes de hidrolisar a esculina na presença de bile. Diferenciam-se de outras bactérias Gram-positivas pela atividade da pirrolidonilarilamidase (PYR), reação positiva com o antígeno do grupo D de Lancefield e reação negativa com o antígeno do grupo A de Lancefield (MURRAY, 1990).

Nos anos 80, com base em diferenças genéticas, os enterococos foram realocados em seu próprio gênero, *Enterococcus* (SCHLEIFER; KLIPPER-BALZ, 1984). As designações prévias de espécie, tais como *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, foram mantidas, porém precedidas agora pelo gênero *Enterococcus*. *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, que se diferenciam dos outros enterococos pela capacidade de produzir ácido a partir de melibiose e L-arabinose (MURRAY, 1990), são as espécies responsáveis pela maioria das infecções em humanos. *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus raffinosus*, são isolados clínicos bem menos frequentes (LEWIS; ZERVOS, 1990; RUOFF *et al.*, 1990; GORDON *et al.*, 1992; MOELLERING, 1992; PATTERSON, 1995).

Vários sistemas comerciais de identificação e diferenciação de espécies de enterococos baseados na combinação de técnicas fenotípicas foram desenvolvidos. Entretanto, esses métodos são trabalhosos e requerem longo período de tempo, pois necessitam de isolamento do microrganismo. Assim, a necessidade da utilização de testes com maior sensibilidade e especificidade tornou-se urgente (LIU, 2005), o que tem levado à busca por alternativas baseadas em

métodos moleculares [Tabela 1 (KOSTMAN *et al.*, 1995; OLIVE; BEAN, 1999)]. Além da identificação, métodos moleculares também são essenciais para estudos epidemiológicos de *Enterococcus* spp. e de sua resistência, bem como para detecção de surtos em hospitais (TOP; WILLEMS; BONTEN, 2008).

Tabela 1 – Exemplos de técnicas moleculares descritas para identificação de *Enterococcus* spp.

TÉCNICA	DESCRIÇÃO	REFERÊNCIA
PCR	Amplificação de um fragmento interno do gene que codifica para D-Alanina-D-Alanina ligase	Dutka-Malen <i>et al.</i> , 1995
	Amplificação de uma região específica de <i>E. faecium</i> (pEM1225, depositada no Genbank nº de acesso L78127)	Cheng <i>et al.</i> , 1997
	Amplificação da região espaçadora (ITS) do operon do rDNA, seguida de digestão enzimática com a endonuclease de restrição <i>Sau3A</i>	Tyrrell <i>et al.</i> , 1997
	Amplificação da região conservada do gene <i>tuf</i>	Ke, <i>et al.</i> , 1999
	RFLP: amplificação de <i>groESL</i> e digestão com as endonucleases de restrição <i>Hae</i> III e <i>Rsa</i> I	Teng <i>et al.</i> , 2001
	Reação de amplificação de um provável regulador transcricional específico de <i>E. faecalis</i>	Liu, <i>et al.</i> , 2005
	Identificação de <i>E. hirae</i> e <i>E. durans</i> utilizando os genes <i>copY</i> , <i>murG</i> e <i>mur-2</i>	Arias <i>et al.</i> , 2006
Microarray	Hibridação utilizando ECC-PhyloChip que contém seqüências do rDNA 16S e rDNA 23S e DNA genômico das amostras	Lehner <i>et al.</i> , 2005
Seqüenciamento	Amplificação e seqüenciamento do gene <i>groESL</i> e região espaçadora	Tsai <i>et al.</i> , 2005
	MLSA: Avaliação de <i>rpoA</i> e <i>pheS</i> na identificação de espécies de enterococos	Naser <i>et al.</i> , 2005
Multiplex-PCR	Combinação de iniciadores, gênero-específico (complementar à região do rDNA 16S) e espécie-específico (complementar ao gene <i>sodA</i>)	Jackson <i>et al.</i> , 2004

PCR: *polymerase chain reaction*; rDNA: gene que codifica para RNA ribossomal; *tuf*: fator de alongação TU; *copY*: proteína repressora do operon que codifica proteína transportadora de cobre; *mur*: muramidase; RFLP: *restriction fragment length polymorphism*; S: Svedberg; *groESL*: *heat shock protein* de 10 kDa e 60 kDa; *rpoA*: subunidade alfa da RNA polimerase; *pheS*: fenil-alanil-tRNA sintase; MLSA: *multilocus sequence analysis*; *sodA*: superóxido dismutase

Os enterococos fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal e genital feminino de humanos e de vários mamíferos e pássaros. São encontrados também no solo, água e alimentos (SGHIR *et al.*, 2000; AARESTRUP *et al.*, 2002; TANNOCK; COOK, 2002). Contudo, dados indicam que esses microrganismos estão entre as maiores causas de infecções hospitalares (TANNOCK; COOK, 2002), entre as quais, endocardite, infecções de feridas e do trato urinário. Os principais fatores de risco são idade avançada, hospitalização, presença de cateter permanente, terapia antimicrobiana múltipla e imunossupressão (MURRAY; WEINSTOCK, 1999; BONTEN *et al.*, 2001). De todas as espécies de enterococo, *E. faecalis* é o agente etiológico da maioria das infecções em humanos (IWEN *et al.*, 1997). Entretanto, durante a década passada, a incidência de bacteremias causadas por *E. faecium* aumentou, o que tem sido relacionado à emergência de resistência aos antimicrobianos nessa espécie (IWEN *et al.*, 1997; MURDOCH *et al.*, 2002; WILLEMS; BONTEN, 2007).

Infecções enterocócicas graves, como bacteremia e endocardite, requerem tratamento com uma combinação de dois agentes antimicrobianos, um que interfira com a síntese da parede celular [ampicilina, penicilina G ou vancomicina (Figura 1)] e outro que atue na síntese protéica (gentamicina ou estreptomicina). O sinergismo somente é possível quando o microrganismo é sensível a ambas as classes de antimicrobianos envolvidas (ROSSI; ANDREAZZI, 2005). Com a parede celular danificada, o aminoglicosídeo pode penetrar na célula mais facilmente (HERMAN; GERDING, 1991). A vancomicina combinada com um aminoglicosídeo mostrou sinergismo contra o enterococo tanto *in vitro* como *in vivo* (WESTENFELDER *et al.*, 1973) e é recomendada como escolha para pacientes com alergia a penicilina ou no tratamento de cepas resistentes a ampicilina e a penicilina (HERMAN; GERDING, 1991). No caso de infecções graves não-complicadas, ampicilina ou amoxicilina são suficientes para uma terapia efetiva (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

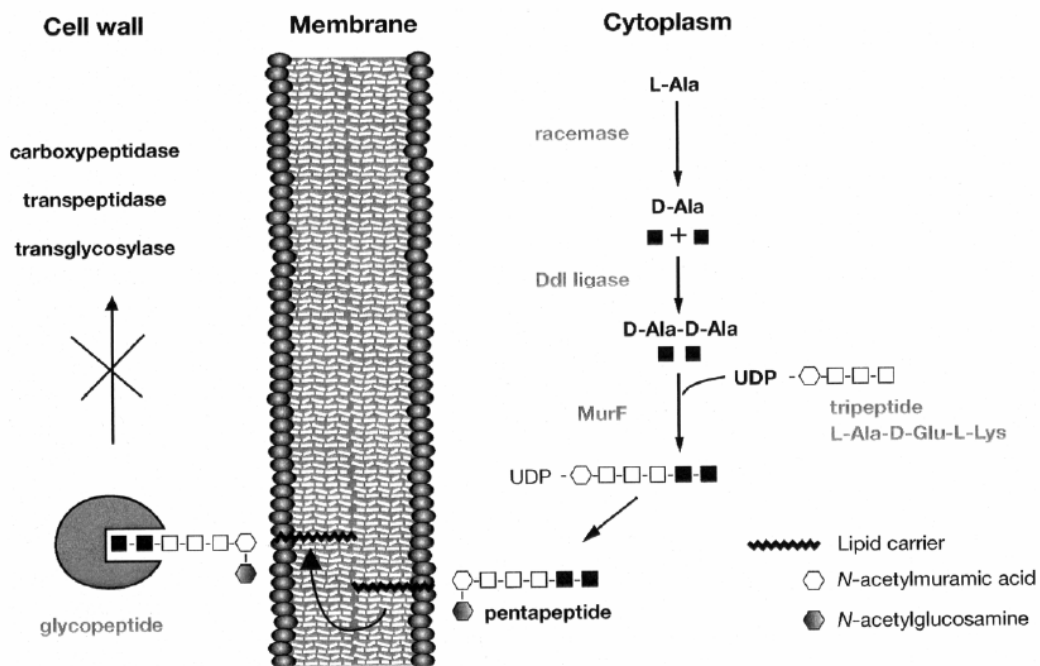


Figura 1 – Biossíntese do peptidoglicano e mecanismo de ação da vancomicina. Ligação do antimicrobiano ao dipeptídeo D-Ala-D-Ala C-terminal de precursores do peptidoglicano impede reações catalisadas por transglicosilases, transpeptidases e D,D-carboxipeptidases. Ddl: D-Ala-D-Ala ligase; MurF: proteína sintetase; UDP: uracil difosfato. Adaptado de Courvalin (2006). Os β -lactâmicos inibem o crescimento do peptidoglicano, interferindo com a função de várias enzimas que participam da sua síntese final (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

1.2 RESISTÊNCIA A VANCOMICINA

A resistência aos agentes antimicrobianos, destacando-se penicilina/ampicilina, aminoglicosídeos (resistência de alto nível) e glicopeptídeos, é relatada em um número cada vez maior de isolados de *Enterococcus spp.*. Assim, as alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções com enterococos multirresistentes e resistentes a vancomicina (ERV) estão restritas a antimicrobianos introduzidos recentemente na prática clínica, como quinupristin/dalfopristin, linezolid, tigeciclina e daptomicina. Porém, estes são aprovados somente em casos especiais e resistência aos mesmos já foi reportada (JOHNSON *et al.*, 2002; WERNER *et al.*, 2003; SEEDAT *et al.*, 2006; MONTERO; STOCK; MURRAY, 2008; WERNER *et al.*, 2008).

Resistência adquirida a ampicilina é um importante marcador fenotípico de *E. faecium* hospitalar na Europa e tem sido mostrado que esse

fenômeno freqüentemente precede o aumento das taxas de ERV com uma antecipação de muitos anos (WERNER *et al.*, 2008).

Como mencionado, um aspecto clinicamente importante associado às espécies do gênero *Enterococcus* é o amplo espectro de resistência aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento das infecções [Tabela 2 (CETINKAYA *et al.*, 2000; TITZE-DE-ALMEIDA *et al.*, 2004; D'AZEVEDO *et al.*, 2006)]. O surgimento de cepas de bactérias resistentes aos antimicrobianos é uma crescente ameaça, especialmente em ambientes hospitalares, constituindo situação alarmante para a saúde pública (COHEN, 1992; NEU, 1992; National Nosocomial Infections Surveillance System, 2001; WEBB *et al.*, 2005).

A primeira descrição de ERV ocorreu no final da década de 1980 em alguns países europeus. Atualmente, seis fenótipos de resistência adquirida a vancomicina em enterococos são conhecidos, entretanto, somente VanA e, em menor extensão, VanB são amplamente distribuídos. Os genes que codificam resistência adquirida a vancomicina estão normalmente associados com elementos genéticos móveis que possibilitam a disseminação da resistência de forma clonal e lateral (WERNER *et al.*, 2008).

O entendimento do mecanismo de resistência aos glicopeptídeos vem se expandindo. Os seis fenótipos de resistência (VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG) são expressos pela transcrição dos operons *van* localizados tanto em plasmídeos como no cromossomo bacteriano (PATEL, 2005). Um sétimo fenótipo de resistência aos glicopeptídeos (VanF) foi descrito em espécies de *Paenibacillus* (FRAIMOW *et al.*, 2005). VanA e VanB são mediados por elementos genéticos adquiridos não encontrados previamente em enterococos e foram descritos primariamente nas espécies *E. faecalis* e *E. faecium* (LAI; KIRSCH, 1996).

Cepas do tipo VanA mostram altos níveis de resistência induzível tanto para vancomicina como para teicoplanina, enquanto cepas do tipo VanB apresentam níveis variáveis de resistência induzível a vancomicina apenas (ARTHUR *et al.*, 1996). Cepas do tipo VanD caracterizam-se por resistência constitutiva a níveis moderados dos dois glicopeptídeos (Depardieu; Reynolds; Courvalin, 2003). Cepas dos tipos VanC, VanE e VanG são resistentes a baixos níveis de vancomicina, mas são sensíveis a teicoplanina (REYNOLDS; COURVALIN, 2005).

Tabela 2 – Características de resistência aos agentes antimicrobianos em espécies de *Enterococcus**

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

*Adaptado de Top; Willems; Bonten (2008)

O mecanismo de resistência já foi melhor caracterizado para o tipo VanA. Um operon *vanA*, contendo sete genes, é encontrado no transposon Tn1546 de *E. faecalis*. Na presença de um indutor, como a vancomicina, a transcrição dos genes necessários para a resistência a vancomicina é ativada. Os genes transcritos são traduzidos em enzimas, algumas das quais produzem precursores da parede celular terminados em D-alanina-D-lactato (D-Ala-D-Lac), com os quais a vancomicina tem muito baixa afinidade [Figura 2 (EVERS *et al.*, 1996; ARTHUR *et al.*, 1998)]. A organização e funcionalidade do tipo VanB são similares às do tipo VanA, mas há diferença na regulação, uma vez que a vancomicina, mas não a teicoplanina é um indutor em VanB (EVERS; COURVALIN, 1996). O fenótipo VanC é expresso de forma constitutiva ou induzível como resultado da produção de precursores dos peptidoglicanos terminados em D-alanina-D-serina (D-Ala-D-Ser) (Reynolds; Courvalin, 2005). Os genes que codificam para o tipo C são intrínsecos, componentes espécie-específicos de *E.gallinarum* (VanC-1), *E. casseliflavus* (VanC-2) e *Enterococcus flavescens* (VanC-3) (NAVARRO; COURVALIN, 1994). O operon *vanD* é similar aos operons *vanA* e *vanB* e sua resistência deve-se à produção constitutiva de precursores terminados em D-Ala-D-Lac (DEPARDIEU; REYNOLDS; COURVALIN, 2003). Em VanE, a organização é idêntica à do operon *vanC*, com síntese de precursores terminados em D-Ala-D-Ser (Abadia Patino; Courvalin; Perichon, 2002). Em VanG, os precursores sintetizados também são terminados em D-Ala-D-Ser (DEPARDIEU *et al.*, 2003).

Os enterococos apresentam vários sistemas de conjugação que podem disseminar os genes que conferem resistência antimicrobiana para outras bactérias. Nesse sentido, *E. faecium* é considerado o maior reservatório e fonte de resistência adquirida aos antimicrobianos. Nos sistemas de conjugação incluem-se plasmídeos, os quais podem replicar em muitas outras espécies de bactérias Gram-positivas, como por exemplo, estafilococos e estreptococos. Há plasmídeos que respondem a feromônios e um tipo especializado de transposon, o qual é conjugativo (MURRAY, 2000).

A possibilidade de transferência de resistência para outros microrganismos possivelmente mais patogênicos é uma crescente preocupação. Clinicamente, foram relatados quatro isolados, não-relacionados, de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina que portavam o gene *vanA* (*S. aureus* resistente a vancomicina). Dois casos ocorreram na Pensilvânia e Michigan, no ano de 2002

(CHANG *et al.*, 2003), um em Nova Iorque, no início de 2004 (MMWR, 2004) e o quarto em Michigan no início de 2005 (Michigan Department of Community Health, 2005). Esses isolados carregavam ambos os genes, *mecA*, que codifica para resistência a meticilina e *vanA* (SEVERIN *et al.*, 2004).

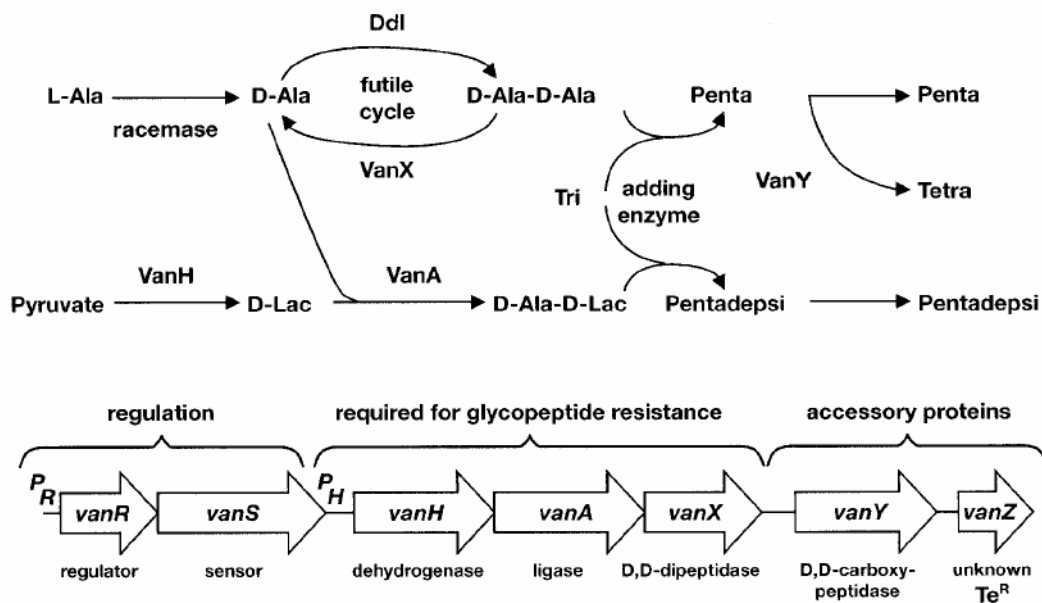


Figura 2 – Resistência aos glicopeptídeos do tipo VanA. Acima, síntese de precursores do peptidoglicano em uma cepa resistente do tipo VanA. Ddl: D-Ala-D-Ala ligase; Penta: L-Ala- γ -D-Glu-L-Lis-D-Ala-D-Ala; Pentadepsi: L-Ala- γ -D-Glu-L-Lis-D-Ala-D-Lac; Tetra: L-Ala- γ -D-Glu-L-Lis-D-Ala; Tri: L-Ala- γ -D-Glu-L-Lis. Abaixo, organização do operon *vanA*. As setas representam seqüências codificantes e indicam a direção da transcrição. Os genes de regulação e resistência são co-transcritos pelos promotores P_R e P_H , respectivamente. Adaptado de Courvalin (2006).

1.3 EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR ERV

Como as infecções por ERV apresentam alta taxa de mortalidade e elevado custo para os serviços de saúde em relação àquelas causadas por cepas sensíveis a vancomicina (SALGADO; FARR, 2003), dados epidemiológicos relatando a ocorrência e disseminação desses microrganismos devem ser compilados (ABELE-HORN *et al.*, 2006). Realmente, ERV tem estimulado uma enorme gama de pesquisas para elucidar os fatores responsáveis pela sua progressão (CHIVERS *et al.*, 2003).

Nos Estados Unidos, a atenção voltou-se para a epidemiologia do ERV principalmente em hospitais. Há poucas evidências sugerindo transmissão deste microrganismo para pessoas saudáveis na comunidade, segundo Murray (1995). A ocorrência do mesmo em animais, como galinhas, pode estar relacionada com o fato de que a avoparcina, um glicopeptídeo, foi utilizada como aditivo em rações por mais de 15 anos no Reino Unido e em outros países europeus (AARESTRUP, 1995; WITTE; KLARE, 1995). Isto sugere que alimentos derivados desses animais podem servir de reservatório para transmissão do ERV para indivíduos não-hospitalizados (CETINKAYA *et al.*, 2000).

Exposição a vancomicina parece ser um fator de risco para a aquisição de ERV em pacientes individuais. Alguns estudos baseados em modelos animais (LOUKIL *et al.*, 2003; RYAN *et al.*, 2006) e estudos em pacientes (WHITENER *et al.*, 2004; CARTER *et al.*, 2005; FRY *et al.*, 2005) reforçam o papel do uso da vancomicina na aquisição de ERV. Entretanto o real efeito desse uso na população é ainda desconhecido e a associação entre utilização de vancomicina e colonização ou infecção por ERV também não está clara (DE BRUIN; RILEY, 2007).

Bactérias resistentes a antimicrobianos, como o ERV, são transmitidas entre os pacientes através de contaminação ambiental ou através do contato interpessoal, como relatado por Webb *et al.* (2005). Pacientes portadores de ERV, como os que têm o trato gastrintestinal colonizado, são, em sua maioria, assintomáticos, de maneira que esse reservatório freqüentemente não é notado a menos que sejam colhidas culturas de vigilância (BOYCE, 1997). Equipamentos médicos e superfícies no ambiente no qual o paciente encontra-se hospitalizado geralmente tornam-se contaminados com ERV, podendo servir de fonte de contaminação. Vários autores têm descrito a transmissão de ERV presente no ambiente hospitalar para as mãos ou para as luvas dos trabalhadores dos serviços de saúde (TENORIO *et al.*, 2001; RAY *et al.*, 2002; BHALLA *et al.*, 2004; DUCKRO *et al.*, 2005; VERNON *et al.*, 2006; HAYDEN *et al.*, 2008). Exemplos de itens que podem estar contaminados incluem camas, chão, termômetros, bombas de infusão, dentre vários outros (KARANFIL *et al.*, 1992; LIVORNESE *et al.*, 1992; GOULD; FREEMAN, 1993; BOYCE *et al.*, 1994; BOYCE *et al.*, 1995; MORRIS *et al.*, 1995; MATO *et al.*, 1996; SLAUGHTER *et al.*, 1996). A disseminação da contaminação ambiental por ERV ocorre especialmente nos ambientes onde há paciente com diarreia (BOYCE *et al.*, 1994). Entretanto, estudos têm mostrado que a limpeza ou

desinfecção do ambiente pode reduzir a incidência de colonização ou infecção por ERV (SCHULTSZ *et al.*, 2003; HAYDEN *et al.*, 2006).

Em resposta ao aumento dramático da resistência a vancomicina em enterococo foram publicadas recomendações para conter a transmissão hospitalar do ERV (Centers for Disease Control and Prevention, 1995). Essas recomendações focaram principalmente: o uso prudente de vancomicina, treinamento dos profissionais, culturas de vigilância e o estabelecimento de medidas de controle, incluindo o uso de luvas e aventais e o isolamento apropriado dos pacientes (CETINKAYA *et al.*, 2000). Para minimizar a transmissão hospitalar de ERV, os hospitais devem fazer uso de programas multidisciplinares, que requerem a participação de vários departamentos e profissionais de diferentes formações (Centers for Disease Control and Prevention, 1995; BOYCE, 1997).

Em vista do exposto, controlar a disseminação da colonização por ERV e prevenir os pacientes colonizados de tornarem-se infectados são metas importantes (PATEL, 2003).

1.4 DETERMINANTES DE VIRULÊNCIA

Como mencionado anteriormente, a maioria dos enterococos é comensal no trato gastrintestinal (MOORE *et al.*, 1974; NOBLE, 1978) ou está presente em ambientes contaminados por dejetos humanos, havendo comparativamente uma pequena fração que é submetida à seleção natural relacionada às infecções em humanos. Portanto, a aquisição de determinantes de virulência está envolvida na sobrevivência do microrganismo em um ambiente altamente competitivo, o trato gastrintestinal (MUNDY *et al.*, 2000).

Shankar *et al.* (2002) foram pioneiros em descrever a presença de uma Ilha de Patogenicidade (IPA) em microrganismo Gram-positivo. A IPA foi detectada inicialmente em *E. faecalis* MMH594 isolado de amostra clínica (SHANKAR *et al.*, 2002). Esses elementos genéticos apresentam vários genes de virulência agrupados (CAMARGO, 2005). Em 2004, Leavis *et al.* descreveram uma nova IPA ligada ao gene *esp* em *E. faecium* e associada com epidemicidade. As IPAs de *E. faecalis* e de *E. faecium* são diferentes, contendo apenas os genes *araC*

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

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

Estudos em cepas de *E. faecalis* revelaram um antígeno dominante de 37 kDa reconhecido por soro de pacientes com endocardite infecciosa (Aitchison *et al.*, 1987). O gene que codifica este antígeno foi clonado, seqüenciado e designado *efaA*. A seqüência de aminoácidos de EfaA apresenta homologia com proteínas de estreptococos com propriedades de adesinas (Lowe *et al.*, 1995). Estudos com um modelo animal de infecção peritoneal sugerem que EfaA é um fator de virulência (SINGH *et al.*, 1998).

Uma adesina que se liga ao colágeno, Acm, foi identificada em *E. faecium*. O gene *acm*, que codifica este potente fator de virulência é funcional somente em certos isolados de *E. faecium* provenientes de infecção. (NALLAPAREDDY; WEINSTOCK; MURRAY, 2003).

O fator de agregação, codificado pelo gene *asa1*, o qual é carregado em um plasmídeo (GALLI; LOTTSPREICH; WIRTH, 1990), é uma proteína de superfície cuja expressão é induzida por feromônios (CLEWELL, 1993). Essa proteína promove a aglutinação entre os microrganismos, facilitando a transferência de plasmídeos durante a conjugação (KREFT *et al.*, 1992; CLEWELL, 1993) e

aumenta a aderência bacteriana a células tubulares renais (KREFT *et al.*, 1992) e cardíacas (GUZMAN *et al.*, 1989).

A gelatinase, codificada pelo gene cromossomal *gelE*, é uma endopeptidase extracelular que hidrolisa colágeno, gelatina e pequenos peptídeos (Su *et al.* 1991) e que mostrou exacerbar a endocardite em um modelo animal (Gutschik *et al.*, 1979). A gelatinase em amostras clínicas de *E. faecalis* tem sido associada principalmente a processos inflamatórios. Alguns trabalhos revelam que ela pode aumentar a virulência dos microrganismos em infecções sistêmicas humanas e em infecções utilizando-se modelos animais (COQUE *et al.*, 1995; NAKAYAMA *et al.*, 2002; PILAI *et al.*, 2002).

A produção de citolisina parece contribuir significativamente para o aumento da severidade da endocardite (CHOW *et al.*, 1993) e endoftalmite (JETT *et al.*, 1992) em modelos animais, bem como para a severidade da doença enterocócica em humanos (IKE; HASHIMOTO; CLEWELL, 1987). Os genes que codificam para a citolisina são carregados em plasmídeo ou integrados ao cromossomo bacteriano (JETT *et al.*, 1994). O operon da citolisina é constituído por oito genes: *cyIR₁*, *cyIR₂*, *cyIL_L*, *cyIL_S*, *cyIM*, *cyIB*, *cyIA* e *cyII* (Coburn; Gilmore, 2003). As subunidades estruturais da citolisina são codificadas por *cyIL_L* e *cyIL_S*. Os produtos desses dois genes são sintetizados e depois modificados pós-traducionalmente pelo produto do terceiro gene do operon, *cyIM* (GILMORE *et al.*, 1994; BOOTH *et al.*, 1996). Após a modificação, ambas as unidades interagem com o produto de *cyIB* (GILMORE *et al.*, 1990; 1994). Uma vez que essas subunidades estejam externalizadas, ocorre a remoção de uma seqüência de seis aminoácidos da região N-terminal de cada uma delas pelo produto do gene *cyIA* (SEGARRA *et al.*, 1991; BOOTH *et al.*, 1996). A função de *cyII* está relacionada à auto-proteção do microrganismo produtor contra a ação da citolisina (COBURN *et al.*, 1999).

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

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

Outro fator de virulência, hialuronidase, foi descrito em *E. faecium* (RICE *et al.* 2003). Ele é codificado pelo gene cromossomal *hyl* e apresenta homologia com hialuronidasas previamente descritas em *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus* e *Streptococcus pneumoniae* (HYNES; WALTON, 2000), as quais parecem contribuir para a invasão da nasofaringe e na patogênese da pneumonia pneumocócica (POLISSI *et al.*, 1998; BERRY; PATON, 2000).

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

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina é centro de referência para o Sistema Único de Saúde (SUS). É um hospital terciário da Rede Sentinela que atualmente dispõe de 333 leitos, sendo 29 destinados a Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (17 para UTI geral, 7 para UTI neonatal e 5 para UTI pediátrica). A média anual de atendimentos no hospital no período de janeiro de 2002 a novembro de 2007 foi de 92000 pacientes-dia. *E. faecium* foi a espécie de ERV mais isolada nesse período tanto em pacientes colonizados quanto infectados, correspondendo a 71,7%. Em seguida, foram isolados *E. faecalis* (28%), e *E. durans* (0,3%) (PERUGINI, 2008). Assim, o objetivo geral deste trabalho foi: analisar os fatores de virulência codificados pelos genes *cylA*, *efaA*, *gelE* e *esp* de *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina isolados de diferentes fontes no Hospital Universitário de Londrina, Paraná, por metodologias molecular e fenotípica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a presença de genes que codificam os seguintes fatores de virulência: citolisina (*cylA*), adesina (*efaA*), gelatinase (*gelE*) e proteína de superfície (*esp*), por PCR;
 - Detectar os fatores de virulência por métodos fenotípicos;
 - Detectar os genes de resistência a vancomicina por PCR;
 - Correlacionar os fatores de virulência.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M. Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. *Microbiol Drug Resist*, v. 1, p. 255-257, 1995.

AARESTRUP, F. M.; BUTAYE, P.; WITTE, W. Nonhuman reservoirs of enterococci. In: GILMORE, M. S., editor. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. Washington, D.C.: ASM Press, p. 55-99, 2002.

ABADIA PATINO, I.; COURVALIN, P.; PERICHON, B. *vanE* gene cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* BM4405. *J Bacteriol*, v. 184, p. 6457-6464, 2002.

ABELE-HORN, M. et al. Molecular epidemiology of hospital-acquired vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol*, v. 44, n. 11, p. 4009-4013, nov. 2006.

AITCHISON, E. J. et al. Serodiagnosis of *Streptococcus faecalis* endocarditis by immunoblotting of surface protein antigens. *J Clin Microbiol*, v. 25, p. 211-215, 1987.

ARIAS, C. A. et al. Rapid identification of *Enterococcus hirae* and *Enterococcus durans* by PCR and detection of a homologue of the *E. hirae mur-2* gene in *E. durans*. *J Clin Microbiol*, v. 44, n. 4, p. 1567-1570, 2006.

ARTHUR, M. et al. Requirement of the VanY and VanX D,D-peptidases for glycopeptide resistance in enterococci. *Mol Microbiol*, v. 30, p. 819-830, 1998.

ARTHUR, M. et al. Quantitative analysis of the metabolism of soluble cytoplasmatic peptidoglycan precursors of glycopeptides-resistant enterococci. *Mol Microbiol*, v. 21, p. 33-44, 1996.

BALDASSARI, L. et al. Variant *esp* gene in a vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium*. *Lancet*, v. 357, p. 1802, 2001.

BERRY, A. M.; PATON, J. C. Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect Immun*, v. 68, p. 133-140, 2000.

BHALLA, A. et al. Acquisition of nosocomial pathogens on hands after contact with environmental surfaces near hospitalized patients. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 25, p. 164-167, 2004.

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

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

BOYCE, J. M. Vancomycin-resistant enterococcus: detection, epidemiology and control measures. *Infect Dis Clin North Am*, v. 11, p. 367-384, 1997.

BOYCE, J. M. et al. Controlling vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 16, p. 634-637, 1995.

BOYCE, J. M. et al. Outbreak of multi-drug resistant *Enterococcus faecium* with transferable VanB class vancomycin resistance. *J Clin Microbiol*, v. 32, p. 1148-1153, 1994.

CAMARGO, I. L. B. C. *Estudo dos fatores de virulência em Enterococcus sp. isolados no Brasil*. 2005. p. 3. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

CARTER, R. J. et al. Infect failure to control an outbreak of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a long-term-care facility: emergence and ongoing transmission of a fluoroquinolone-resistant strain. *Control Hosp Epidemiol*, v. 26, p. 248-255, 2005.

Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for preventing spread of vancomycin resistance. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 16, p. 105-113, 1995.

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C. G. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev*, v. 13, p. 686-707, 2000.

CHANG, S. et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med*, v. 348, p. 1342-1347, 2003.

CHAVERS, L. S. et al. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. *J Hosp Infect*, v. 53, p. 159-171, 2003.

CHENG, S. et al. A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*, v. 35, n. 5, p. 1248-1250, 1997.

CHOW, J. W. et al. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 37, p. 2474-2477, 1993.

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

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

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

COHEN, M. L. *Science*, v. 257, p. 1050-1055, 1992.

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

COQUE, T. M. et al. High occurrence of *esp* among ampicillin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* clones from hospitalized patients. *J Antimicrob Chemother*, v. 50, p. 1035-1038, 2002.

COURVALIN, P. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clin Infect Dis*, v. 42, suppl. 1, p. S25-S34, 2006.

COURVALIN, P. et al. The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 2002.

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

D'AZEVEDO, P. A.; DIAS, C. A. G.; TEIXEIRA, L. M. Genetic diversity and antimicrobial resistance of enterococcal isolates from Southern region of Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 48, p. 11-16, 2006.

DE BRUIN, M. A.; RILEY, L. W. Does vancomycin prescribing intervention affect vancomycin-resistant enterococcus infection and colonization in hospitals? A systematic review. *BMC Infect Dis*, v. 10, p. 7-24, 2007.

DEPARDIEU, F. et al. The *vanG* glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. *Mol Microbiol*, v. 50, p. 931-948, 2003.

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

DUCKRO, A. N. et al. Transfer of vancomycin-resistant enterococci via health care worker hands. *Arch Intern Med*, v. 165, p. 302-307, 2005.

DUPRÈ, I. et al. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J Med Microbiol*, v. 52, p. 491-498, 2003.

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

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

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol*, v. 67, p. 1628-1665, 2001.

ELSNER, H. A. et al. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 19, n. 1, p. 39-42, 2000.

EVERS, S.; COURVALIN, P. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS(B)-VanR(B) two component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *J Bacteriol*, v. 178, p. 1302-1309, 1996.

EVERS, S.; QUINTILIANI JR., R.; COURVALIN, P. Genetics of glycopeptide resistance in enterococci. *Microbiol Drug Resist*, v. 2, p. 219-223, 1996.

FACKLAM, R. R.; COLLINS, M. D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microbiol*, v. 27, p. 731-734, 1989.

FRAIMOW, H. et al. Putative VanRS-like two-component regulatory system associated with the inducible glycopeptide resistance cluster of *Paenibacillus popilliae*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, p. 2625-2633, 2005.

FRY, A. M. et al. Persistence of fluoroquinolone-resistant, multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a long-term-care facility: efforts to reduce intrafacility transmission. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 26, p. 239-247, 2005.

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

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

GILMORE, M. S. et al. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J Bacteriol*, v. 176, p. 7335-7344, 1994.

GORDON, S. et al. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. *J Clin Microbiol*, v. 30, p. 2373-2378, 1992.

GOULD, F. K.; FREEMAN, R. Nosocomial infection with microsphere beds. *Lancet*, v. 342, p. 241-242, 1993.

GUTSCHIK, E.; MOLLER, S.; CHRISTENSEN, N. Experimental endocarditis in rabbits. 3. Significance of the proteolytic capacity of the infecting strains of *Streptococcus faecalis*. *Acta Pathol Microbiol Scand*, v. 87, seř. B, p. 353–362, 1979.

GUZMAN, C. A. et al. Role of adherence in pathogenesis of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection and endocarditis. *Infect Immun*, v. 57, p. 1834–1838, 1989.

HAYDEN, M. K. et al. Risk of hand or glove contamination after contact with patients colonized with vancomycin-resistant enterococcus or the colonized patients environment. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 29, p. 149-154, 2008.

HAYDEN, M. K. et al. Reduction in acquisition of vancomycin-resistant enterococcus after enforcement of routine environmental cleaning measures. *Clin Infect Dis*, v. 42, p. 1552-1560, 2006.

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

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

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

IWEN, P. C. et al. Change in prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from blood cultures over an 8-year period. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 41, p. 494-495, 1997.

JACKSON, C. R.; FREDORKA-CRAY, P. J.; BARRETT, J. B. Use of a genus-and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J Clin Microbiol*, v. 42, n. 8, p. 3558-3565, 2004.

JETT, B. D.; HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev*, v. 7, p. 462–478, 1994.

JETT, B. D. et al. Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect Immun*, v. 60, p. 2445–2452, 1992.

- JOHNSON, A. P. et al. Emerging linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from two Austrian patients in the same intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 21, n. 10, p. 751-754, 2002.
- JOYANES, P. et al. *In vitro* adherence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* to plastic biomaterials. *Clin Microbiol Infect*, v. 5, p. 382–386, 1999.
- KARANFIL, L. V. et al. A cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in an intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 13, p. 195-200, 1992.
- KE, D. et al. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol*, v. 37, n. 11, p. 3497-3503, 1999.
- KOSTMAN, J. R. et al. The universal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping. *J Infect Dis*, v. 171, p. 204-208, 1995.
- KREFT, B. et al. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect Immun*, v. 60, p. 25–30, 1992.
- LAI, M. H.; KIRSCH, D. R. Induction signals for vancomycin resistance encoded by the vanA gene cluster in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 40, p. 1645-1648, 1996.
- LEAVIS, H. et al. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J Bacteriol*, v. 186, p. 672-682, 2004.
- LEAVIS, H. L. et al. Evolutionary insights in the emergence of epidemic and non-epidemic multi-resistant *Enterococcus faecium*. *Emerg Infect Dis*, v. 9, p. 1108-1115, 2003.
- LEHNER, A. et al. *Microbiology Letters*, v. 246, p. 133-142, 2005.
- LEWIS, C. M.; ZERVOS, M. J. Clinical manifestations of enterococcal infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 9, p. 111-117, 1990.
- LIU, D. et al. PCR amplification of a species-specific putative transcriptional regulator gene reveals the identity of *Enterococcus faecalis*. *Res Microbiol*, v. 156, p. 944-948, 2005.

LIVORNESE, L. L. et al. Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. *Ann Intern Med*, v. 117, p. 112-116, 1992.

LOUKIL, C. et al. Epidemiologic investigation of *Burkholderia cepacia* acquisition in two pediatric intensive care units. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 24, p. 707-710, 2003.

LOW, Y. L. et al. Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*. *J Med Microbiol*, v. 52, p. 113-119, 2003.

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

MATO, R. et al. Multiplicity of genetic backgrounds among vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates recovered from an outbreak in a New York City Hospital. *Microbiol Drug Resist*, v. 2, p. 309-317, 1996.

Michigan Department of Community Health. Second Michigan VRSA case. 2005.

MMWR. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Morb Mortal Wkly Rep*, v. 53, p. 322-323, 2004.

MOELLERING, R. C. Jr. Emergence of enterococcus as a significant pathogen. *Clin Infect Dis*, v. 14, p. 1173-1178, 1992.

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

MOORE, W. E.; HOLDEMAN, L. V. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol*, v. 27, p. 961-979, 1974.

MORRIS, J. G. Jr. et al. Enterococci resistant to multiple antimicrobial agents, including vancomycin: establishment of endemicity in a university medical center. *Ann Intern Med*, v. 123, p. 250-259, 1995.

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

MURDOCH, D. R. et al. Sequential emergence of antibiotic resistance in enterococcal blood-stream isolates over 25 years. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, p. 3676-3678, 2002.

MURRAY, B. E. (beta)-Lactamase-producing enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 36, p. 2355-2359, 1992.

MURRAY, B. E. Drug therapy: vancomycin-resistant enterococcal infections. *N Engl J Med*, v. 342, p. 710-721, 2000.

MURRAY, B. E. Editorial Response. *Clin Infect Dis*, v. 20, p. 1134-1136, 1995.

MURRAY, B. E. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev*, v. 3, p. 45-65, 1990.

MURRAY, B. E.; WEINSTOCK, G. M. Enterococci: new aspects of an old organism. *Proc Assoc Am Physicians*, v. 111, p. 328-334, 1999.

NAKAYAMA, J.; KARIYAMA, R.; KUMON, H. Description of a 23,9-kilobase chromosomal deletion containing a region encoding which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in urine. *Appl Environm Microbiol*, v. 68, n. 6, p. 3152-3155, 2002.

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

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

National Nosocomial Infections Surveillance System. *Am J Infect Control*, v. 29, p. 404-421, 2001.

- NAVARRO, F.; COURVALIN, P. Analysis of genes encoding D-alanine-Dalanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 38, p. 1788-1793, 1994.
- NEU, H. C. *Science*, v. 257, p. 1064-1073, 1992.
- NOBLE, C. J. Carriage of group D streptococci in the human bowel. *J Clin Pathol*, v. 31, p. 1182-1186, 1978.
- OLIVE, M. D.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol*, v. 37, p. 1661-1669, 1999.
- PATEL, R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother*, v. 51, suppl. S3, p. iii3-iii21, 2003.
- PATEL, R. Glycopeptide resistance in enterococci [abstract]. In: Proceedings of 5th International Symposium on Antimicrobial Agents and Resistance. *CMP Medica Korea*, p. 40-43, 2005.
- PATTERSON, J. E. et al. Analysis of 110 serious enterococcal infections: epidemiology, antibiotic susceptibility, and outcome. *Medicine*, v. 74, p. 191-200, 1995.
- PERUGINI, M. R. E. Avaliação do impacto de medidas de intervenção no controle de *Enterococcus* spp. resistente a vancomicina em unidade de terapia intensiva. São Paulo, 2008. Tese. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- PILAI, S. K. et al. Prevalence of the *fsr* locus in *Enterococcus faecalis* infections. *J Clin Microbiol*, v. 40, n. 7, p. 2651-2652, 2002.
- POLISSI, A. et al. Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, v. 66, p. 5620-5629, 1998.
- RAY, A. J. et al. Undetected vancomycin-resistant *Enterococcus* stool colonization in a Veterans Affairs Hospital using a *Clostridium difficile*-focused surveillance strategy. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 23, p. 474-477, 2002.

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

RICE, L. B. et al. A potential virulence gene, *hyl_{Efm}*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J Infect Dis*, v. 187, p. 508-512, 2003.

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

RUOFF, K. L. et al. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol*, v. 28, p. 434-437, 1990.

RYAN, M. A. et al. Antimicrobial activity of native and synthetic surfactant protein B peptides. *J Immunol*, v. 176, p. 416-425, 2006.

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

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

SATAKE, S. et al. Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *J Clin Microbiol*, v. 35, p. 2325-2330, 1997.

SCHLEIFER, K. H.; KLIPPER-BALZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*, v. 34, p. 31-34, 1984.

SCHULTSZ, C. et al. Ultra-sonic nebulizers as a potential source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing an outbreak in a university tertiary care hospital. *J Hosp Infect*, v. 55, p. 269-275, 2003.

SEEDAT, J. et al. Rapid emergence of resistance to linezolid during linezolid therapy of an *Enterococcus faecium* infection. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 50, n. 12, p. 4217-4219, 2006.

SEGARRA, R. A. et al. Molecular characterization of the *Enterococcus faecalis* cytolysin activator. *Infect Immun*, v. 59, p. 1239-1246, 1991.

SEVERIN, A. et al. High level oxacillin and vancomycin resistance and altered cell wall composition in *Staphylococcus aureus* carrying the staphylococcal *mecA* and the enterococcal *vanA* gene complex. *J Biol Chem*, v. 279, p. 3398-3407, 2004.

SGHIR, A.; et al. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol*, v. 66, p. 2263-2266, 2000.

SHANKAR, N. et al. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun*, v. 69, p. 4366-4372, 2001.

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

SHANKAR, V. et al. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun*, v. 67, p. 193-200, 1999.

SHERMAN, J. M. The streptococci. *Bacteriol Rev*, v. 1, p. 3-97, 1937.

SINGH, K. V. et al. In vivo testing of an *Enterococcus faecalis* *efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 21, p. 323-331, 1998.

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

SU, Y. A. et al. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect Immun*, v. 59, p. 415-420, 1991.

- TANNOCK, G. W.; COOK, G. Enterococci as members of the intestinal microflora of humans, p. 101-132. In: GILMORE, M. S. et al. Determination of *Enterococcus faecalis* *groESL* full-length sequence and application for species identification. *J Clin Microbiol*, v. 39, n. 9, p. 3326-3331, 2001.
- TENORIO, A. R. et al. Effectiveness of gloves in the prevention of hand carriage of vancomycin-resistant *Enterococcus* species by health care workers after patient care. *Clin Infect Dis*, v. 32, p. 826-829, 2001.
- TITZE-DE-ALMEIDA, R. et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of Enterococci recovered from Brazilian intensive care units. *Braz J Infect Dis*, v. 8, p. 197-205, 2004.
- TOLEDO-ARANA, A. et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, v. 67, p. 4538-4545, 2001.
- TOP, J.; WILLEMS, R.; BONTEN, M. Emergency of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 52, p. 297-308, 2008.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4. Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.
- TSAI, J. C. et al. Identification of clinically relevant *Enterococcus* species by direct sequencing of *groESL* and spacer region. *J Clin Microbiol*, v. 43, n. 1, p. 235-241, 2005.
- TYRRELL, G. J. et al.. Species identification of enterococci via intergenic ribosomal PCR. *J Clin Microbiol*, v. 35, n. 5, p. 1054-1060, 1997.
- VERNON, M. O. et al. Chlorhexidine gluconate to cleanse patients in a medical intensive care unit. *Arch Intern Med*, v. 166, p. 306-312, 2006.
- WEBB, G.F. et al. A model of antibiotic-resistant bacterial epidemics in hospitals. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 102, n. 37, p. 13343-13348, set. 2005.
- WERNER, G. et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Eurosurveillance*, v. 13, issue 47, p. 1-11, 2008.

WERNER, G. et al. Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from a German ICU patient. *J Antimicrob Chemother*, v. 61, p. 1182-1183, 2008.

WERNER, G. et al. Intra-hospital dissemination of quinupristin/dalfopristin and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a paediatric ward of a German hospital. *J Antimicrob Chemother*, v.52, n. 1, p. 113-115, 2003.

WESTENFELDER, G. O. et al. Vancomycin-streptomycin synergism in enterococcal endocarditis. *JAMA*, v. 223, p. 37-40, 1973.

WHITENER, C. J. et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the absence of vancomycin exposure. *Clin Infect Dis*, v. 38, p. 1049-1055, 2004.

WILLEMS, R. J. et al. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet*, v. 357, p. 853-855, 2001.

WILLEMS, R. J. L.; BONTEN, M. J. M. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Curr Opin Infect Dis*, v. 20, p. 384-390, 2007.

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

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

4 TRABALHO CIENTÍFICO

Title: Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium vanA* isolated from different sources at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil.

Running title: Characteristics of vancomycin-resistant *E. faecium*

Flávia Imanishi Ruzon, Suelen Balero de Paula¹,

Lucy Megumi Yamauchi¹,

Marcia Regina Eches Perugini²,

Pereira-Santos¹,

Renata Katsuko Takahashi Kobayashi²,

Renata Lumi Kanoshiki, Jussevania³

Sueli Fumie Yamada-Ogatta^{1*}

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

*Corresponding author: ogatta@uel.br

¹ Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid s/n, Campus Universitário, 86051-990, Londrina, PR, Brasil.

² Laboratório de Microbiologia Clínica, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

³ Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

SUMMARY

In this study, the occurrence of the putative virulence genes *cyIA*, *efaA*, *esp* and *geE* in forty *Enterococcus faecium vanA*-type isolates from hospitalized patients and their environmental vicinity was investigated by molecular and phenotypic methods. All isolates were shown to be resistant to vancomycin and teicoplanin, as well as to two or more other antimicrobials. All isolates harbored at least one putative virulence marker, and the prevalence was as follows: *esp*, 87.5%; *efaA*, 82.5%; *geE*, 70%; and *cyIA*, 65%. The presence of 4 genes was observed in 32.5% isolates. The presence of the *efaA* was associated with the presence of the *esp*, independent of the source of the isolates. A positive association with the presence of the *cyIA* and hemolytic activity in the sheep blood agar assay was observed. No association was found for the *geE* and gelatinase production in the agar plate assay, for the *efaA* and LLC-MK2 cell adhesion, and for the *esp* and biofilm formation on polystyrene surface. These results show the potential virulence of nosocomial multiple antimicrobial resistant *E. faecium* isolated from different sources. Knowledge about their role in the pathogenesis of infection can contribute to the development of new strategies for combating enterococcal infection.

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

Financial support: Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina.

INTRODUCTION

Enterococci are opportunistic pathogens that can cause a wide variety of diseases, especially in immunocompromised patients and nosocomial settings, such as, urinary tract infections, surgical and burn wound infections, bacteremia and endocarditis (Sood et al. 2008). *Enterococcus faecalis* has been regarded as the most common causative agent of enterococcal infections (Titze-de-Almeida et al. 2004, d'Azevedo et al. 2006). However, *Enterococcus faecium* has become a significant cause of nosocomial infections worldwide (Treitman et al. 2005, Deshpande et al. 2007, Hoshuyama et al. 2008, Top et al. 2008b, Werner et al. 2008). This scenario is likely explained in part by the capacity of *E. faecium* to acquire multiple antimicrobial resistance determinants (Willems & Bonten 2007, Sood et al. 2008). Indeed, data from nosocomial infection surveillance all over the world have shown a growing percentage of vancomycin-resistant *E. faecium* (EVRfm) isolates (TREITMAN, et al. 2005; DESHPANDE, et al. 2007; BIEDENBACH, et al. 2007).

Various traits of enterococci have been considered as putative factors of virulence and infection development and several investigators have detected the presence of the genes encoding putative virulence markers in *E. faecium* from different sources (Vankerckhoven et al. 2004; 2008, Camargo et al. 2006, Biavasco et al. 2007, Billström et al. 2008, Worth et al. 2008, Hällgren et al. 2008). A 37-kDa cell wall protein encoded by the *efaA* gene (*E. faecalis* antigen A) was first detected in the serum of a patient with *E. faecalis* endocarditis. The amino acid sequence of EfaA was found to show homology with a group of streptococcal proteins with adhesion properties (Lowe et al. 1995). Studies with *E. faecalis efaA*⁻ mutant in a mouse peritonitis model suggested that EfaA is a virulence factor

(Singh et al. 1998a). The *esp* gene encoding an enterococcal surface protein is located in a pathogenicity island in both *E. faecalis* (Shankar et al. 2002) and *E. faecium* (Leavis et al. 2004). In *E. faecalis*, *esp* has been identified among human and animal-derived isolates (Hammerum & Jensen 2002, Bittencourt de Marques & Suzart 2004), but in *E. faecium*, it is specifically enriched in hospital-acquired isolates (Willems et al. 2001, Hammerum & Jensen 2002). The presence of the gene *esp* has been associated with colonization and persistence of *E. faecalis* in ascending urinary tract infection (Shankar et al. 2001). Some secreted molecules are putative virulence factors of enterococci. Gelatinase is an extracellular zinc metalloprotease encoded by the chromosomal *gelE* gene (Su et al. 1991), whose product can hydrolyze gelatin, casein, hemoglobin, fibrin and small peptides (Mäkinen et al. 1989, Su et al. 1991, Waters et al. 2003). It also cleaves C3a and C3b components of the human complement system (Park et al. 2007), which can explain the complement resistance of *E. faecalis*. In addition, gelatinase activity has been shown to contribute to virulence in a mouse peritonitis model (Singh et al. 1998b). Another secreted virulence determinant is cytolysin, which is a two-peptide lytic toxin encoded by an operon consisting of eight genes (*cy/R1*, *cy/R2*, *cy/L_L*, *cy/L_S*, *cy/M*, *cy/B*, *cy/A*, *cy/I*) carried on a plasmid or integrated into the bacterial chromosome (Shankar et al. 2002, Coburn & Gilmore 2003). Two main activities are associated with cytolysin, hemolysin and bacteriocin: they can lyse erythrocytes of different origin (Izumi et al. 2005) and a broad range of Gram-positive bacteria (Coburn & Gilmore 2003). Cytolysin contributes to enterococci virulence as shown in several animal models of enterococcal infections (JETT, et al. 1992; SINGH, et al. 1998b).

In this study, the occurrence of four virulence determinants in VREfm isolated from hospitalized patients and their environmental vicinity was investigated by molecular and phenotypic methods.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms – At University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil, from 2002 to 2007, VREfm was the most frequent species isolated from infected and colonized patients and environmental sources (Dr. Perugini MRE, personal communication). A total of 40 non-duplicate VREfm isolates of different origin were taken randomly from the bacterial collection of the Laboratory of Clinical Microbiology of Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil. Human isolates were classified according to CDC definitions of nosocomial infections (Garner et al. 1996). A total of 30 isolates were recovered from different patients: 18 isolates were considered colonizing enterococci, where 10 were isolated from rectal swab specimens (fecal carriage) and 8 from urine. Twelve human isolates were recovered from various clinical sources (mainly urine). 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. All enterococci were identified to the species level on the basis of the profile generated by the automated MicroScan WalkAway 96 Instrument (Dade MicroScan, Sacramento, USA). Concomitantly, colony morphology, Gram stain, catalase assay, tolerance to bile-aesculin, growth in 6.5% NaCl and biochemical tests using the API 20S (BioMérieux, São Paulo, Brazil) were also determined. Bacteria were kept in brain heart infusion (BHI, Himedia, India) agar medium at room temperature and also preserved in 20% glycerol-BHI broth at -20 °C.

DNA extraction – Whole DNA of all enterococcal strains was extracted by the boiling method as described by Bittencourt de Marques and Suzart (2004). Briefly, a single bacterial colony was added to 3 ml BHI broth and incubated at 37 °C for 18 h. The cultures were centrifuged at 13,000 rpm for 5 min, the bacterial pellets were resuspended in 300 µl sterile ultrapure water and boiled (100 °C) for 30 min. Cellular debris was removed by centrifugation and a 10-µl aliquot of supernatant was used in all amplification reactions.

Antimicrobial susceptibility and vancomycin resistance genes – The isolates were tested for susceptibility against 9 antimicrobials (ampicillin, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, rifampicin, streptomycin, teicoplanin, tetracycline and vancomycin), using the automated broth microdilution panel of the MicroScan WalkAway 96 Instrument, according to the manufacturer's recommendations. The Pos Combo 12 (PC 12) tray containing vancomycin (Dade Behring) was used. The results reported here were those recorded after 24 h of incubation. The susceptibility breakpoints used were those recommended by Clinical Laboratory Standard (CLSI, 2007). *E. faecalis* ATCC 29212 and 51299 were used for quality control. The vancomycin resistance gene was determined using multiplex PCR described by Petrich et al. (1999). The primer nucleotide sequences are shown in Table 1.

PCR primer design and amplification of putative virulence genes – The genes encoding putative virulence factors tested were the following ones: *cytA* (activator of cytolysin, a secreted protein with hemolysin/bacteriocin activities), *efaA* (*E. faecalis* antigen A, an endocarditis-associated virulence factor), *esp* (enterococcal surface protein), and *gelE* (gelatinase). The nucleotide sequences of *E. faecium* genes deposited in the GenBank/EMBL databases were used for specific primer

design with Primer Select software (DNASTAR Lasergene). The primer sequences and expected size of amplicons for each PCR assay are shown in Table 1. PCR was performed in a final volume of 20 μ l containing 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M of each dNTP, 10 pmol of each forward and reverse primer, 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil), and 10 μ l of genomic DNA. The amplification reactions were performed in a MWG Biotech Primus Thermal Cycler with an initial denaturation at 94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 30 s, annealing at 58 °C for 30 s and extension step at 72 °C for 1 min. Negative control reactions without any template DNA were carried out simultaneously. After amplification, 5 μ l of each PCR sample and a 100-bp DNA molecular weight ladder were separated in a 2.0% 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 stained with ethidium bromide. Positive controls in the PCR assays were *E. faecalis* 206 (*efaA*), *E. faecalis* 316 (*esp*, *cyIA*) and *E. faecalis* 357 [*geIE*, (BITTENCOURT DE MARQUES & SUZART, 2004)].

Detection of gelatinase and hemolytic activities – Gelatinase and hemolytic activities were assayed on agar plates containing 1% gelatin (Difco, USA) and 5% fresh sheep blood as substrate, respectively. For both assays, enterococcal strains were previously cultured at 37 °C for 18 h in BHI broth. For gelatinase activity, a 10- μ l suspension of 10⁷ cells was placed on the surface of nutrient agar medium supplemented with 1% gelatin and the cultures were incubated at 37 °C for 24 h. After which the presence of the degradation zone around the colony was observed. For hemolytic activity, bacterial cells were added to the surface of Muller Hinton agar (Himedia, India) medium supplemented with 5% fresh sheep blood, pH 7.3. The plates were incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 48 h. Hemolytic activity was indicated

by a translucent halo around the inoculum site. Each isolate was tested in triplicate, and the experiments were carried out on three different occasions. *Serratia marcescens* and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were used as positive controls for gelatinase and hemolysin activities, respectively.

Biofilm formation on polystyrene surface – Enterococcal strains were previously cultured at 37 °C for 24 h in BHI broth supplemented with 1% glucose. The cell density was adjusted to 1.5×10^8 CFU/ml in the same medium, and a 200- μ l aliquot of each suspension was transferred to two wells of a 96-well flat-bottomed polystyrene microtiter plates (Techno Plastic Products, Switzerland). Negative control wells containing broth only were included. The plates were incubated statically in aerobic conditions at 37 °C for 24 h. After the incubation period, the medium was aspirated off and non-adherent cells were removed by washing thoroughly three times with sterile distilled water. The adherent bacterial film was fixed by air drying at 60 °C for 1 h and then stained with 200 μ l of filtered 2% crystal violet (Gram stain). The optical density of each well was measured at 570 nm using a microtiter plate reader (Universal Microplate Reader ELx 800, Bio-Tek Instruments). Experiments were carried out in triplicate on three different occasions. Biofilm formation was scored according to the criteria proposed by STEPANOVIC et al. (2000).

Adhesion of bacterial strains to LLC-MK2 cells – Enterococcal strains were tested for adherence to LLC-MK2 (rhesus monkey kidney) cells as described by Archimbaud et al. (2002), with minor modifications. LLC-MK2 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 0.25 mg/ml amphoterecin B in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. For adhesion assays, LLC-MK2 cells were seeded in 24-well plates at 1×10^5 cells per well and

incubated for 18 h. The medium was removed and replaced with fresh culture medium minus the antimicrobials, the wells were inoculated with *E. faecium* strains with approximately 1×10^7 cells, and the plates were incubated at 37 °C for 2 h in 5% CO₂ atmosphere. Non-adherent bacterial cells were removed by washing with sterile phosphate-buffered saline (PBS). Adherent bacteria were harvested by treatment of the cell monolayers with 1 ml 0.5% (v/v) Triton X-100 (Sigma Chemical Co) for 10 min on ice. The viable bacteria were enumerated by dilution plating in BHI agar. Experiments were carried out in duplicate on three different occasions. The percent adherence was calculated by the equation: % Adherence = $(cfu_{120}/cfu_0) \times 100$, where cfu_{120} refers to adhered bacterial cells per ml after 2 h and cfu_0 the initial number of inoculated cells. A percent adherence 1.5 times higher than the mean % adherence of all isolates was considered significant.

Statistical analyses – The presence of the virulence markers regarding the origin of the *E. faecium* isolates was analyzed by the Fisher method. Spearman's rank correlation was determined to compare the degree of association between the presence of virulence genes and the corresponding phenotype. A *p* value less than 0.05 was considered significant.

RESULTS

Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial susceptibilities – Using the automated broth microdilution system, susceptibility profile to 9 antimicrobial agents was determined. All isolates were resistant to vancomycin and teicoplanin, and the mechanism of resistance is mediated by *vanA* type gene. Besides being resistant to vancomycin and teicoplanin, all isolates showed resistance to two or more other antimicrobials (Table 2). According to the

phenotypic resistance profile, the *E. faecium* isolates were classified into 8 groups (Table 2). The majority of the isolates (22 out of 40 isolates, 55%) displayed the group II phenotypic antimicrobial resistance profile (ampicillin, ciprofloxacin, erythromycin, tetracycline, teicoplanin, and vancomycin).

Detection of putative virulence genes – The presence of the genes *cylA*, *efaA*, *esp* and *gelE* in *E. faecium* isolates was determined by PCR, and the results are shown in Table 3. All virulence genes examined were commonly found in *E. faecium* isolated from different sources, and the prevalence was as follows: *esp*, 87.5%; *efaA*, 82.5%; *gelE*, 70%; and *cylA*, 65%. All isolates harbored at least one putative virulence marker and the presence of 4 genes was observed in 32.5% isolates (Table 4). Regarding the origin of the isolates, only the presence of *gelE* gene was significantly higher in colonizer and infection isolates compared to environmental isolates ($p < 0.01$). In addition, the presence of *efaA* gene was associated with the presence of the *esp* gene, independent of the source of the isolates ($p < 0.001$).

Relationship between virulence genes and putative corresponding phenotypes – A positive association with the presence of *cylA* gene and hemolytic activity on sheep blood agar assay was observed ($p < 0.001$). Seventeen enterococcal isolates harbored the gene *cylA* and formed a translucent halo around the inoculum site characteristic of beta-hemolysis and 13 *cylA*-negative isolates did not produce hemolysis on sheep-blood agar medium. Nine isolates were positive for the presence of the gene but were negative for hemolysis production. One isolate did not possess the gene and was positive for hemolytic activity. No significantly association was found for *gelE* gene and gelatinase production on agar plate assay. In 23 isolates, the presence of the gene was associated with gelatin degradation.

Fifteen isolates were positive for the presence of *gelE* gene but were unable to use gelatin as substrate. Two isolates degraded gelatin, but did not possess the *gelE* gene. Also, no significant association was found between the presence of *efaA* gene and adhesion to LLC-MK2 cells. Nine isolates harboring the *efaA* gene were able to adhere to these cells, and in 3 adherent isolates the gene was not detected in their genome. A similar result was obtained for the presence of the *esp* gene and biofilm formation. Only 11 isolates harboring the gene *esp* were able to form biofilm on the surface of a polystyrene microplate. A total of 28 isolates possessed the *esp* gene and did not form biofilm, and in contrast, the gene was not detected in the genome of 1 isolate that was able to form biofilm on that surface. A significant correlation was observed between cell adhesion and biofilm formation ($p < 0.02$).

DISCUSSION

Over the past two decades, studies on the putative virulence factors of enterococci have mainly focused on *E. faecalis* isolates, the most frequent agent of enterococcal infections. However, as mentioned, the ratio of *E. faecalis* to *E. faecium* human infections has been changing all over the world and *E. faecium* isolates, especially those showing multidrug resistance, are responsible for the leading causes of nosocomial infections (Treitman et al. 2005, Biedenbach et al 2007, Deshpande et al. 2007, Hoshuyama et al. 2008, Top et al. 2008b). VREfm in hospital wards, due to the presence of fecal carriage or infected patients, and contaminated environmental surfaces and medical equipment, has been considered a potential risk factor for enterococcal transmission (DREES, et al. 2008).

In this study, the presence of four virulence markers and the corresponding putative phenotype was determined in *E. faecium* isolates from

colonized and infected-patients, and environmental surfaces in the patient's room. A high frequency of multiple antimicrobial-resistant *E. faecium* isolates was observed, and this phenotype was independent of their origin. Resistance to vancomycin was common to all isolates and they harbored the *vanA* gene. This result is in accordance with the glycopeptide resistance phenotype detected by broth microdilution assay, where all isolates were resistant to high levels of vancomycin and teicoplanin. The mechanisms of vancomycin resistance mediated by the *vanA* and *vanB* genes are more widely distributed (Werner et al. 2008, Sood et al. 2008, Dendle et al. 2009). However, incongruent results have been obtained with regard to vancomycin resistance phenotype and genotype in enterococcal isolates. Henrique et al. (2008) described that *E. faecalis* and *E. faecium* isolates harbored the *vanA* gene and showed vancomycin resistance but were susceptible or moderately resistant to teicoplanin. In addition, isolates harboring both the *vanA* and *vanB* genes with VanA phenotype were also detected (DENDLE, et al. 2009).

Although *E. faecium* is considered an important nosocomial pathogen, little is known about its virulence. In this study, at least one virulence marker analyzed was detected by PCR in all *E. faecium* isolates. Several screenings using *E. faecium* isolates from different sources have shown the low prevalence of the virulence markers in this species. Overall, only the *esp* gene was frequently found in these studies followed by the *hyl* gene which encodes hyaluronidase (VANKERCKHOVEN, et al. 2004; 2008, CAMARGO, et al. 2006, BILLSTRÖM, et al. 2008, HÄLLGREN, et al. 2008, WORTH, et al. 2008).

The *esp* gene was detected in the majority of the VREfm isolates, in this study, consistent with the findings of Camargo et al. (2006). However, there was no difference regarding the origin of the enterococci as shown by

Vankerckhoven et al. (2004). In that study, the presence of the gene *esp* was significantly higher in VREfm (predominantly *vanA* type) isolated from clinical specimens compared to fecal carriage patients. There was no correlation with the presence of *esp* gene and biofilm formation on polystyrene surface in our isolates, where the rate was low in all cases. As demonstrated, Esp expression on the surface of *E. faecium* is variable among strains and depends on growth conditions, with elevated expression at 37 °C compared to 21 °C, and when grown under anaerobic compared to aerobic conditions. In addition, Esp expression is correlated with initial adherence and biofilm formation on polystyrene surface (Van Wamel et al. 2007). In view of this, other surfaces and conditions should be assayed to evaluate the capacity of these isolates to form biofilm.

On the other hand, there is controversy over the role of *E. faecalis* Esp in biofilm formation. While some investigators found no correlation between the presence or absence of the *esp* gene in clinical isolates and biofilm formation (Kristich et al. 2004), Esp-mediated biofilm formation was demonstrated by others (Toledo-Arana et al. 2001, Tendolkar et al. 2004). Esp expression on the surface of *E. faecium* seems to play a role in mediating initial adherence and biofilm formation on polystyrene surface (Van Wamel et al. 2007). Corroborating this, Heikens et al. (2007) demonstrated that the adherence and biofilm formation, on the same surface, were significantly reduced in an *E. faecium esp*⁻ mutant compared to wild-type bacteria. In contrast, there were no significant differences in adherence to Caco-2 cells and intestinal colonization of mice with *E. faecium esp*⁻ and parental strain. These results indicate that Esp expression is not essential for these processes (HEIKENS, et al. 2009).

A positive correlation was observed for the presence of the *esp* gene and *efaA* gene, the second most frequent gene found in our isolates. This is in contrast to the results of Billström et al. (2008) who did not detect the presence of the *efaA* gene in *E. faecium* isolated from the blood of hospitalized patients.

Most of the isolates harbored the *gelE* gene in this study. This is in contrast to the findings of Camargo et al. (2006). These authors did not detect *gelE* in any isolates of VREfm and vancomycin-sensitive *E. faecium* from different sources. No gelatinase activity was detected in 15 *E. faecium gelE*-positive isolates. Similar results were obtained by Biavasco et al. (2007) in VREfm *vanA* type isolates from human feces and animals. As gelatinase can degrade different peptides besides gelatin (Mäkinen et al. 1989, Su et al. 1991, Waters et al. 2003), other substrates should be evaluated for gelatinase production.

The gene encoding the cytolysin activator *cyIA* was found in 50% of the isolates in our study. This is in disagreement with those results reported by Vankerckhoven et al. (2004; 2008), Camargo et al. 2006, Billström et al. (2008), Hällgren et al. (2008) and Worth et al. (2008), who did not find any gene from the *cyl* operon in *E. faecium* isolates. We found a significant correlation between the presence/absence of *cyIA* gene and positive/negative hemolysin activity in the sheep-blood agar plate assay, corroborating the results of Biavasco et al. (2007). These investigators did not detect the *cyIB* gene in hemolysin-negative *E. faecium* isolates. Probably, in 9 *cyIA*-positive isolates, the gene product was related to bacteriocin activity.

One important aspect of enterococci is that several virulence markers and genes encoding antimicrobial resistance are located on mobile elements (Shankar et al. 2002, Leavis et al. 2004) and could be transferred among themselves

and to other bacteria (Coburn et al. 2007, Werner et al. 2008). The surveillance strategies to limit the spread of multidrug-resistant *E. faecium* and other enterococci are needed in any hospital. We agree with Top et al. (2008a) that knowledge about the virulence of these microorganisms can contribute to the development of new strategies of fighting enterococcal infection.

In conclusion, we described a higher prevalence of *E. faecium* isolates harboring multiple antimicrobial resistance and putative virulence genes, which were recovered from different sources at University Hospital of Londrina. Besides being resistant to vancomycin and teicoplanin, all isolates showed resistance to two or more other antimicrobials. At least one out of four genes (*cylA*, *efaA*, *esp* and *gelE*) were commonly found in *E. faecium* isolates, but overall there were no correlations with the putative phenotype assayed, except for *cylA* gene and hemolysis. Further studies are warranted to evaluate the role of these virulence markers in the pathogenesis of *E. faecium*, and such investigations are currently underway in our laboratory.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPPG) of Universidade Estadual de Londrina (UEL). This work was part of the M.Sc. dissertation of F.I. Ruzon. We thank Dr. A. Leyva for English editing of the manuscript and Ediel Clementino da Costa for technical support.

REFERENCES

ARCHIMBAUD, C. et al. In vitro adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. *Res Microbiol* 153: 75-80, 2002.

BIAVASCO, F. et al. VanA-type enterococci from humans, animals, and food: species distribution, population structure, Tn1546 typing and location, and virulence determinants. *Appl Environ Microbiol* 73: 3307-3319, 2007.

BIEDENBACH, D.J. et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacterial isolates from the Asia-Pacific region and an in vitro evaluation of the bactericidal activity of daptomycin, vancomycin, and teicoplanin: a SENTRY Program Report (2003-2004). *Int J Antimicrob Agents* 30: 143-149, 2007.

BILLSTRÖM, H.; LUND, B.; SULLIVAN, A.; NORD, C.E. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents* 32: 374-377, 2008.

BITTENCOURT DE MARQUES, E.; SUZART, S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. *J Med Microbiol* 53: 1069-1073, 2004.

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. *Clin Microbiol Infect* 12: 1123-1130, 2006.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (2007). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A7. Wayne, PA.

COBURN, P.S.; BAGHDAYAN, A.S.; DOLAN, G.T.; SHANKAR, N. Horizontal transfer of virulence genes encoded on the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. *Mol Microbiol* 63: 530-544, 2007.

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

D'AZEVEDO, P.A.; DIAS, C.A.G.; TEIXEIRA, L.M. Genetic diversity and antimicrobial resistance of enterococcal isolates from Southern region of Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 48: 11-16. 2006.

DENDLE, C.; BALLARD, S.A.; GRABSCH, E.A.; GAO, W.; GRAYSON, M.L. Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* containing both *vanA* and *vanB* gene clusters. *J Hosp Infect* 71: 379-381, 2009.

DESHPANDE, L.M.; FRITSCH, T.R.; MOET, G.J.; BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 58: 163-170, 2007.

DREES, M. et al. Prior environmental contamination increases the risk of acquisition of vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis* 46: 678-685, 2008.

GARNER, J.S. et al. CDC definitions for nosocomial infections. APIC Infection Control and Applied Epidemiology: Principles and Practice. Olmsted RN, ed. St. Louis, Mosby, pp. A-1 – A-20. 1996.

HÄLLGREN, A. et al Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. *Int J Med Microbiol* doi: 10.1016/j.ijmm.2008.10.001, 2008.

HAMMERUM, A.M.; JENSEN, L.B. Prevalence of *esp*, encoding the enterococcal surface protein, in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospital patients, poultry, and pigs in Denmark. *J Clin Microbiol* 40: 4396, 2002.

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

HEIKENS, E. et al. Enterococcal surface protein Esp is not essential for cell adhesion and intestinal colonization of *Enterococcus faecium* in mice. *BMC Microbiol* 29: 9-19, 2009.

HENRIQUE, P.M. et al. Molecular characterization of enterococci harboring genotype and phenotype incongruence related to glycopeptide resistance isolated in Brazilian hospitals. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 301-305, 2008.

HOSHUYAMA, T. et al Vancomycin-resistant enterococci (VRE) outbreak at a university hospital in Kitakyushu, Japan: case-control studies. *J Infect Chemother* 14: 354-360, 2008.

Izumi E. et al Hemagglutinating and hemolytic activities of *Enterococcus faecalis* strains isolated from different human clinical sources. *Res Microbiol* 156: 583-587, 2005.

JETT, B.D. et al Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect Immun* 60: 2445-2452, 1992.

KRISTICH, C.J. et al. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 186: 154-163, 2004.

LEAVIS, H. et al. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J Bacteriol* 186: 672-682, 2004.

LOWE, A.M.; LAMBERT, P.A.; SMITH, A.W.. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect Immun* 63: 703-706, 1995

MÄKINEN, P.L. et al Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase (“gelatinase”) from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10). *J Biol Chem* 264: 3325-3334, 1989.

PARK, S.Y. et al Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infect Immun* 75: 1861-1869, 2007.

PETRICH, A.K. et al. Direct detection of *vanA* and *vanB* genes in clinical specimens for rapid identification of vancomycin resistant enterococci (VRE) using multiplex PCR. *Mol Cell Probes* 13: 275-281, 1999.

SINGH, K.V. et al. *In vivo* testing of an *Enterococcus faecalis* *efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. *FEMS Immunol Med Microbiol* 21: 323-331, 1998a.

SINGH, K.V. et al. Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *J Infect Dis* 178: 1416-1420, 1998b.

SHANKAR, N. et al Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* 69: 4366-4372. 2001.

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

SOOD, S. et al. Enterococcal infections and antimicrobial resistance. *Indian J Med Res* 128: 111-121, 2008.

STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 40: 175-179, 2000.

SU, Y.A. et. al 1991. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*ge/E*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect Immun* 59: 415-420.

TENDOLKAR, P.M. et al. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 72: 6032-6039, 2004.

TITZE-DE-ALMEIDA, R. et al Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of Enterococci recovered from Brazilian intensive care units. *Braz J Infect Dis* 8: 197-205, 2004.

TOLEDO-ARANA, A. et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 67: 4538-4545, 2001.

TOP, J.; WILLEMS, R.; BONTEN, M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52: 297-308, 2008a.

TOP, J. et al. Emergence of clonal complex 17 *Enterococcus faecium* in The Netherlands. *J Clin Microbiol* 46: 214-219, 2008b.

TREITMAN, A.N. et al. Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993-2002). *J Clin Microbiol* 43: 462-463, 2005.

VANKERCKHOVEN, V. et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *geE*, *cylA*, *esp* and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 42: 4473-4479, 2004.

VANKERCKHOVEN, V. et al. Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. *Appl Environ Microbiol* 74: 4247-4255, 2008.

VAN WAMEL, W.J. et al. Growth condition-dependent Esp expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. *Infect Immun* 75: 924-931, 2007.

WATERS, C.M. et al. Role of the *Enterococcus faecalis* GeE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J Bacteriol* 185: 3613-3623, 2003.

WERNER, G. 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: 515-527, 2008.

WILLEMS, R.J. et al. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospital. *Lancet* 357: 853-855, 2001.

WILLEMS, R.J.; BONTEN, M.J. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Curr Opin Infect Dis* 20: 384-390, 2007.

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

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

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

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

Table 2: Phenotypic antimicrobial resistance profile of *Enterococcus faecium* isolated from different sources at University Hospital of Londrina

Group	Phenotypic antimicrobial resistance	Source ^a		
		Environment	Colonizer	Infection
I	amp, cip, eri, gen, rif, tei, van	6 (60)	6 (33.4)	-
II	amp, cip, eri, tei, tet, van	2 (20)	11 (61.1)	9 (75)
III	amp, cip, eri, str, tei, tet, van	-	-	1 (8.3)
IV	amp, eri, gen, rif, tei, van	1 (10)	-	-
V	amp, cip, eri, gen, rif, tei, tet, van	-	-	1 (8.3)
VI	rif, tei, van	-	1 (5.6)	-
VII	amp, cip, eri, tei, van	-	-	1 (8.3)
VIII	eri, gen, rif, tei, tet, van	1 (10)	-	-
Total		10	18	12

^a Represent the number of isolates showing the profile indicated (percentage of the total in each source category). amp, ampicillin; cip, ciprofloxacin; eri, erythromycin; gen, gentamicin; rif, rifampicin; str, streptomycin; tei, teicoplanin; tet, tetracycline; van, vancomycin; -, none.

Table 3: Frequency of putative virulence genes distributed according to source of the *Enterococcus faecium* isolates

Virulence marker ^a	Source ^b			Total of <i>E. faecium</i> isolates (%)
	Environment <i>n</i> = 10	Colonizer <i>n</i> = 18	Infection <i>n</i> = 12	
<i>cyIA</i>	7 (70)	13 (72.2)	6 (50)	26 (65)
<i>efaA</i>	9 (90)	14 (77.8)	10 (83.3)	33 (82.5)
<i>esp</i>	10 (100)	14 (77.8)	11 (91.7)	35 (87.5)
<i>gelE</i>	3* (30)	15 (83.3)	10 (83.3)	28 (70)

^a *cyIA*: activator of cytolysin, *efaA*: *E. faecalis* antigen A, *esp*: enterococcal surface protein, *gelE*: gelatinase. ^b Represent the number of isolates harboring the gene (percentage of the total in each source category). * Significantly different ($p < 0.01$) when compared to colonizer and infection isolates.

Table 4: *Enterococcus faecium* isolates harboring clusters of virulence genes according to their origin

Virulence markers ^a	Source ^b			Total of <i>E. faecium</i> isolates (%)
	Environment <i>n</i> = 10	Colonizer <i>n</i> = 18	Infection <i>n</i> = 12	
<i>cylA</i> , <i>efaA</i> , <i>esp</i> , <i>gelE</i>	1 (10)	9 (50)	3 (25)	13 (32.5)
<i>cylA</i> , <i>esp</i> , <i>gelE</i>	1 (10)	-	2 (16.7)	3 (7.5)
<i>cylA</i> , <i>efaA</i> , <i>esp</i>	4 (40)	1 (5.6)	1 (8.3)	6 (15)
<i>cylA</i> , <i>gelE</i>	-	3 (16.7)	1 (8.3)	4 (10)
<i>efaA</i> , <i>esp</i> , <i>gelE</i>	1 (10)	2 (11.1)	4 (33.3)	7 (17.5)
<i>efaA</i> , <i>esp</i>	3 (30)	2 (11.1)	1 (8.3)	6 (15)
<i>gelE</i>	-	1 (5.6)	-	1 (2.5)

^a *cylA*: activator of cytolysin, *efaA*: *E. faecalis* antigen A, *esp*: enterococcal surface protein, *gelE*: gelatinase. ^b Represent the number of isolates harboring the gene clusters (percentage of the total in each source category).

5 CONCLUSÕES

- a. A resistência a vancomicina foi comum para todos os isolados de *Enterococcus faecium* e eles apresentaram o gene *vanA*. Esse resultado está de acordo com o fenótipo de resistência aos glicopeptídeos detectado por ensaio de microdiluição em caldo, onde todos os isolados foram resistentes a altos níveis de vancomicina e teicoplanina;
- b. A ocorrência de uma alta frequência de resistência múltipla aos antimicrobianos foi detectada entre esses isolados e este fenótipo foi independente da origem dos mesmos;
- c. A prevalência dos genes de virulência foi a seguinte: *esp* (87,5%), *efaA* (82,5%), *gelE* (70%) e *cylA* (65%);
- d. Todos os isolados apresentaram pelo menos um marcador de virulência e a presença de quatro genes foi observada em 32,5% dos isolados;
- e. A presença do gene *gelE* foi significativamente mais frequente em *E. faecium* isolados de swab retal e de infecção em comparação aos isolados de ambiente;
- f. Foi observada uma associação entre a presença do gene *efaA* com a presença do gene *esp*, independente da origem dos isolados;
- g. Foi observada uma associação positiva entre a presença do gene *cylA* e a atividade hemolítica em ágar-sangue de carneiro;
- h. Nenhuma associação foi observada tanto para o gene *gelE* e a produção de gelatinase no ensaio em placa, bem como para o gene *esp* e a formação de biofilme em superfície de poliestireno.