

Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Evolução da Resistência a Antimicrobianos e  
Caracterização Molecular de *Enterococcus*  
Isolados em Porto Alegre, Rio Grande do Sul**

***JULIANA CAIERÃO***

*Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes*

**Rio de Janeiro**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



# **Evolução da Resistência a Antimicrobianos e Caracterização Molecular de *Enterococcus* Isolados em Porto Alegre, Rio Grande do Sul**

***JULIANA CAIERÃO***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Orientador: Profa. Dra. Lúcia Martins Teixeira

Co-Orientador: Prof. Dr. Pedro Alves d'Azevedo

**Rio de Janeiro**

**2009**

# **Evolução da Resistência a Antimicrobianos e Caracterização Molecular de *Enterococcus* Isolados em Porto Alegre, Rio Grande do Sul**

**Autor: Juliana Caierão**

**Orientador: Lúcia Martins Teixeira**

**Co-Orientador: Pedro Alves d'Azevedo**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Aprovada por:

---

**Presidente, Profa. Lúcia Martins Teixeira**

---

Profa. Vânia Lucia Carreira Merquior

---

Profa. Ana Luíza Guaraldi

---

Profa. Marise Dutra Asensi

---

Prof. Sergio Eduardo Longo Fracalanza

**Rio de Janeiro**

**Mai 2009**

# FICHA CATALOGRÁFICA

Caierão, Juliana

Evolução da Resistência a Antimicrobianos e Caracterização Molecular de *Enterococcus*, Isolados em Porto Alegre, Rio Grande do Sul /Juliana Caierão. - Rio de Janeiro: UFRJ/ IMPPG, 2008.

xiv, 181 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Lúcia Martins Teixeira

Co-Orientador: Pedro Alves d'Azevedo

Tese (doutorado) – UFRJ/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), 2008

Referências Bibliográficas: f. 142 - 181

1. *Enterococcus* 2. Caracterização fenotípica. 3. Caracterização genotípica. 4. Susceptibilidade a antimicrobianos. 5. Epidemiologia molecular. I. Teixeira, Lúcia Martins, d'Azevedo, Pedro Alves. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia). III. Título

**O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Apoio Biotecnológico do Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob a orientação da Profa. Dra. Lúcia Martins Teixeira e no Laboratório de Cocos Gram-positivos da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, sob co-orientação do Prof. Dr. Pedro Alves d’Azevedo**

## AGRADECIMENTOS

---

*Ao final desta importante etapa de minha vida, muitas são as pessoas com as quais quero dividir minha conquista e que merecem meus sinceros agradecimentos.*

*Primeiramente, à **Prof. Dra. Lúcia Martins Teixeira**, exemplo de profissionalismo e competência. Agradeço pela oportunidade de ter sido sua orientanda*

*Ao **Prof. Dr. Pedro Alves d’Azevedo**, que esteve por perto em todos os momentos. Agradeço pelo apoio e todas as palavras de incentivo durante esta caminhada!*

*Ao **Prof. Dr. Cícero Dias**, por todo o conhecimento comigo dividido. Muito obrigada pelos inúmeros testemunhos afirmando o quanto as coisas valem a pena.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (**FAPERJ**), a Financiadora de Estudos e Projetos (**FINEP**), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) e ao Ministério da Ciência e Tecnologia (**MCT/Pronex**), por todo o suporte financeiro para a execução do projeto.*

*À todos os professores e funcionários do IMPPG pela atenção que me foi concedida sempre que precisei.*

*À minha grande amiga **Fabiola Kegele**, sem a qual tudo teria sido infinitamente mais complicado. Amiga, não tenho palavras para agradecer todas as acolhidas, todos os “favores” prestados e, especialmente, todos os momentos agradáveis e inesquecíveis que passamos juntas durante essa jornada.*

*Ao amigo **Felipe Piedade**, por ter sido uma pessoa tão maravilhosa comigo. Agradeço imensamente o auxílio prestado em todos os momentos que precisei, sempre com muito boa-vontade e disposição.*

À **Jaqueline Martins** e **Filomena Rocha**, pessoas essenciais ao laboratório. Muitíssimo obrigada por todo o apoio técnico e pela acolhida. Tenho uma enorme gratidão pela participação de vocês neste trabalho.

À **Camile Moura**, **Giseli da Silva da Costa** e **Felipe Cruz**, pela convivência sempre tão agradável e descontraída no laboratório. Com certeza, levo comigo muitas histórias desses momentos. Vocês são pessoas muito especiais. Desejo todo o sucesso do mundo nas suas caminhadas!

Ao **Rafael Silva Duarte**, pelo exemplo de dedicação e caráter. Rafa, agradeço a Deus a oportunidade de ter conhecido você e ter dividido tantos momentos importantes contigo.

À **Maria Beatriz Cirne Lima**, pessoa única, que me garantiu todas as condições técnicas para o desenvolvimento dos experimentos. Tiza, muito obrigada por tudo, durante todos esses 4 anos e mais alguns anteriores...À **Rosângela** e **Sandra**, também pessoas insubstituíveis no laboratório e durante essa caminhada.

À **Letícia Ganassini**, pessoa metódica, detalhista e muito determinada. Lê, só tenho a agradecer por todo o teu auxílio e dedicação a esse trabalho. Te desejo toda a sorte do mundo e muito sucesso, pois você merece o melhor.

À **Carina Secchi**, **Ana Lúcia Antunes** e **Leandro Réus Perez**, pela troca de experiências que sempre me acrescentou tanto. E pela convivência tão agradável no laboratório.

Às minhas queridas “colegas” **Daniela Martins**, **Fabiana Soares** e **Táisa Prochnow**, porque sem a compreensão e apoio delas, esse trabalho não teria sido concluído. Gurias, muito obrigada pelos “galhos” quebrados e, principalmente, pela paciência com minhas ansiedades e “loucuras” durante esse período. Jamais esquecerei as palavras de incentivo que recebi de vocês!

À chefe e amiga **Silvana Superti**. Agradeço por tudo o que me ensinou e por acreditar em mim, mesmo quando eu mesma desacreditei! Sou muito grata às condições que você me deu para que eu finalizasse esta etapa.

Ao meu noivo **Ricardo Benvenuti**, por ter sido uma pessoa tão importante em minha vida nesses dois últimos anos. Meu amor, muito obrigada pelos



*conselhos incrivelmente práticos e objetivos, os quais me moviam nos momentos em que me sentia paralisada. Obrigada por ter sido uma presença constante e leve nesse período de tão pouco tempo livre; com muito trabalho e ansiedades. É muito bom dividir essa conquista contigo!*

*Aos meus irmãos **Eduardo** e **Fernando**, por serem pessoas tão importantes em minha vida. É muito bom saber que tenho vocês por perto, mesmo que a distância nos separe. Amo e admiro vocês!*

*Por fim, agradeço e dedico este trabalho aos meus pais, **João Batista** e **Iara**. Pai, não tenho palavras para descrever toda a gratidão que sinto por tudo o que você fez por mim nessa conquista. Todas as suas palavras de incentivo estão guardadas com muito carinho em meu coração e foram, com certeza, importantíssimas nos momentos de cansaço. Mas, “depois de cansado, o ser humano ainda vai muito longe”, não é? Mãe, sou eternamente grata a você por essa conquista e você sabe que ela também é sua!!!! Muito obrigada por ser um exemplo de dedicação, garra e obstinação. Tenho muito orgulho de ser sua filha!*

## RESUMO

---

### **Evolução da Resistência a Antimicrobianos e Caracterização Molecular de *Enterococcus* Isolados em Porto Alegre, Rio Grande do Sul**

Autor: Juliana Caierão

Orientador: Lúcia Martins Teixeira

Co-Orientador: Pedro Alves d'Azevedo

Resumo da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Algumas espécies do gênero *Enterococcus* passaram a ser consideradas como importantes causas de infecções hospitalares. A resistência adquirida a antimicrobianos, sobretudo a vancomicina e a níveis elevados de aminoglicosídeos, representa uma das principais características que contribuíram para o destaque dos enterococos entre os patógenos nosocomiais. Nesse sentido, e considerando a escassez de dados sobre epidemiologia dos *Enterococcus* na região Sul do Brasil, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar fenotipicamente e genotipicamente uma coleção de 637 amostras isoladas de sítios clinicamente significantes e de amostras de vigilância. Essas amostras foram coletadas entre janeiro de 1999 e dezembro de 2004 de pacientes internados no Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre (CHSCPA). Tais amostras foram identificadas, através de testes fenotípicos convencionais, como: *E. faecalis* (594 amostras), *E. faecium* (20 amostras), *E. gallinarum* (17 amostras), *E. casseliflavus* (4 amostras), *E. durans* (1 amostra) e *E. hirae* (1 amostra). Os *Enterococcus* foram submetidos a testes de susceptibilidade, utilizando-se disco-difusão e, quando pertinente, teste de triagem em agar e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os seguintes percentuais de amostras resistentes foram observados: 41,9% para ciprofloxacina, 35,8% para cloranfenicol, 52,1% para eritromicina, 0,9% para nitrofurantoína, 36,7% para norfloxacina e 59,2% para tetraciclina. Não foi detectada resistência a linezolida e a quinupristin/dalfopristin. De acordo com resultados da triagem em agar, 0,5% das amostras foram resistentes à ampicilina, 17,1% a níveis elevados de estreptomicina, 30,3% a níveis elevados de gentamicina e 9,4% foram resistentes à vancomicina (CIM > 256µg/mL). Com relação à caracterização genotípica, a resistência aos macrolídeos foi basicamente relacionada ao gene *erm*(B), exceto por três amostras de *E. faecium*, as quais carregavam o gene *erm*(A). A resistência a tetraciclina esteve basicamente relacionada à presença do gene *tet*(M), seguido pelo gene *tet*(L). Em relação à resistência a níveis elevados de gentamicina (HLR-Ge), o gene *aac*(6')-Ie-aph(2'')-Ia esteve presente em todas as amostras, sendo

que em três, houve uma associação com o gene *aph(3')-IIIa*. Por sua vez, a resistência plena a vancomicina relacionou-se à presença do gene *vanA*, à exceção de uma amostra apresentando o gene *vanB*. A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico após restrição com *SmaI* do sub-grupo de amostras apresentando HLR-Ge, associada a um fenótipo de multirresistência, demonstrou a presença de dois clones principais ( $G_A$  e  $G_B$ ), dos quais um ( $G_A$ ) esteve presente nas instituições avaliadas durante todo o período, mostrando-se altamente adaptado ao ambiente hospitalar. Dentre os *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE), dois clones principais foram caracterizados ( $V_A$  e  $V_B$ ), através de PFGE, sendo que o clone predominante ( $V_A$ ) foi recuperado a partir de 2000 até o final do trabalho e esteve distribuído por praticamente todos os sete hospitais que formam o CHSCPA. Amostras dos clones principais de HLR-Ge e VRE ( $V_A$  and  $G_A$ ) apresentaram um coeficiente de similaridade genética de 75%, sugerindo que a aquisição de resistência a níveis elevados de gentamicina poderia ser um evento prévio ao surgimento de resistência à vancomicina. Nossos resultados contribuem para um melhor entendimento da epidemiologia molecular de *Enterococcus* circulantes na região Sul do Brasil e, conseqüentemente, auxiliam na implantação de medidas de controle de infecção mais efetivas e baratas nas instituições avaliadas.

Palavras-chave: *Enterococcus*, caracterização fenotípica, caracterização genotípica, susceptibilidade a antimicrobianos, epidemiologia molecular.

**Rio de Janeiro**

**Mai 2009**

## ABSTRACT

---

### **Evolution of Resistance to Antimicrobials and Molecular Characterization of *Enterococcus* Isolated in Porto Alegre, Rio Grande do Sul**

Author: Juliana Caierão

Advisor: Lúcia Martins Teixeira

Co-Advisor: Pedro Alves d'Azevedo

Abstract of the Dissertation presented to the Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), as part of the requirements to receive the degree of Doctor in Sciences (Microbiology).

Some species of the genus *Enterococcus* have been considered as important causes of hospital infections. Acquired resistance to antimicrobial agents, specially vancomycin and high-level aminoglycosides, is one of the major characteristics that contributed to the recognition of *Enterococcus* among the most significant nosocomial pathogens. In this context and considering that limited data are available about *Enterococcus* epidemiology in the South region of Brazil, the aim of the present study was to characterize, phenotypically and genotypically, a collection of 637 strains isolated from clinically relevant sites and from surveillance cultures. These isolates were recovered between January 1999 and December 2004 from inpatients at the Santa Casa Hospital Complex of Porto Alegre (SCHCPA). The isolates were identified, by using conventional phenotypic tests, as: *E. faecalis* (594 isolates), *E. faecium* (20 isolates), *E. gallinarum* (17 isolates), *E. casseliflavus* (4 isolates), *E. durans* (1 isolate) and *E. hirae* (1 isolate). The isolates were submitted to antimicrobial susceptibility tests, by using disk-difusion and, when pertinent, agar screening test and determination of Minima Inhibitory Concentration (MIC). The follow percentages of resistant isolates were observed: 41.9% for ciprofloxacin, 35.8% for chloramphenicol, 52.1% for erythromycin, 0.9% for nitrofurantoin, 36.7% for norfloxacin and 59.2% for tetracycline. Resistance to linezolid and quinupristin/dalfopristin was not detected. According to results of agar screening, 0.5% of isolates were resistant to ampicillin, 17.1% to high-level streptomycin, 30.3% to high-level gentamicin and 9.4% were resistant to vancomycin (MIC > 256µg/mL). Resistance to macrolide was basically related to *erm(B)* gene, except for three *E. faecium* isolates which carried the *erm(A)* gene. Resistance to tetracycline was basically associated to the presence of *tet(M)* gene, followed by the *tet(L)* gene. Considering the resistance to high-levels of gentamicin (HLR-Ge), the *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* gene was detected in all isolates, and, in three, an association of this gene with the *aph(3')-IIIa* was found.

Resistance to vancomycin was related to the presence of the *vanA* gene, except for one isolate presenting *vanB* gen. The analysis of chromossomic DNA fragmentation profiles after restriction with *SmaI* of the sub-group of isolates presenting HLR-Ge, associated with a multiresistance phenotype, demonstrated the presence of two major clones ( $G_A$  and  $G_B$ ). One of them ( $G_A$ ) was present in the institutions investigated during the whole period of this study, indicating that this clone is adapted to hospital environment. Among vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE), two major clones were characterized ( $V_A$  e  $V_B$ ). The predominant clone ( $V_A$ ) was recovered since 1999 until the end of this work and it was distributed in practically all seven hospitals which are part of the SCHCPA. Isolates belonging to the major clones of HLR-Ge and VRE ( $V_A$  and  $G_A$ ) presented a genetic similarity coefficient of 75%, suggesting that the acquisition of HLR-Ge could be a previous event to the emergence of vancomycin resistance. Our results contribute to the knowledge of molecular epidemiology of *Enterococcus* circulating in the South region of Brazil and, consequently, can be usefull to guide the implementation of more effective and cheaper infection control measures.

Key words: *Enterococcus*, phenotypic characterization, genotypic characterization, antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology.

**Rio de Janeiro**

**May 2009**

# SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b>	ix
<b>ABSTRACT</b>	xi
<b>INTRODUÇÃO</b>	1
<b>OBJETIVOS</b>	35
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	37
1. Amostras Bacterianas	37
2. Identificação Fenotípica das Amostras Bacterianas	38
2.1. Estudo da Morfologia Colonial	39
2.2. Produção da Enzima Catalase	39
2.3. Hidrólise da Esculina na Presença de Sais Biliares a 40%	40
2.4. Crescimento na Presença de 6,5% de Cloreto de Sódio (NaCl)	40
2.5. Hidrólise de L-leucina- $\beta$ -naftilamida (LAP) e de L-pirrolidonil- $\beta$ -naftilamida (PYR)	40
2.6. Produção de Pigmento	41
2.7. Motilidade	41
2.8. Hidrólise da Arginina	41
2.9. Produção de Ácidos a partir de Carboidratos	42
2.10. Utilização do Piruvato	42
3. Caracterização Fisiológica Através de Sistema Automatizado	43
4. Testes de Susceptibilidade aos Antimicrobianos	43
4.1. Técnica de Disco-Difusão	43
4.2. Teste de Triagem para a Detecção de Resistência a Vancomicina e Resistência a Níveis Elevados de Aminoglicosídeos e Ampicilina	44
4.3. Técnica de Difusão em Gradiente Contínuo para Determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias	46
4.4. Determinação da Produção de $\beta$ -Lactamase	47
5. Caracterização Genotípica de Resistência aos Antimicrobianos	47

5.1.	Detecção de Genes de Resistência à Vancomicina	47
5.1.1.	Extração do DNA	48
5.1.2.	PCR	48
5.2.	Detecção dos Genes de Resistência à Eritromicina	49
5.2.1	Extração do DNA	49
5.2.2.	PCR	49
5.3.	Detecção dos Genes de Resistência a Níveis Elevados de Aminoglicosídeos	50
5.3.1.	Extração do DNA	50
5.3.2.	PCR	50
5.4.	Detecção dos Genes de Resistência à Tetraciclina	52
5.4.1.	Extração do DNA	52
5.4.2.	PCR	52
5.5.	Eletroforese e Análise dos Produtos Amplificados	53
6.	Análise dos Perfis de Fragmentação do DNA Cromossômico Através da Eletroforese em Campo Pulsado	53
	<b>RESULTADOS</b>	56
	<b>DISCUSSÃO</b>	101
	<b>CONCLUSÕES</b>	139
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	142

## INTRODUÇÃO

---

Enterococos foram inicialmente descritos como “estreptococos de origem fecal” e fizeram parte, até algumas décadas atrás, do gênero *Streptococcus* (MURRAY, 1990). Entretanto, evidências genéticas demonstraram que esses microrganismos eram suficientemente diferentes dos demais membros do gênero *Streptococcus*, o que levou à criação do gênero *Enterococcus*, em 1984, por Schleifer e Klipper-Balz. A partir de então, as espécies de enterococos já conhecidas foram transferidas para o novo gênero e novas espécies foram sendo descritas, e adicionadas a uma longa lista de espécies que atualmente compõe o gênero *Enterococcus* (SUKONTASING *et al.*, 2007; TEIXEIRA, CARVALHO & FACKLAM, 2007; CARVALHO *et al.*, 2008; TANASUPAWAT, SUKONTASING & LEE, 2008).

Os microrganismos do gênero *Enterococcus* são cocos Gram-positivos, arranjados aos pares ou em cadeias curtas, não produtores da enzima catalase e capazes de hidrolizar a esculina na presença de sais biliares. Produzem a enzima leucina aminopeptidase (LAP) e a maioria das espécies (excetuando-se *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. pallens* e *E. saccharolyticus*) produz a enzima pirrolidonil arilamidase (PYR). A maioria das cepas possui um antígeno de ácido teicóico associado à parede celular, o antígeno do grupo D de Lancefield (FACKLAM, CARVALHO & TEIXEIRA, 2002). Em geral, as cepas são homofermentativas, sendo o ácido láctico o produto final da fermentação da glicose.



São anaeróbios facultativos e apresentam uma temperatura ótima de crescimento de 35°C; entretanto, possuem capacidade de crescer em uma faixa entre 10°C e 45°C e sobreviver a 60°C por 30 minutos. Crescem em meios com pH 9,6 e na presença de cloreto de sódio a 6,5% (FACKLAM & TEIXEIRA, 1998; TEIXEIRA, CARVALHO & FACKLAM, 2007).

A associação dessas características fisiológicas justifica o caráter ubiqüitário dos *Enterococcus*, os quais estão amplamente distribuídos no meio ambiente, podendo ser facilmente encontrados no solo, em plantas e na água (AARESTRUP *et al.*, 2002). No ambiente hospitalar, podem sobreviver em superfícies por várias semanas (FALK *et al.*, 2000). Além disso, são encontrados como contaminantes de alimentos, podendo servir como indicador sanitário da qualidade. Por outro lado, possuem papel importante e benéfico na fermentação de vários alimentos, principalmente na indústria de laticínios (GIRAFFA, 2002).

Em seres humanos e em animais, esses microrganismos são parte da microbiota do trato gastrintestinal, cavidade oral e trato geniturinário (AARESTRUP *et al.*, 2002), sendo os cocos Gram-positivos mais comumente encontrados na flora intestinal e no trato genital feminino de humanos e animais (MASCINI & BOTEN, 2005).

Por outro lado, a partir de meados da década de 70, algumas espécies do gênero passaram a ser reconhecidas como importantes causas de infecções oportunistas no ambiente hospitalar, comentando, predominantemente, pacientes

com imunodeficiências, seja esta relacionada à presença de doença de base ou à terapia imunossupressora; pacientes idosos; pacientes com injúrias nas barreiras normais de defesa ou hospitalizados por longos períodos (KURUP *et al.*, 2008).

O reconhecimento dos enterococos entre os principais agentes oportunistas foi coincidente, e provavelmente relacionado, ao aumento no uso de antimicrobianos de amplo espectro, tais como as cefalosporinas de terceira geração, às quais *Enterococcus* são intrinsecamente resistentes. Essa característica os torna, portanto, mais bem adaptados ao ambiente nosocomial em relação a outros gêneros de microrganismos susceptíveis aos antimicrobianos com utilização amplamente difundida (HANCOCK & GILMORE, 2000; MALANI *et al.*, 2002).

*Enterococcus* são a segunda causa de bacteremias nos Estados Unidos. As bacteremias enterocócicas são, em geral, graves e associadas a índices de mortalidade que variam entre 23 e 46% (GILMORE *et al.*, 2002). No Brasil, esses índices parecem ser menores, chegando próximo a 10%, dependendo da população estudada (COUTO *et al.*, 2007; RIBAS *et al.*, 2007). Uma das complicações mais significativas desses quadros são as endocardites infecciosas, as quais acometem entre 8 e 32% dos pacientes (ANDERSON *et al.*, 2004).

Historicamente, *Enterococcus* têm sido reconhecidos como importantes causas de endocardites infecciosas, sendo o terceiro agente etiológico mais comumente relacionado, responsável por 5 a 20% de todos os casos

(ANDERSON *et al.*, 2004; HILL *et al.*, 2007). Esses microrganismos acometem, preferencialmente, válvulas nativas, onde cerca de 20% das endocardites são enterocócicas (HANCOCK & GILMORE, 2000; HILL *et al.*, 2007). Em processos infecciosos de válvulas protéticas, a participação dos *Enterococcus* é menos freqüente, acometendo cerca de 8% dos pacientes (ANDERSON *et al.*, 2005), embora alguns estudos demonstrem a participação de espécies desse gênero em 20% dos processos infecciosos de válvula protética (HILL *et al.*, 2007). Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento, o índice de mortalidade devido a endocardites enterocócicas não teve alterações significativas nos últimos anos (HILL *et al.*, 2007).

Estudos de vigilância demonstram, ainda, que *Enterococcus* são uma importante causa de infecções de feridas operatórias, as quais são, freqüentemente, polimicrobianas (GILMORE *et al.*, 2002; DERVISOGLOU *et al.*, 2006). Além disso, esses microrganismos são importantes patógenos urinários. A incidência de Infecções do Trato Urinário (ITU) causadas por espécies de *Enterococcus* varia entre 4 e 17%, dependendo da origem da infecção (nosocomial ou comunitária) e das características dos pacientes avaliados (RAVEH *et al.*, 2006; LAUPLAND *et al.*, 2007; KO, *et al.*, 2008; LYEROVÁ *et al.*, 2008). Em um estudo realizado com 4400 pacientes apresentando infecções urinárias não-complicadas, recrutados em centros do Brasil e da Europa, os *Enterococcus* foram isolados em 4% dos casos (NABER *et al.*, 2008). Em outro estudo, desenvolvido com pacientes de centros médicos da América Latina participantes do programa SENTRY, cerca de 6% das infecções urinárias

complicadas foram causadas por espécies do gênero *Enterococcus* (ANDRADE *et al.*, 2006).

Infecções enterocócicas do trato respiratório (UMGELTER *et al.*, 2007) ou do sistema nervoso central (IARIA *et al.*, 2005; da SILVA, MONTEIRO NETO & SEJAS, 2007; JONES *et al.*, 2007), assim como otites (GUVEN *et al.*, 2006), artrites sépticas (MURAO *et al.*, 1997) e endoftalmites (HIGASHIDE *et al.*, 2005) podem ocorrer, mas são raras.

As espécies mais freqüentemente isoladas de infecções humanas são *E. faecalis* (aproximadamente 90%) e *E. faecium* (5-10%). Entretanto, estudos mais recentes sugerem que a proporção de infecções causada por *E. faecium* tem aumentado (BHAVNANI *et al.*, 2000). Além disso, embora menos freqüentes, ou mesmo raras, diversas outras espécies, tais como *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. mundtii*, entre outras, têm sido isoladas de fontes humanas (TYRRELL *et al.*, 2002; MONDINO *et al.*, 2003; HIGASHIDE *et al.*, 2005; IARIA *et al.*, 2005; GUVEN *et al.*, 2006; JONES *et al.*, 2007; MURAO *et al.*, 2007; MERQUIOR *et al.*, 2008). O aumento na descrição de ocorrência de espécies mais raras parece estar relacionado não só a um maior comprometimento do estado geral dos pacientes, tornando-os mais susceptíveis à infecções oportunistas, mas também a avanços nas metodologias de identificação, permitindo uma maior discriminação (KURUP *et al.*, 2008).

Nesse contexto, a identificação das espécies de *Enterococcus* se torna clinicamente importante, uma vez que, além de existirem diferenças em relação ao potencial patogênico e a importância epidemiológica de cada uma, o comportamento frente aos agentes antimicrobianos também apresenta características espécie-específicas (MORRISON, WOODFORD & COOKSON, 1997; DOMIG *et al.*, 2003).

O gênero é subdividido em 5 grupos de espécies, que compartilham características fisiológicas úteis para sua classificação (**Tabelas 1 e 2**). A divisão dos grupos é baseada na formação de ácido em meios contendo manitol e sorbose e na hidrólise da arginina. Esse agrupamento baseado em testes fenotípicos não necessariamente corresponde ao agrupamento de espécies por métodos moleculares, como, por exemplo, o seqüenciamento dos genes que codificam a porção 16S do RNA ribossomal (rRNA) (FACKLAM, CARVALHO & TEIXEIRA, 2002). Entretanto, para laboratórios clínicos, os quais, em sua maioria, utilizam métodos fenotípicos para identificação das espécies do gênero, essa subdivisão pode ser de grande valia.

A identificação fisiológica baseia-se, inicialmente, em provas bioquímicas convencionais, as quais, em geral, não são muito rápidas, podendo requerer a incubação por mais de 10 dias. Tais provas incluem: observação da motilidade, produção de pigmento, utilização do piruvato, tolerância ao telurito a 0,04%, descarboxilação da arginina e fermentação de carboidratos [arabinose, manitol, metil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo (MGP), sacarose, sorbitol, sorbose e rafinose]. Podem

ser utilizados também o teste de hidrólise do hipurato e os de fermentação da xilose e trealose (TEIXEIRA, CARVALHO & FACKLAM, 2007).

Embora essa abordagem de identificação seja válida para a maioria das espécies mais comuns, para algumas espécies mais raras ou para aquelas mais recentemente descritas, elas podem não trazer resultados conclusivos. Além disso, o reconhecimento de variantes fenotípicas de *E. faecium* (TEIXEIRA *et al.*, 1995), *E. faecalis*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* (TEIXEIRA *et al.*, 1997a) e de espécies fisiologicamente relacionadas de *Vagococcus* e *Lactococcus* isoladas de seres humanos tornou necessário expandir o esquema de identificação das mesmas (FACKLAM, CARVALHO & TEIXEIRA, 2002; TEIXEIRA, CARVALHO & FACKLAM, 2007).

Nesse sentido, a aplicação de técnicas moleculares contribuiu de forma significativa para a identificação precisa das diversas espécies de *Enterococcus*, inclusive daquelas amostras apresentando atípicas. A técnica de reassociação DNA-DNA, considerada padrão-ouro para a caracterização de espécies, e o seqüenciamento do gene 16S rRNA têm sido primariamente utilizadas para fins taxonômicos em poucos laboratórios (FACKLAM, CARVALHO & TEIXEIRA, 2002).

Dentre as demais técnicas, é importante ressaltar a de análise dos perfis eletroforéticos das proteínas totais da célula (*Whole Cellular Proteins* – WCP) em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate*-

*Poliacrylamide Gel Electrophoresis* - SDS-PAGE) como ferramenta bastante confiável e de relativamente simples execução para a caracterização das espécies deste gênero (MERQUIOR *et al.*, 1994; TEIXEIRA *et al.*, 1995; TEIXEIRA *et al.*, 1997b), uma vez que os perfis de WCP dos membros desse gênero são espécie-específicos. Além disso, foi demonstrado que cepas atípicas de *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* têm o mesmo perfil de WCP das cepas típicas e que os perfis de WCP das espécies pertencentes a gêneros intimamente relacionados como *Lactococcus* e *Vagococcus* são também singulares e distintos daqueles observados nas espécies de *Enterococcus* (TEIXEIRA *et al.*, 1995).

Entre os demais métodos moleculares, somente poucos têm sido empregados em mais de um laboratório ou já foram avaliados para a maioria das espécies de *Enterococcus* (TEIXEIRA, CARVALHO & FACKLAM, 2007).

Uma das principais razões pelas quais os *Enterococcus* são tão bem adaptados ao ambiente hospitalar é sua resistência intrínseca a muitos dos antimicrobianos utilizados habitualmente no tratamento de infecções por cocos Gram-positivos, tais como cefalosporinas, lincosaminas, co-trimoxazol e baixos níveis de  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos (KAK & CHOW, 2002).

Além dessa característica inerente ao gênero, enterococos apresentam uma extraordinária capacidade de adquirir elementos genéticos móveis, carreando genes de resistência a muitos outros antimicrobianos, incluindo cloranfenicol,

tetraciclina, macrolídeos, estreptograminas, níveis elevados de aminoglicosídeos e glicopeptídeos (MURRAY, 1990; LECLERCQ, 1992; FACKLAM & TEIXEIRA, 1998; ZARRILLI *et al.*, 2005; CHRISTIANSEN *et al.*, 2007), o que leva a dificuldades no tratamento de infecções enterocócicas. Tais complicações terapêuticas foram reconhecidas desde o início da década de 50 e, atualmente, a emergência e disseminação de cepas multirresistentes é bem documentada (LEAVIS *et al.*, 2006), representando um desafio para médicos e equipes de controle de infecção hospitalar. Nesse sentido, a espécie *E. faecium* tem despertado maior interesse devido às características peculiares de resistência aos antimicrobianos (PAPAPARASKEVAS *et al.*, 2000; MALANI, KAUFFMAN & ZERVOS, 2002; ZANELLA *et al.*, 2003; BUSANI *et al.*, 2004).

A resistência plena ou relativa aos  $\beta$ -lactâmicos é uma característica do gênero *Enterococcus*. *E. faecalis* é, tipicamente, cerca de 10 a 100 vezes menos susceptível à penicilina em comparação à maioria dos *Streptococcus*, enquanto que *E. faecium* é, pelo menos, de 4 a 16 vezes menos susceptível do que *E. faecalis* (MURRAY, 1990; MALANI, KAUFFMAN & ZERVOS, 2002). O principal mecanismo responsável por essa resistência é a produção de Proteínas Ligadoras de Penicilinas (*Penicillin Binding Proteins* – PBPs) com baixa afinidade pelos  $\beta$ -lactâmicos ou a presença de mutações que diminuem ainda mais a afinidade das PBPs constitutivas pelo antimicrobiano. *Enterococcus* apresentam, pelo menos, 5 PBPs, sendo que a hiperprodução da PBP5 confere resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos (KAK & CHOW, 2002).



Em relação às mutações, sabe-se que aquelas ocorridas no sítio ativo da PBP5 também estão associadas ao aumento da resistência à penicilina, mesmo não havendo superprodução da mesma (LIGOZZI, PITTALUGA & FONTANA, 1996; RYBKINE *et al.*, 1998).

Esse fenótipo de resistência também pode estar relacionado, mesmo que raramente, à produção de  $\beta$ -lactamases (JESUDASON *et al.*, 1998). Algumas cepas de *E. faecium* produzem uma  $\beta$ -lactamase que é idêntica à  $\beta$ -lactamase tipo A dos *Staphylococcus*. Entretanto, em *Enterococcus* a produção da enzima é constitutiva e codificada por um gene localizado em um plasmídeo transferível juntamente com genes mediadores da resistência a níveis elevados de gentamicina (MARKOWITZ *et al.*, 1991; MURRAY *et al.*, 1992, ZSCHECK & MURRAY, 1993). Esse mecanismo de resistência parece não ter tido uma disseminação tão intensa no gênero *Enterococcus*. No Brasil, amostras produtoras de  $\beta$ -lactamase não têm sido caracterizadas (STERN, CARVALHO E TEIXEIRA, 1994; CEREDA *et al.*, 1997; MENDONÇA, 1998; d'AZEVEDO, 2001; MONDINO *et al.*, 2003).

Outra dificuldade enfrentada ao se tratar infecções enterocócicas com agentes  $\beta$ -lactâmicos é o desenvolvimento de tolerância. Nesses casos, o efeito bactericida dos  $\beta$ -lactâmicos deixa de ocorrer, sendo capazes, apenas, de inibir o crescimento dos *Enterococcus*. Esta é uma característica adquirida que surge rapidamente, podendo ser observada na quinta dose de penicilina. Essa tolerância

justifica a não utilização dos  $\beta$ -lactâmicos em monoterapia para o tratamento de infecções enterocócicas graves, associando-os a aminoglicosídeos para atingir um efeito sinérgico (MURRAY, 2000).

Os aminoglicosídeos atuam, primariamente, interferindo na síntese protéica, através da ligação com o rRNA 16S da subunidade 30S do ribossoma bacteriano. A resistência intrínseca a baixos níveis dessa classe de antimicrobianos observada entre os enterococos é decorrente de uma diminuição na permeabilidade, por um transporte ativo ineficiente através da membrana citoplasmática. As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) de gentamicina para *Enterococcus*, tipicamente, variam de 6 a 64  $\mu\text{g/mL}$ , não sendo esse antimicrobiano efetivo em monoterapia para o tratamento de infecções enterocócicas. Nesses casos, a associação do aminoglicosídeo com um antimicrobiano que atue interferindo na formação da parede celular resulta em um efeito sinérgico bactericida (KAK & CHOW, 2002).

Entretanto, isolados de *Enterococcus* exibindo resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (*High-Level Resistance to Aminoglycoside* - HLR-A), inicialmente descritos na década de 80, têm sido observados com freqüência crescente no Brasil e no mundo (MERQUIOR *et al.*, 1997; MONDINO *et al.*, 2003; MASCHIETO *et al.*, 2004; QUIÑONES *et al.*, 2005; d'AZEVEDO, DIAS & TEIXEIRA, 2006; ABBASSI, ACHOUR & HASSEN, 2007; CHRISTIANSEN *et al.*, 2007).

Essa resistência adquirida é resultado, em geral, da inativação enzimática através da produção de Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos (EMAs), codificadas por genes localizados em plasmídeos transferíveis e em transposons, podendo conferir resistência a poucos ou a todos os representantes da classe (SADER *et al.*, 2004; QUIÑONES *et al.*, 2005; ZARRILI *et al.*, 2005; CHRISTIANSEN *et al.*, 2007; BILLSTRÖM *et al.*, 2008). Quando essas enzimas são expressas, a CIM dos aminoglicosídeos pode chegar a 2000 µg/mL ou mais (KAK & CHOW, 2002).

Basicamente, as EMAs podem ser fosfotransferases (APHs), nucleotidiltransferases (ANTs) ou acetiltransferases (AACs), sendo que não é incomum a caracterização de isolados clínicos carreando mais de um gene associado à produção dessas enzimas (KAK & CHOW, 2002).

O gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* codifica uma enzima bifuncional, a AAC(6')-APH(2''), que apresenta tanto a atividade de acetilação quanto a de fosforilação. Possivelmente, esse gene resultou da fusão de dois genes ancestrais e caracteriza a resistência a um amplo espectro de aminoglicosídeos, incluindo gentamicina, tobramicina, amicacina, canamicina, netilmicina e dibecacina. Além dos *Enterococcus*, esse gene já foi detectado em *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e em diferentes espécies de *Streptococcus*. Mais de 90% dos isolados clínicos de enterococos que apresentam resistência à níveis elevados de gentamicina (*High-Level Resistance to Gentamicin*, HLR-Ge) carregam esse gene (PAPAPARASKEVAS *et al.*, 2000; DAIKOS *et al.*, 2003;

SAEEDI *et al.*, 2004; ZARRILLI *et al.*, 2005; QU *et al.*, 2006; ABBASSI, ACHOUR & HASSEN, 2007).

O gene *aph(2'')*-*lc* codifica uma fosfotransferase relacionada à resistência clínica à gentamicina, tobramicina, canamicina e dibecacina, mas não à amicacina ou netilmicina. Esse gene foi inicialmente observado em plasmídeos conjugativos de *E. gallinarum*, mas, desde então, já foi detectado em *E. faecalis* e em *E. faecium*, especialmente em isolados de origem animal. Na presença do gene, as CIMs de gentamicina variam entre 256 a 384 µg/mL. Apesar de as CIMs serem consideravelmente menores em relação às aquelas relacionadas à presença do gene *aac(6')-Ie-aph(2'')*-*Ia*, *Enterococcus* portadores de *aph(2'')*-*lc* são clinicamente resistentes ao sinergismo gentamicina-ampicilina (KAK & CHOW, 2002). Por sua vez, a fosfotransferase codificada pelo gene *aph(2'')*-*ld* confere resistência à gentamicina, tobramicina, canamicina, netilmicina e dibecacina. Esse gene foi inicialmente caracterizado em um isolado de *E. casseliflavus*, mas todas as subseqüentes detecções foram em isolados de *E. faecium* resistentes à vancomicina. Da mesma forma, o gene *aph(2'')*-*lb*, o qual confere resistência à gentamicina, tobramicina, canamicina, netilmicina e dibecacina, somente tem sido detectado em *E. faecium* resistentes à vancomicina (KAK & CHOW, 2002).

Outro gene relacionado à resistência aos aminoglicosídeos é o *aph(3')-IIIa*, que caracteriza a resistência a níveis elevados de canamicina e impede o sinergismo ampicilina-amicacina, apesar de mediar CIMs de amicacina entre 64 a 256 µg/mL, similar ao gene *ant(4')-Ia*. Este último é bem menos prevalente em

isolados clínicos e confere, também, resistência à tobramicina, canamicina e dibecacina (KAK & CHOW, 2002).

Ao contrário dos demais aminoglicosídeos, a resistência à níveis elevados de estreptomicina (*High-Level Resistance to Streptomycin*, HLR-St) pode estar relacionada a alterações na subunidade ribossomal 30S, resultando em menor ligação do antimicrobiano com o sítio-alvo. Em isolados de *E. faecalis* apresentando tal mecanismo de resistência, a CIM de estreptomicina é em torno de 128.000 µg/mL. Níveis elevados de resistência à estreptomicina também podem estar relacionados à presença de nucleotidiltransferases codificadas pelos genes *ant(6)-Ia* e *ant(3'')-Ia*, sendo que, nesses casos, as CIMs de estreptomicina variam de 4.000 a 16.000 µg/mL (KAK & CHOW, 2002).

Avanços significativos no conhecimento sobre os mecanismos de resistência simultânea aos antimicrobianos do grupo MLS<sub>B</sub> (Macrolídeos-Lincosaminas-Estreptogramina B) e de seus determinantes genéticos foram obtidos nos últimos anos. O principal mecanismo de resistência aos macrolídeos, entre os enterococos, está relacionado à alteração do sítio de ligação, caracterizada pela metilação de um resíduo de adenina no rRNA 23S da subunidade 50S do ribossoma bacteriano. Essa alteração resulta na diminuição da ligação ao ribossoma, não somente dos macrolídeos, mas também das lincosaminas e estreptograminas (WEISBLUM, 1995), conferindo o fenótipo MLS<sub>B</sub>. Geneticamente, são vários os genes (*erm*) que codificam essas metilaseses, sendo que, no gênero *Enterococcus*, esse mecanismo está relacionado, em geral,

à presença do gene *erm(B)*, e, raramente, do gene *erm(A)* (DE LEENER *et al.*, 2004; QUIÑONES *et al.*, 2005; KLIBI *et al.*, 2006; BORBONE *et al.*, 2008).

Por sua vez, o gene *mef(A)* codifica uma proteína de efluxo, ativa contra macrolídeos, mas não contra lincosaminas e estreptograminas B (TAIT-KAMRADT *et al.*, 1997). Esse gene parece estar localizado num elemento conjugativo e medeia níveis de resistência à eritromicina mais baixos do que aqueles mediados pelo gene *erm(B)* (LUNA *et al.*, 1999). Um terceiro gene, *msr(A)*, confere resistência a macrolídeos e estreptograminas B através da codificação de uma proteína transportadora associada ao ATP e tem sido detectado em isolados clínicos de *E. faecium* (ROBERTS *et al.*, 1999).

Embora macrolídeos e lincosaminas não sejam utilizados, rotineiramente, no tratamento de infecções enterocócicas, a combinação das estreptograminas quinupristina (estreptogramina B) e dalfopristina (estreptogramina A) tem sido opção em casos de infecções por *E. faecium* multirresistentes. Esses dois compostos agem sinergicamente, uma vez que a estreptogramina A se liga ao ribossoma bacteriano, levando a alterações conformacionais que aumentam a afinidade da estreptogramina B pelo seu sítio-alvo, na subunidade 50S do RNA ribossomal, tendo como efeito final a inibição da síntese protéica (KAK & CHOW, 2002).

Virtualmente todos os isolados de *E. faecalis* são intrinsecamente resistentes à estreptogramina A, tornando ineficaz a combinação

quinupristina/dalfopristina. Por outro lado, a resistência em *E. faecium* pode ser devida à presença de um único gene que caracteriza resistência à estreptogramina A ou à presença combinada de genes que codificam resistência para ambos os compostos (SOLTANI *et al.*, 2000). O gene *vat(D)* codifica uma seqüência de aminoácidos que é intimamente relacionada com acetiltransferases e medeia a resistência à estreptogramina A. Esse gene tem sido detectado em plasmídeos que também contêm os genes *vanA* e *erm(B)* (RENDE-FOURNIER *et al.*, 1993). O produto de um segundo gene de resistência à estreptogramina A em *E. faecium*, o gene *vat(E)*, também exhibe uma seqüência de aminoácidos deduzida muito similar às acetiltransferases ativas contra estreptograminas. Alguns outros genes [*vgb(A)* e *vat(A)*, entre outros] relacionados à essa resistência têm sido relatados em amostras de *E. faecium*, porém, com freqüência muito baixa (SOLTANI *et al.*, 2000).

Mesmo não sendo antimicrobianos rotineiramente utilizados no tratamento de infecções enterocócicas, as tetraciclinas podem representar uma opção para o tratamento de bacteremias causadas por *Enterococcus* resistentes à Vancomicina (*Vancomycin Resistant Enterococci* – VRE), sendo, nesses casos, indicada a realização de testes *in vitro* com esse antimicrobiano (CLSI, 2008). Entretanto, cerca de 60 a 65% dos isolados clínicos apresentam resistência às tetraciclinas (JONES *et al.*, 1998; HÖRNER *et al.*, 2005; QUIÑONES *et al.*, 2005, RUIZ-GARBAJOSA *et al.*, 2006). Existem dois mecanismos principais de resistência às tetraciclinas em *Enterococcus*: (i) efluxo ativo da droga através da membrana citoplasmática, e (ii) proteção ribossomal (KAK & CHOW, 2002). Os genes *tet(K)* e

*tet(L)* codificam proteínas grandes com 14 domínios transmembrana que causam resistência por efluxo ativo da tetraciclina (ROBERTS & HILLIER, 1990). Por outro lado, os genes *tet(M)*, *tet(O)* e *tet(S)* codificam proteínas que conferem resistência à tetraciclina e minociclina através de alterações na conformação ribossomal, que impedem a ligação do antimicrobiano com seu sítio-alvo. O gene *tet(M)*, determinante de resistência à tetraciclina mais comum entre os enterococos, é tipicamente cromossômico e usualmente carregado pelo transposon Tn916 ou transposons conjugativos relacionados, mas também pode ser encontrado em plasmídeos conjugativos, o que explica a ampla disseminação desse gene entre *Enterococcus* e outros gêneros bacterianos (AGERSO *et al.*, 2006).

Da mesma forma que as tetraciclinas, a alta prevalência de *Enterococcus* multirresistentes em muitos hospitais tem levado a um interesse no uso do cloranfenicol como terapia alternativa (CLSI, 2008). Entretanto, apesar do uso infreqüente, os índices de resistência a esse antimicrobiano entre *Enterococcus* são elevados (BUSANI *et al.*, 2004; SADER *et al.*, 2004). Na maioria dos casos, a resistência ao cloranfenicol está relacionada à produção de enzimas com atividade de acetiltransferase, as CATs (*Cloramphenicol Acetyltransferase*), as quais acetilam um grupamento hidroxila na molécula do antimicrobiano, impedindo a ligação ao ribossoma bacteriano. Os genes *cat* são usualmente plasmidiais, mas podem também estar localizados no cromossoma bacteriano (KAK & CHOW, 2002).



A atividade das quinolonas frente a isolados de *Enterococcus* é considerada de moderada a alta e a resistência à essa classe de antimicrobianos vem crescendo paralelamente ao aumento do seu uso, especialmente em infecções do trato geniturinário. As quinolonas atuam interagindo com as topoisomerases tipo II e IV e com a DNA girase, as quais são essenciais no processo de replicação do DNA. A DNA girase (composta por suas subunidades GyrA e GyrB) é o alvo primário de atividade das quinolonas em bactérias Gram-negativas e a topoisomerase IV (formada pelas subunidades ParC e ParE) é o alvo primário em Gram-positivos. Mutações no gene *parC* de enterococos podem ser o primeiro passo no desenvolvimento de resistência às quinolonas. Mutações posteriores no gene *gyrA* podem ocorrer, estando associadas a níveis mais elevados de resistência (KANEMATSU *et al.*, 1998).

Em virtude da ampla utilização desse antimicrobiano, índices de resistência elevados têm sido relatados no Brasil (MONDINO *et al.*, 2003; TITZE-DE-ALMEIDA *et al.*, 2004) e em outros países (BILLSTRÖM *et al.*, 2008; ZHANEL *et al.*, 2008).

Recentemente, novos antimicrobianos têm demonstrado resultados clínicos favoráveis no tratamento de infecções causadas por cepas de *Enterococcus* multirresistentes, especialmente VRE, para as quais as opções terapêuticas são consideravelmente restritas.

Nesse sentido, a linezolida, aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) no final da década de 90, surgiu como opção promissora no tratamento de infecções por patógenos Gram-positivos multirresistentes, incluindo VRE (ZHANEL *et al.*, 2001). O otimismo em torno desse antimicrobiano relacionou-se ao fato dele representar uma nova classe e apresentar, portanto, novo mecanismo de ação (ligação à subunidade 50S do ribossoma bacteriano, impedindo o início da síntese protéica), com menor potencial para o desenvolvimento de resistência. Entretanto, já em 2001, foi relatado o primeiro isolado de *E. faecium* resistente à linezolida (GONZALES *et al.*, 2001), seguido por diversos outros relatos, a partir de então (ANDEREGG *et al.*, 2005; SCHEETZ *et al.*, 2006; SCHULTE *et al.*, 2008).

Por sua vez, a daptomicina, um lipopetídeo aprovado pelo FDA em 2003 para tratamento de infecções de pele e tecidos moles causadas por cocos Gram-positivos, apresenta excelente atividade contra *Enterococcus* (SADER *et al.*, 2007). Porém, amostras de enterococos resistentes a esse antimicrobiano também têm sido reportados em diferentes estudos (LEWIS *et al.*, 2005; MUNOZ-PRICE, LOLANS & QUINN, 2005).

Especialmente caracterizada por seu amplo espectro de ação, a tigeciclina, uma glicilglicina derivada da minociclina que impede o alongamento da cadeia peptídica, tem demonstrado boa atividade frente a isolados de *Enterococcus* susceptíveis ou não à vancomicina (ROSSI & ANDREAZZI, 2006). No entanto, a despeito do reduzido tempo de utilização clínica, a resistência à esse

antimicrobiano em isolados de *Enterococcus* já foi relatada (WERNER *et al.*, 2008).

Nesse contexto de novos antimicrobianos ativos contra enterococos multirresistentes, glicopetídeos ainda em fase de estudos, como telavancina e oritavancina, têm demonstrado resultados excelentes frente a isolados de VRE (DRAGHI *et al.*, 2008), apresentando vantagens farmacodinâmicas importantes em relação à vancomicina. No entanto, torna-se necessário ressaltar que, mesmo antes da aprovação para uso clínico, isolados de VRE apresentando susceptibilidade reduzida à oritavancina já foram descritos (LENTINO, NARITA & YU, 2008).

Portanto, apesar das novas possibilidades terapêuticas direcionadas a cocos Gram-positivos multirresistentes, o tratamento de infecções causadas por VRE permanece ainda desafiador, considerando as limitadas opções e o preocupante desenvolvimento de resistência a estas.

Cepas de VRE foram inicialmente isoladas em 1986, na França e Inglaterra (LECLERCQ *et al.*, 1988). A partir de então, cepas com esse fenótipo têm sido descritas em diferentes partes do mundo, apresentando diferenças quando à prevalência (GIKAS *et al.*, 2005; KAÇMAZ & AKSOY, 2005; KOLAR *et al.*, 2005; QUIÑONES *et al.*, 2005; CHRISTIANSEN *et al.*, 2007; MLYNARCZYK *et al.*, 2007; ZHANEL *et al.*, 2008). Essa variação na frequência de isolamento também é observada no Brasil (CEREDA *et al.*, 2002; ZANELLA *et al.*, 2003;

CAIAFFA FILHO *et al.*, 2003; FURTADO *et al.*, 2005a; FURTADO *et al.*, 2006; VILELA *et al.*, 2006; RIBAS *et al.*, 2007), sendo o VRE um problema terapêutico grave. As conseqüências mais notáveis da ocorrência de VRE são o aumento na mortalidade e o maior tempo de hospitalização, acarretando em maior custo (SONG *et al.*, 2003).

A prevalência de VRE aumentou dramaticamente na década de 90. Dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) mostram que a prevalência passou de 0,3% em 1989 para mais de 25% em 1999 (KURUP *et al.*, 2008). Dados do programa SENTRY (1997-1999) ilustraram que amostras de *Enterococcus* provenientes dos Estados Unidos são consideravelmente mais resistentes à vancomicina (17% em 1999) do que amostras de outras regiões geográficas. Aproximadamente 25% das infecções enterocócias acometendo pacientes de Unidades de Terapia Intensiva (UTI) estão relacionadas a cepas de VRE (NNIS, 2001; RICE *et al.*, 2004). Na Europa, a incidência de infecções causadas por VRE é baixa. Entretanto, a colonização em indivíduos sadios é mais comum (MASCINI & BONTEN, 2005).

O tempo de hospitalização, a admissão em UTI e a antibioticoterapia previa têm sido associados com aquisição de VRE (BYERS *et al.*, 2002). Entretanto, nem todas as classes de antimicrobianos são igualmente efetivas nessa pressão seletiva. Vancomicina e cefalosporinas têm sido relatadas como fatores de risco independentes em muitos estudos. Por outro lado, o tratamento com drogas anti-

anaeróbios tem sido repetidamente associado com uma maior densidade de colonização por VRE (D'AGATHA *et al.*, 2002).

A vancomicina atua ligando-se com alta afinidade ao pentapeptídeo precursor do peptideoglicano, componente básico da parede celular, especificamente na porção C-terminal do dipeptídeo D-Alanina-D-Alanina (D-Ala-D-Ala). Sendo assim, bloqueia a transglicosilação dos demais precursores à cadeia de peptideoglicano nascente; e evita a subsequente ligação cruzada das moléculas para a formação da parede celular, através de transpeptidação (COURVALIN, 2006).

A resistência à vancomicina é devida à presença de operons que codificam enzimas (1) para a síntese de precursores com baixa afinidade pelo antimicrobiano, nos quais o resíduo C-terminal D-Ala é substituído por D-lactato (D-Lac) ou D-serina (D-Ser), modificando, portanto, o sítio de ligação da vancomicina; e (2) para a eliminação de precursores de alta afinidade que são normalmente produzidos pelo microrganismo, removendo o sítio de ligação da vancomicina (COURVALIN, 2006).

Existem sete fenótipos de resistência já descritos (VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG e VanL), os quais apresentam peculiaridades em relação aos seus determinantes genéticos e à expressão da resistência (KAK & CHOW, 2002; TEIXEIRA, CARVALHO & FACKLAM, 2007; BOYD *et al.*, 2008).

A resistência do tipo *vanA* foi a primeira a ser descrita. Esse fenótipo está relacionado à resistência induzível a níveis elevados de vancomicina e teicoplanina, com CIMs  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  e  $\geq 16\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A detecção inicial do gene *vanA* ocorreu em um plasmídeo de um isolado clínico de *E. faecium*. Essa resistência é mediada pelo transposon Tn1546 ou elementos intimamente relacionados (ARTHUR *et al.*, 1993).

Esse transposon, de 11kb, codifica 9 polipeptídeos divididos em grupos funcionais: transposição (ORF1 e ORF2), regulação da expressão dos genes de resistência (VanR e VanS), síntese do dipeptídeo D-Ala-D-Lac (VanH e VanA), e hidrólise dos precursores constitutivos de peptideoglicano (VanX). Um outro peptídeo, VanZ, também é codificado pelo *cluster vanA*, mas sua função permanece desconhecida (COURVALIN, 2006). No processo de síntese do dipeptídeo D-Ala-D-Lac, a proteína VanH atua como uma desidrogenase, reduzindo piruvato a D-Lac, enquanto que VanA, atuando como ligase, cataliza a formação da ligação entre D-Ala e D-Lac. O dipeptídeo resultante substitui o dipeptídeo constitutivo na síntese do peptideoglicano, o que diminui consideravelmente a afinidade da molécula pelos glicopeptídeos (BUGG *et al.*, 1991).

O *cluster vanA* tem sido encontrado principalmente em *E. faecium* e *E. faecalis*, mas também em *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus raffinosus*, e em isolados atípicos de *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus casseliflavus*, os quais apresentam resistência a níveis elevados de

vancomicina e de teicoplanina (COURVALIN, 2006). Ele é o determinante genético mais comumente relacionado à resistência à vancomicina, de acordo com diversos estudos nacionais e internacionais (CEREDA *et al.*, 2002; CAIAFFA FILHO *et al.*, 2003; ZANELLA *et al.*, 2003; CAMARGO *et al.*, 2004; VILELA *et al.*, 2006; CORSO *et al.*, 2007; de NIEDERHÄUSERN *et al.*, 2007; DESHPANDE *et al.*, 2007; ZHENG *et al.*, 2007; NOVAIS *et al.*, 2008).

Assim como as cepas VanA, a resistência adquirida do tipo VanB é devida à síntese de peptideoglicano com a terminação D-Ala-D-Lac. O gene *vanB* está usualmente localizado no cromossomo bacteriano, mas também pode ser encontrado em transposons conjugativos (RICE *et al.*, 1998). A presença desse gene não interfere na susceptibilidade à teicoplanina, mas determina resistência induzível a níveis variados, freqüentemente elevados, de vancomicina, apresentando CIM entre 4 e 1024 µg/mL (QUINTILIANI, EVERS & COURVALIN, 1993). Isso porque, apesar de a organização e funcionalidade do *cluster vanB* serem similares ao *vanA*, diferem na sua regulação, pois apenas a vancomicina, e não a teicoplanina, atua como indutor do *cluster vanB* (EVERS & COURVALIN, 1996).

O operon *vanB* contém genes que codificam uma desidrogenase, uma ligase e uma dipeptidase apresentando elevado grau de identidade de seqüência (67%-76% de identidade) com as proteínas deduzidas correspondentes do operon *vanA* (COURVALIN, 2006). Com base nas diferenças de seqüência, o *cluster* de genes *vanB* pode ser subdividido em três subtipos: *vanB1*, *vanB2* e *vanB3*, não

havendo correlação entre o subtipo e o nível de resistência (DAH *et al.*, 1999). Os transposons Tn1547, Tn 5382 e Tn1549 têm sido descritos como carreadores do operon *vanB*, sendo que dados de seqüenciamento sugerem que Tn1549 é essencialmente idêntico ao Tn5382 (WEAVER, RICE & CHURCHWARD, 2002).

A resistência adquirida do tipo VanD também é devida à produção de um precursor do peptideoglicano terminado em D-Ala-D-Lac. A organização do operon *vanD*, o qual está localizado exclusivamente no cromossomo, é similar à *vanA* e *vanB*, apresentando algumas peculiaridades. Essa resistência é constitutiva e não parece ser transferível por conjugação. As cepas com esse fenótipo têm uma pequena atividade D,D-dipeptidase, não sendo, portanto, capazes de eliminar o precursor de peptideoglicano finalizado em D-Ala-D-Ala, alvo para a ação dos glicopeptídeos. Sendo assim, o fenótipo VanD está relacionado a níveis moderados de resistência tanto à vancomicina (CIM de 64 a 128 µg/mL) quanto à teicoplanina (CIM de 4 a 64 µg/mL)(COURVALIN, 2006).

A resistência intrínseca a níveis baixos de vancomicina é uma característica de *E. gallinarum* e *E.casseliflavus-flavescens*, devido à presença do gene *vanC* (*E. gallinarum*, *vanC1*; *E. casseliflavus*, *vanC2*; *Enterococcus casseliflavus-flavescens*, *vanC3*). As proteínas deduzidas do operon *vanC-2* de *E. casseliflavus* apresentam elevado grau de identidade (97-100%) com aquelas codificadas pelo operon *vanC-3* (DUTTA & REYNOLDS, 2003).



O fenótipo VanC é expresso constitutivamente, decorrente da produção de um precursor de peptideoglicano finalizado em D-Ser (REYNOLDS & COURVALIN, 2005). A organização do operon *vanC*, o qual tem localização cromossômica e não é transferível, difere dos demais operons descritos acima. Três proteínas são necessárias para a resistência do tipo VanC: VanT, uma serina racemase associada à membrana, a qual produz D-Ser; VanC, uma ligase que cataliza a síntese de D-Ala-D-Ser; e VanXY<sub>C</sub>, com atividade de dipeptidase e carboxipeptidase, que permite a hidrólise do precursor finalizado em D-Ala (DUTTA & REYNOLDS, 2003).

A exemplo de VanC, o fenótipo VanE também está relacionado à síntese de do precursor do peptideoglocano finalizado em D-Ala-D-Ser e corresponde a resistência a baixos níveis de vancomicina e susceptibilidade à teicoplanina. O *cluster vanE* apresenta organização idêntica à observada no operon *vanC* (COURVALIN, 2006). Outro fenótipo de resistência, descrito em alguns isolados de *E. faecalis*, é o VanG. É uma resistência adquirida, relacionada à presença do dipeptídeo D-Ala-D-Ser e que determina baixos níveis de resistência à vancomicina (CIM de 12 a 16 µg/mL) e susceptibilidade à teicoplanina (CIM menor que 0,5 µg/mL) (McKESSAR *et al.*, 2000).

Recentemente, foi descrito um novo *cluster* relacionado à resistência à vancomicina, o *vanL*. Esse gene foi caracterizado em uma cepa de *E. faecalis*, a qual apresentou CIM de 8 µg/mL. O *cluster vanL* é essencialmente organizado como *vanC* e *vanE*, e as proteínas codificadas pelos seus genes catalizam a

formação do dipeptídeo D-Ala-D-Ser, o qual é incorporado ao precursor do peptídeo glicano. Como a origem do gene *cluster vanL* e a forma pela qual essa cepa o adquiriu são desconhecidas, o significado clínico desses achados permanece por ser estabelecido (BOYD *et al.*, 2008).

Apesar de já bem definidos os fenótipos de resistência à vancomicina, sua caracterização nem sempre é tão simples. Estudos recentes relataram cepas de VRE isoladas na Coreia, Japão e Taiwan apresentando incongruência entre fenótipo e genótipo, as quais eram susceptíveis à teicoplanina em testes *in vitro*, apesar da presença do gene *vanA*. Tem sido sugerido que pontos de mutação podem ser a causa da divergência (LEE *et al.*, 2004; OH *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2008).

Por longos anos, houve muita controvérsia e confusão em relação aos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos para isolados de *Enterococcus*, particularmente em relação à confiabilidade dos métodos fenotípicos para detecção de HLR-A e de resistência à vancomicina (TEIXEIRA, CARVALHO & FACKLAM, 2007). Sendo assim, após um período de avaliação, recomendações foram estabelecidas para a seleção de agentes antimicrobianos que devem ser considerados e reportados nos testes de rotina, assim como para a execução e os critérios interpretativos dos testes de susceptibilidade para *Enterococcus*, que parecem satisfatórios (TEIXEIRA, CARVALHO & FACKLAM, 2007; CLSI, 2008).

Nesse sentido, além das técnicas convencionais de detecção fenotípica da resistência (disco-difusão, determinação da CIM), são recomendados, para detecção de resistência à vancomicina e resistência a níveis elevados de gentamicina e estreptomicina, testes de triagem em agar. Não se torna necessário o teste com os demais aminoglicosídeos, uma vez que suas atividades contra enterococos não são superiores à gentamicina e estreptomicina (CLSI, 2008).

Além das técnicas fenotípicas, métodos moleculares têm sido utilizados para detectar genes de resistência específicos para determinados agentes antimicrobianos (SUTCLIFFE, TAIT-KAMRADT & WONDRACK, 1996; SATAKE *et al.*, 1997; TRZCINSKI *et al.*, 2000; VAKULENKO *et al.*, 2003; DEPARDIEU *et al.*, 2004) e têm contribuído substancialmente para o entendimento da diversidade e disseminação da resistência adquirida entre os enterococos. Entretanto, devido a sua alta especificidade, métodos moleculares não são capazes de detectar resistência relacionada a mecanismos que não estão incluídos em um determinado teste, assim como mecanismos emergentes de resistência, para os quais não são conhecidos os determinantes genéticos (TEIXEIRA, CARVALHO & FACKLAM, 2007).

As infecções enterocócicas eram tradicionalmente consideradas endógenas, originadas da própria microbiota normal do paciente, motivo pelo qual a epidemiologia dessas infecções não despertava grande atenção. Nas últimas décadas, entretanto, maior interesse foi dado a esse assunto devido às evidências que suportaram a aquisição exógena de infecções enterocócicas. Além disso, a

importância crescente dos *Enterococcus* como patógenos hospitalares e a emergência e disseminação de cepas multirresistentes contribuíram de forma relevante para o maior interesse na epidemiologia desses microrganismos (TEIXEIRA, CARVALHO & FACKLAM, 2007).

Nesse sentido, maior importância se dá às cepas de VRE, as quais são um grave problema nas instituições de saúde, especialmente pela endemicidade das mesmas, possibilidade de disseminação a partir de portadores saudáveis e pela escassez de opções terapêuticas (MALANI *et al.*, 2002).

O manejo de surtos causados por VRE requer estratégias para conter os casos e diminuir índices de transmissão, incluído isolamento de pacientes infectados ou colonizados por VRE (ZIRAKZADEH & PATEL, 2006). A colonização por VRE pode ser monitorada por culturas de fezes ou *swabs* retais, utilizando meios seletivos e/ou diferenciais (CUZON *et al.*, 2008). Atualmente, o meio mais amplamente utilizado para a triagem de VRE é o agar azida com bile-esculina, suplementado com 6 µg de vancomicina por mililitro (ZIRAKZADEH & PATEL, 2006). Meios cromogênicos têm sido desenvolvidos (CUZON *et al.*, 2008); entretanto, como foram recentemente disponibilizados no mercado, esses meios ainda não foram extensivamente estudados (MALHOTRA-KUMAR *et al.*, 2008).

As medidas de controle de transmissão são fundamentais e, por vezes, as únicas efetivas para o controle das infecções enterocócicas. Os surtos hospitalares por enterococos multirresistentes podem ser causados por

disseminação clonal, a partir de uma única amostra, ou por transferência horizontal de plasmídeos ou transposons carreando genes de resistência entre cepas geneticamente distintas.

A transmissão clonal foi comprovada, por exemplo, na maioria dos surtos causados por *Enterococcus* produtores de  $\beta$ -lactamase (MURRAY *et al.*, 1992) e em alguns estudos com amostras de *Enterococcus* apresentando HLR-A (ANTALEK *et al.*, 1995; MA *et al.*, 1998, ZARRILLI *et al.*, 2005), inclusive no Brasil, sobretudo entre amostras apresentando HLR-Ge (CARVALHO, 1998; MENDONÇA, 1998; MONDINO *et al.*, 2003; d'AZEVEDO, DIAS & TEIXEIRA, 2006). Por outro lado, vários surtos causados por HLR-A têm sido caracterizados como policlonais, sugerindo origem endógena das cepas (SAEEDI *et al.*, 2004; ZARRILLI *et al.*, 2005; QU *et al.*, 2006; ABBASSI, ACHOUR & HASSEN, 2007).

Da mesma forma, infecções por VRE podem apresentar origem policlonal (MANIATIS *et al.*, 2001; POURSHAFIE *et al.*, 2008), embora sua disseminação seja freqüentemente clonal (MANSON *et al.*, 2003; DESHPANDE *et al.*, 2007; LAMBIASE *et al.*, 2007). Isso porque, uma vez estabelecidos em um determinado ambiente hospitalar, esses clones tornam-se extremamente difíceis de erradicar (DESHPANDE *et al.*, 2007). Estudos avaliando a diversidade genética de cepas VRE no Brasil demonstram essa disseminação clonal (REIS *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2001; CEREDA *et al.*, 2002; ZANELLA *et al.*, 2003).

Considerando o acima exposto, percebe-se, claramente, que o desenvolvimento de sistemas de tipagem genética contribuiu de forma marcante para o rastreamento e compreensão da disseminação de amostras de *Enterococcus*. Tais sistemas são baseados na observação de que amostras de uma mesma espécie podem apresentar ampla variabilidade no DNA, decorrente de eventos genéticos como mutações pontuais, inserções, deleções e recombinações (TENOVER *et al.*, 1995; STRUELENS, 1996). Em contrapartida, os sistemas de tipagem fenotípica, tais como biotipagem, sorotipagem e fagotipagem são de valor limitado para o estudo de *Enterococcus*, devido ao baixo poder discriminatório, uma vez que não detectam diferenças significativas entre amostras da mesma espécie (MURRAY, 1990).

Os métodos de tipagem molecular apresentam diferentes graus de reprodutibilidade e poder discriminatório. Vários desses métodos foram utilizados para a discriminação de amostras de *Enterococcus*, incluindo a análise do polimorfismo eletroforético de isoenzimas (MLEE) (TOMAYKO & MURRAY, 1995); análise do DNA cromossômico após clivagem com endonucleases de elevada frequência de corte com posterior análise através de eletroforese convencional (*Restriction Endonuclease analysis* - REA) (HALL *et al.*, 1992); análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico através das diferentes variantes da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) (MURRAY *et al.*, 1990); ribotipagem (GORDILLO, SINGH & MURRAY, 1993), técnicas de amplificação do DNA baseados na metodologia da reação da polimerase em cadeia (PCR) com as suas diferentes variantes, como a análise do polimorfismo de segmentos de DNA

amplificados de forma aleatória (AP-PCR) (VAN BELKUM *et al.*, 1995) e a análise do polimorfismo das seqüências repetitivas palindrômicas extragênicas (REP-PCR) (MALATHUM *et al.*, 1998). Mais recentemente, somaram-se a essas, as técnicas de *Multilocus Sequence Typing-MLST* (NALLAPAREDDY *et al.*, 2002), *Multiple-locus Variable-number Tandem Repeat Analysis-MLVA* (TOP *et al.*, 2004) e *Microarray* (CASSONE *et al.*, 2008).

A análise do DNA cromossômico, através da eletroforese em campo pulsado mostrou-se com elevado poder discriminatório para correlacionar amostras, sendo a mais recomendada, até o momento, para estudos epidemiológicos (TENOVER *et al.*, 1995; d'AGATHA *et al.*, 2001; TEIXEIRA, CARVALHO & FACKLAM, 2002; d'AZEVEDO, DIAS & TEIXEIRA, 2006; POURSHAFIE *et al.*, 2008; TOP *et al.*, 2008).

O conhecimento de grupos clonais predominantes de enterococos nas diferentes regiões geográficas, bem como dos determinantes genéticos de resistência presentes nesses isolados, reveste-se de particular importância, considerando o aumento na freqüência destes microrganismos como agentes etiológicos de infecções hospitalares e a emergência de cepas multirresistentes, de difícil manejo clínico.

Mesmo assim, no Brasil, ainda são bastante limitadas e fragmentadas as informações sobre as características de *Enterococcus* circulantes, sendo que os dados disponíveis são, em sua maioria, restritos à região sudeste e centro-oeste

(MERQUIOR *et al.*, 1992; CEREDA *et al.*, 2002; MONDINO *et al.*, 2003; TITZE-DE-ALMEIDA *et al.*, 2004).

Em 2001, d'Azevedo descreveu as características fenotípicas e genotípicas de amostras de enterococos isoladas em Porto Alegre, RS, nos anos de 1996 e 1997. Nesse trabalho, foram analisadas amostras provenientes de 5 instituições de saúde da cidade, sendo identificadas as espécies *E. faecalis* (92,8%) e *E. faecium* (2,9%) como as mais freqüentes, oriundas principalmente de urina (70,3%). As amostras analisadas apresentaram resistência a tetraciclina (62,0%), eritromicina (42,6%), cloranfenicol (24,8%), ciprofloxacina (22,0%) nitrofurantína (4,1%) e ampicilina (3,1%). Além disso, a resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos foi observada em 24,8% e 15,8% das amostras para gentamicina e estreptomicina, respectivamente. A tipagem molecular das amostras apresentando HLR-Ge mostrou que 70,8% delas estavam incluídas no grupo clonal dominante A, já descrito previamente no sudeste do país (CARVALHO, 1998; MENDONÇA, 1998; PAULA, 2000; MONDINO *et al.*, 2003).

Em Porto Alegre, a ocorrência de VRE foi inicialmente documentada em 2000 (d'AZEVEDO *et al.*, 2000). A amostra foi identificada como *E. faecalis* portador do gene *vanA*, pertencente ao clone dominante no país (TEIXEIRA *et al.*, 2001). Políticas de vigilância e controle foram estabelecidas pelos Comitês de Controle de Infecção para prevenir a disseminação de VRE. No entanto, o isolamento sucessivo de VRE foi observado em várias unidades hospitalares,



nessa região geográfica. Mesmo assim, ainda são limitados os dados relacionados à epidemiologia dos *Enterococcus* nos estados da região Sul.

Diante do exposto, ressalta-se a importância e a aplicabilidade de estudos sistemáticos periódicos que permitam o conhecimento das características de amostras circulantes em uma determinada região do país, o que pode contribuir, de forma significativa, para o desenvolvimento de medidas mais adequadas de tratamento e controle das infecções enterocócicas.

## OBJETIVOS

---

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

Entretanto, dados em relação à epidemiologia das infecções enterocócicas, bem como à susceptibilidade dos microrganismos aos principais antimicrobianos de interesse clínico ainda são limitados no Brasil, restringindo-se, especialmente, à região Sudeste. Nesse contexto, o conhecimento da prevalência dos determinantes genéticos associados às resistências clinicamente importantes apresenta ainda uma maior limitação.

Portanto, considerando os aspectos acima mencionados e a limitação de dados recentes sobre *Enterococcus* circulantes na cidade de Porto Alegre, RS, este trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

- ⇒ Identificar fenotipicamente as diferentes espécies de *Enterococcus* isoladas de espécimes clínicos, provenientes de pacientes atendidos em unidades hospitalares do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre (CHSCPA), coletadas entre janeiro de 1999 a dezembro de 2004;
- ⇒ Determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos entre as amostras de *Enterococcus*, através da utilização de métodos fenotípicos;
- ⇒ Caracterizar a presença dos determinantes genéticos relacionados aos diferentes fenótipos de resistência, através de PCR;
- ⇒ Avaliar a diversidade genética das amostras, através da análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico após Eletroforese em Campo Pulsado;

## MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 1. AMOSTRAS BACTERIANAS

Foram utilizadas amostras de *Enterococcus* da coleção do Laboratório de Cocos Gram-Positivos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Foram estudados 637 amostras isoladas entre janeiro de 1999 a dezembro de 2004, provenientes de hospitais do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre (CHSCPA). O referido complexo (que comporta 1079 leitos) é formado por sete hospitais, apresentando especialidades médicas diferentes e localizados em prédios distintos, quais sejam: Hospital Santa Rita (HSR - oncologia), Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA - pediatria), Hospital São Francisco (HSF - cardiologia), Hospital São José (HSJ - neurologia), Pavilhão Pereira Filho (PPV - pneumologia), Hospital Dom Vicente Scherer (HDVS - transplantes e emergências médicas) e Policlínica Santa Clara (PSC – hospital geral).

Todas as amostras bacterianas foram recebidas a partir do Laboratório Central do CHSCPA, transportadas em *swabs* com meio de transporte até o laboratório da UFCSPA. As amostras estão mantidas sob a forma de suspensões em solução contendo leite desnatado (Molico<sup>®</sup>, Nestlé, São Paulo, Brasil) a 10% (v/v) e glicerol (Reagen, Quimibrás Indústrias Químicas S/A, Rio de Janeiro, Brasil) a 10% (v/v), armazenadas em tubos de congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para recuperação das amostras, uma alíquota de cada suspensão foi inoculada em

placa contendo *Trypticase Soy Agar* (TSA; BBL Microbiology Systems; Cockeysville, Maryland, EUA) suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro (TSA-SC), seguida por incubação à  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 18-24 horas.

Foram também utilizadas cepas de referência, empregadas para o controle de qualidade das diferentes técnicas ou para fins comparativos, as quais serão citadas nas seções correspondentes. A manutenção e recuperação das mesmas foram realizadas conforme descrito acima.

## **2. IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DAS AMOSTRAS BACTERIANAS**

Após confirmação da pureza das amostras, foram realizados testes convencionais para a confirmação do gênero, segundo recomendações de Teixeira, Carvalho & Facklam (2007). Os testes incluíram: verificação das características morfo-tintoriais em esfregaços corados pelo método de Gram; produção da enzima catalase; hidrólise da esculina na presença de 40% de sais biliares; crescimento na presença de 6,5% de cloreto de sódio (NaCl); hidrólise da L-pirrolidonil- $\beta$ -naftilamida (PYR) e L-leucina- $\beta$ -naftilamida (LAP).

As diferentes espécies de *Enterococcus* foram identificadas utilizando-se provas bioquímicas, propostas pelos autores acima referidos, quais sejam: produção de pigmento, motilidade, hidrólise da arginina, utilização do piruvato e fermentação de açúcares (arabinose, manitol, metil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo (MGP),

rafinose, sacarose, sorbitol e sorbose). Os critérios para interpretação dos resultados estão apresentados nas **Tabelas 1 e 2**.

As amostras de referência *E. faecalis* SS-1273, *E. faecium* SS-1274, *E. casseliflavus*, SS-1229 e *E. gallinarum* SS-1228 foram utilizadas como controle dos testes fenotípicos para identificação.

### **2.1. Estudo da Morfologia Celular**

Após o crescimento das amostras em TSA-SC a  $35\pm 2^\circ\text{C}$  por 18h-24h, foram preparadas suspensões bacterianas, a partir de colônias isoladas em solução fisiológica (NaCl 0,85%) e, com estas, foram feitos esfregaços em lâminas de vidro. Após fixação dos mesmos, foi realizada coloração pelo método de Gram seguida da observação ao microscópio óptico em objetiva de 100X (imersão).

### **2.2. Produção da Enzima Catalase**

A observação da produção da catalase foi efetuada por metodologia convencional, em lâmina de vidro. A partir de cultivo recente (18h-24h a  $35\pm 2^\circ\text{C}$ ) em meio TSA-SC, uma suspensão espessa do microrganismo foi depositada sobre uma gota de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 3% (v/v). A formação imediata de bolhas, decorrente da hidrólise do  $\text{H}_2\text{O}_2$  por ação da enzima catalase indicou reação positiva.

### **2.3. Hidrólise da Esculina na Presença de Sais Biliares**

As amostras foram semeadas em agar Bile Esculina (*Bile Esculin Agar*, BEA, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) e incubadas a  $35\pm 2^\circ\text{C}$  por 18h-24h. O escurecimento do meio, em função da hidrólise da esculina em esculetina, na presença de bile foi indicativo de reação positiva.

### **2.4. Crescimento na Presença de 6,5% de NaCl**

A tolerância a concentrações elevadas de NaCl foi verificada pelo crescimento da amostra em HIB (*Heart Infusion Broth*, Difco) acrescido de NaCl (Merck Indústrias Químicas S.A., Rio de Janeiro, Brasil) a 6,5% (p/v), D-glicose a 0,1% (p/v) e 0,1% (p/v) de solução alcoólica do indicador de pH púrpura bromocresol (Vetec Química e Representações Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 1,6% (p/v). Após incubação a  $35\pm 2^\circ\text{C}$  durante 18-24h, a turvação do meio, acompanhada ou não de mudança de coloração de púrpura para amarelo, foi considerada indicativa de reação positiva.

### **2.5. Hidrólise de L-Leucina- $\beta$ -Naftilamida (LAP) e de L-Pirrolidonil- $\beta$ -Naftilamida (PYR)**

Para a execução destes testes, uma suspensão espessa de cada amostra, obtida a partir do crescimento em TSA-SC a  $35\pm 2^\circ\text{C}$  por 18h-24h, foi preparada em 0,2 mL de caldo Todd-Hewitt (*Todd-Hewitt Broth*, THB, Difco) contendo 0,01%

de PYR ou 0,02% de LAP (Sigma Chemical Co., St Louis, EUA). Após um período de 4h de incubação a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ , foram adicionadas uma a duas gotas de solução reveladora contendo dimetilamino cinamaldeído (Sigma Co.) a 1% em HCl a 10% (v/v). A leitura do teste foi feita imediatamente e em até 10 min, após agitação suave. O teste foi considerado positivo pelo aparecimento de coloração rosa forte ou púrpura.

## **2.6. Produção de Pigmento**

A produção de pigmento foi observada em culturas obtidas no meio TSA-SC após 18h-24h de incubação a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ . O teste foi considerado positivo quando houve a observação de coloração amarela. Para a melhor visualização do pigmento, o crescimento foi recolhido com auxílio de um *swab*.

## **2.7. Motilidade**

O teste da motilidade foi realizado inoculando-se a amostra em *Motility Medium* (Gibson Laboratories, Inc., Lexington, KY, EUA). O inóculo foi introduzido com o auxílio de agulha bacteriológica previamente esterilizada por flambagem e o resultado foi observado após incubação a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 18-24h. A observação de turvação indicou resultado positivo.

## **2.8. Hidrólise da Arginina**



Para o teste da hidrólise da arginina foi utilizado o meio *Decarboxylase Base Moeller* (Difco) acrescido de 1% de L-arginina (Sigma Co.). Após a inoculação do meio, com uma suspensão bacteriana densa, foi adicionada uma camada de cerca de 10 mm de óleo mineral estéril e os tubos foram incubados a  $35\pm 2^\circ\text{C}$  por até sete dias. A manutenção da coloração púrpura, inicialmente observada no meio, indicou reação positiva, devido à alcalinização do meio, em decorrência da hidrólise do substrato.

## **2.9. Produção de Ácidos a Partir de Carboidratos**

A produção de ácidos a partir de carboidratos (L-arabinose, manitol, MGP, D-rafinose, sacarose, D-sorbitol e D-sorbose) foi observada em meio HIB (Difco Labs.) acrescido de 1% do respectivo carboidrato (p/v), além de 0,1% de solução alcoólica do indicador de pH púrpura bromocresol a 1,6% (p/v). A leitura foi feita após 18h-24h e até o sétimo dia de incubação a  $35\pm 2^\circ\text{C}$ . A positividade dos testes foi considerada pela presença de crescimento e alteração da cor do meio de púrpura para amarelo.

## **2.10. Utilização do Piruvato**

A utilização do piruvato de sódio (Sigma Co.) a 1% (p/v) foi verificada em meio contendo 1% de tripton (Difco), 0,5% de extrato de levedura (Difco), 0,5% de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Merck), 0,5% de NaCl (Merck) e 0,01% do indicador de pH (azul de bromotimol, Sigma). Após inoculação de uma gota de suspensão bacteriana

densa, o meio foi incubado a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 7 dias. A modificação da coloração para amarelo indicou uma reação positiva.

### **3. CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA ATRAVÉS DE SISTEMA AUTOMATIZADO**

Amostras selecionadas foram também analisadas no sistema automatizado MicroScan (Dade Behring, West Sacramento, California, EUA). Fizeram parte deste grupo amostras pertencentes a espécies pouco freqüentemente isoladas a partir de seres humanos. Foram utilizados os painéis *MicroScan Pos Combo Panel Type 21* (Dade Behring), sendo seguidas as instruções do fabricante no que diz respeito ao preparo do inóculo, incubação, leitura e interpretação.

### **4. TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS**

#### **4.1. Técnica de Disco-Difusão**

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliada, inicialmente, através de testes de difusão em agar, conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). As amostras testadas foram cultivadas em TSA-SC por 18h-24h a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Os inóculos foram preparados pela suspensão das colônias em 5mL de salina esterilizada (NaCl 0,85%) e a turvação ajustada para o padrão 0,5 da escala de McFarland. Cada suspensão contendo o inóculo foi

semeada em placa contendo ágar Müller-Hinton (*Müller-Hinton Agar*, Difco). Após esta etapa, os discos contendo os antimicrobianos foram depositados sobre a placa, com auxílio de pinça bacteriológica previamente esterilizada e com posterior incubação por 24h a  $35\pm 2^\circ\text{C}$ .

Os antimicrobianos utilizados foram: ampicilina (10  $\mu\text{g}$ ); ciprofloxacina (5  $\mu\text{g}$ ); cloranfenicol (30  $\mu\text{g}$ ); eritromicina (15  $\mu\text{g}$ ); linezolida (30  $\mu\text{g}$ ); nitrofurantoína (300  $\mu\text{g}$ ); norfloxacin (10  $\mu\text{g}$ ); quinupristina/dalfopristina (15  $\mu\text{g}$ ); teicoplanina (30  $\mu\text{g}$ ); tetraciclina (30  $\mu\text{g}$ ) e vancomicina (30  $\mu\text{g}$ ) (CECON Ltda, São Paulo, Brasil). Para a detecção de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos, foram utilizados discos de estreptomicina (300  $\mu\text{g}$ ) e de gentamicina (120  $\mu\text{g}$ ) (CECON). O controle de qualidade dos testes foi realizado utilizando-se as cepas padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *E. faecalis* ATCC 29212.

#### **4.2. Testes de Triagem para Detecção de Resistência à Vancomicina e de Resistência a Níveis Elevados de Aminoglicosídeos e Ampicilina**

Foram realizados testes de triagem em agar para a caracterização de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos, ampicilina e resistência à vancomicina. Para tal, foram seguidas as recomendações do CLSI (2008), para resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos e resistência à vancomicina; e as de Teixeira e colaboradores (2000) para a determinação de resistência a níveis elevados de ampicilina. As amostras foram semeadas em agar TSA-SC e incubadas a  $35\pm 2^\circ\text{C}$  por 18-24 horas. Desse crescimento, foram preparadas

suspensões bacterianas em salina estéril (NaCl 0,85%) com turvação correspondente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Essas suspensões foram, então, inoculadas, em forma de *spots*, com auxílio de um replicador de Steers, na superfície do agar contendo o antimicrobiano. Foi utilizado o meio de *Brain Hearth Infusion* (BHI) agar para estreptomicina, gentamicina e vancomicina; e o de Müller-Hinton (MH) agar para ampicilina e a incubação foi  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Os antimicrobianos foram diluídos seguindo as recomendações do CLSI (2008) quanto ao diluente empregado, de forma a obter as seguintes concentrações: 2000  $\mu\text{g}$  de estreptomicina por mL de meio; 500  $\mu\text{g}$  de gentamicina por mL; 6  $\mu\text{g}$  de vancomicina por mL e 8 e 16  $\mu\text{g}$  de ampicilina por mL.

Os testes foram realizados em duplicata e uma placa contendo apenas o meio de cultura, sem adição de antimicrobiano, foi utilizada para controle de crescimento. Como controle negativo para os testes de triagens, foi utilizada a amostra *E. faecalis* ATCC 29212. Os controles positivos foram: *E. faecalis* ATCC 51299 (resistente à vancomicina e a níveis elevados de gentamicina e estreptomicina) e a amostra *E. faecium* CL 2807 (resistente à níveis elevados de ampicilina). As leituras foram realizadas após 24 horas de incubação para todos os testes. Nos casos em que não foi observado crescimento bacteriano, uma leitura adicional, após 48 horas de incubação, foi realizada nos testes de triagem com estreptomicina. Foram consideradas amostras resistentes aquelas que apresentaram crescimento de mais de uma colônia na superfície do meio.

### 4.3. Teste de Difusão em Gradiente Contínuo para Determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias

A determinação das CIMs, utilizando-se E-test<sup>®</sup> (AB bioMérieux, Marcy l'Etoile, França), foi realizada para as amostras resistentes à vancomicina, níveis elevados de aminoglicosídeos e/ou ampicilina, conforme detectado em pelo menos uma das técnicas descritas anteriormente.

As faixas de concentrações de antimicrobiano presente nas fitas de E-test<sup>®</sup> utilizadas foram: ampicilina (0,016-256 µg/ml), vancomicina (0,016-256 µg/ml), gentamicina (0,125-1024 µg/ml) e estreptomicina (0,125-1024 µg/ml). As amostras foram cultivadas em ágar BHI (Difco) por 18-24 h a 35±2°C. A partir do crescimento, foram preparadas suspensões em solução salina esterilizada (NaCl 0,85%), com turvação ajustada segundo o padrão 0,5 da escala de McFarland. As suspensões foram então semeadas sobre o meio de ágar Müller-Hinton (Difco) de forma a obter-se crescimento confluyente. As fitas foram então depositadas individualmente em cada placa com auxílio de pinça bacteriológica esterilizada e estas foram incubadas por 16-18 h a 35±2°C.

A CIM foi considerada como a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano (ponto de intersecção da zona de inibição, de forma elíptica formada com a tira). Foram utilizadas, como controle, as seguintes amostras padrão: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29215.

#### 4.4. Determinação da Produção de $\beta$ -Lactamase

A produção de  $\beta$ -lactamase foi verificada utilizando-se o teste da cefalosporina cromogênica (Nitrocefim<sup>®</sup>; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido), conforme recomendações do CLSI (2008). O teste foi realizado em placas de microtitulação preparando-se suspensões espessas de cada amostra bacteriana em 50  $\mu$ l de uma solução contendo 500  $\mu$ g de Nitrocefim<sup>®</sup> por mL. A leitura foi realizada imediatamente e até após 1h de incubação a temperatura ambiente. A observação de coloração avermelhada foi considerada como indicativa de teste positivo. As amostras padrão *S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* ATCC 25923 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

### 5. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

#### 5.1. Detecção dos Genes de Resistência à Vancomicina

Para a detecção dos genes envolvidos na resistência a vancomicina foi utilizada metodologia baseada em Satake e colaboradores (1997) e Depardieu e colaboradores (2004), visando investigar a presença dos genes *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, *vanC-2/3*, *vanD*, *vanE* e *vanG*.

### 5.1.1. Extração do DNA

A extração do DNA bacteriano foi realizada por lise térmica de acordo com Pacheco e colaboradores (1997), com modificações. A partir de um cultivo em TSA-SC por 18h-24h a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ , foi preparada uma suspensão bacteriana em 300 $\mu\text{L}$  de salina fisiológica, equivalente à escala 10 de McFarland. Essa suspensão foi submetida à centrifugação (7000g por 5 min), o sobrenadante foi desprezado e o sedimento contendo as células foi utilizado para a extração do DNA. Para tal, o sedimento foi ressuspenso em 50 $\mu\text{L}$  de tampão TE [10mM Tris (pH8), 1mM EDTA] e as amostras foram incubadas por 10 min a  $37^{\circ}\text{C}$  e, em seguida, por 3 min a  $100^{\circ}\text{C}$ . Uma segunda etapa de centrifugação foi realizada (3000 rpm por 1 min) e o sobrenadante foi utilizado na reação de PCR.

### 5.1.2. PCR

Para as reações de amplificação, uma alíquota de 2 $\mu\text{L}$  do extrato bacteriano foi adicionada à mistura da reação de PCR, com volume final de 100  $\mu\text{L}$ , composta por 1x PCR buffer (10mM Tris, 50mM KCl [pH 8.3]) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1,5mM de cloreto de magnésio (Invitrogen), 0,2mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (Invitrogen) 0,5 $\mu\text{M}$  de cada seqüência iniciadora (*vanA*, *vanB*, *vanC-1*, *vanC-2/3*, *vanD*, *vanE* e *vanG*) e 2,5U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As amplificações foram realizadas em termociclador (GeneAmp PCR System 2400; Perkin Elmer, Branchburg, New Jersey, EUA) partindo-se de um ciclo inicial de desnaturação a  $94^{\circ}\text{C}$  por 3 min, seguido de 30

ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 54 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min, com 1 ciclo de extensão final a 72 °C por 7 min.

## **5.2. Detecção dos Genes de Resistência à Eritromicina**

A caracterização dos genes que codificam para os diferentes fenótipos de resistência à eritromicina foi realizada de acordo com técnica descrita por Sutcliffe, Tait-Kamradt & Wondrack (1996) para pesquisa dos genes *erm(A)*, *erm(B)* e *mef(A)*.

### **5.2.1. Extração do DNA**

O procedimento de extração do DNA bacteriano foi realizado conforme descrito no item 5.1.1.

### **5.2.2. PCR**

A mistura da reação, em volume final de 30µl foi composta de 1µl do extrato de DNA, 1x PCR buffer (10mM Tris, 50mM KCl [pH 8.3]) (Invitrogen), 0,25mM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (Invitrogen), 0,5µM de de cada seqüência iniciadora, 1,5U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 2,0mM [para detecção do gene *erm(B)*] ou 4,0mM [para detecção dos genes *erm(A)* e *mef(A)*] de cloreto de magnésio (Invitrogen), 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3) e 2mM de cloreto de magnésio. As amplificações, realizadas em termociclador (GeneAmp PCR System 2400),



foram compostas de 1 ciclo de desnaturação inicial por 3 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 93°C para desnaturação, anelamento a 52°C por 1 min [no caso dos genes *erm(A)* e *erm(B)*] ou 54°C por 1 min [no caso do gene *mef(A)*], e 1 min a 72°C para extensão. Para extensão final, foi utilizado um ciclo de 5 min a 72°C.

### **5.3. Detecção dos Genes de Resistência a Níveis Elevados de Aminoglicosídeos**

A amplificação dos genes que determinam resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos foi pesquisada através de reações de PCR multiplex, de acordo com Vakulenko e colaboradores (2003). Nessas reações, foram pesquisados os seguintes determinantes genéticos: *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id*, *aph(III')-IIIa* e *ant(4')-Ia*. A amplificação do gene *ant(6)-I* foi realizada de acordo com Swenson e colaboradores (1995).

#### **5.3.1. Extração do DNA**

O procedimento de extração do DNA bacteriano foi realizado conforme descrito no item 5.1.1.

#### **5.3.2. PCR**

Para o PCR multiplex, a mistura da reação, no volume final de 50µl, foi composta por 5µl de DNA molde, 1x PCR buffer (10mM Tris, 50mM KCl [pH 8.3]) (Invitrogen), 1,5mM de cloreto de magnésio (Invitrogen), 0,1mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (Invitrogen) e 2,5U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As seqüências iniciadoras foram adicionadas à reação nas seguintes concentrações: 25pmol de *aac(6')-le-aph(2'')-la* e *aph(2'')-lb*, 3,5pmol para *aph(2'')-lc*, 5pmol para *aph(2'')-ld*, 3pmol para *aph(III')-IIIa* e 2pmol para *ant(4')-Ia*. Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador (GeneAmp PCR System 2400), conforme a seguir: uma etapa de desnaturação a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação a 94°C por 40 seg, anelamento a 55°C por 40 seg e extensão a 72°C por 40 seg. Por fim, foi realizada etapa de extensão final por 2 min a 72°C.

Para a amplificação do gene *ant(6)-I*, a reação de PCR foi realizada em um volume final de 100µl, composto por 1x PCR buffer (10mM Tris, 50mM KCl [pH 8.3]) (Invitrogen), 10mM de Tris-HCl (pH 8,3), 2mM de cloreto de magnésio (Invitrogen), 0,2mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (Invitrogen), 0,5µM da seqüência iniciadora e 2,5U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). O procedimento de amplificação foi realizado em termociclador (GeneAmp PCR System 2400) e constou de uma etapa de desnaturação inicial de 10 min a 95°C, seguida de 30 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação a 94°C por 30 seg, uma fase de anelamento a 58°C por 30 seg e uma fase de extensão a 72°C por 30 seg. Após, foi realizada uma etapa de extensão final a 72°C por 10 min.

## 5.4. Detecção dos Genes de Resistência à Tetraciclina

A investigação da presença de determinantes genéticos que codificam resistência a tetraciclina [*tet(M)*, *tet(O)*, *tet(K)* e *tet(L)*] foi realizada por PCR Multiplex, segundo as recomendações de Ng e colaboradores (2001), com algumas modificações.

### 5.4.1. Extração do DNA

O procedimento de extração do DNA bacteriano foi realizado conforme descrito no 5.1.1.

### 5.4.2. PCR

Cada mistura de reação, no volume final de 30 $\mu$ L, foi constituída de 2 $\mu$ L da preparação de DNA, 1x PCR buffer (10mM Tris, 50mM KCl [pH 8.3]) (Invitrogen), 3,0mM de cloreto de magnésio (Invitrogen), 0,3mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (Invitrogen), iniciadores para *tet(K)* (1,25 $\mu$ M), *tet(O)* (1,25 $\mu$ M), *tet(L)* (1,0 $\mu$ M) e *tet(M)* (0,5 $\mu$ M) e 1,5U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As amplificações foram realizadas em termociclador (GeneAmp PCR System 2400) a 94°C por 5 min para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min 30 s, com uma extensão final a 72°C por 5 min.

## 5.5. Eletroforese e Análise dos Produtos Amplificados

A **Tabela 3** mostra os genes pesquisados envolvidos na expressão de resistência a vancomicina, eritromicina, tetraciclina e níveis elevados de aminoglicosídeos, a seqüência dos iniciadores utilizados, o tamanho esperado (em pares de bases – pb) dos fragmentos amplificados e as referências bibliográficas utilizadas.

Os produtos de amplificação de todos os genes de resistência pesquisados foram visualizados em transiluminador, sob luz UV, após eletroforese em gel de agarose a 1,2% (p/v) (Invitrogen) em cuba horizontal (Horizon, Gibco-BRL, Gaithersburg, Maryland, EUA), sob uma corrente constante de 100V. O tampão utilizado na corrida eletroforética foi o TBE 0,5X [Tris base 0,2M, ácido bórico 0,2M e EDTA 0,5M (pH 8,0)]. Os géis foram corados com brometo de etídio 0,5 µg/mL (Sigma Co.) por 30 min, descorados em água Mili-Q (2 vezes/30 min) e, posteriormente, fotografados. Para a estimativa do peso molecular, foi incluído, em cada experimento, o padrão de pares de base 100bp DNA *Ladder* (Invitrogen).

## 6. ANÁLISE DOS PERFIS DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO ATRAVÉS DA ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO

O DNA cromossômico das amostras bacterianas foi analisado após o tratamento com a enzima de restrição *Sma*I e separação dos fragmentos por eletroforese em campo pulsado. A técnica utilizada foi baseada na descrição de

Teixeira e colaboradores (1997), e Mondino e colaboradores (2003), em que o DNA cromossômico é preparado pela técnica da lise *in situ*, em pequenos blocos de agarose (comumente referidos como *plugs*).

Para tal, as amostras bacterianas foram cultivadas em placas contendo TSA-SC por 18h-24h a  $35\pm 2^\circ\text{C}$ . Após esse período, foi preparada uma suspensão com turvação correspondente ao padrão 8,0 da escala de McFarland em 500 $\mu\text{L}$  de tampão PIV [NaCl 1M, Tris-HCl 10mM (pH 7,6)]. Um volume de 500 $\mu\text{L}$  de agarose de baixa temperatura de fusão (NuSieve GTG Agarose; FMC Bioproducts, Rockland, ME, EUA) a 2%, foi adicionado à suspensão e distribuído em moldes específicos. Após solidificação, os blocos de agarose, contendo as células bacterianas, foram submetidos ao tratamento com solução de lise [Tris-HCl 6mM (pH 7,6), NaCl 1M, EDTA 100mM (pH 7,5), 8,5% (p/v) de Brij 58, 0,5% (p/v) de lauril sarcosinato de sódio, 0,2% (p/v) de desoxicolato de sódio, 1mg/mL de lisozima (Sigma Co., 48.000U/mg) e 5U/mL de mutanolisina (Sigma Co., 2.000U/ml)] e incubados por 18h-24h a  $35\pm 2^\circ\text{C}$  sob agitação. Esta solução foi, então, substituída pela solução ESP [EDTA 0,5M (pH 8,0), lauril sarcosinato de sódio a 1% (p/v), proteinase K (Sigma Co., 10-20U/mg) a 0,1mg/mL], seguindo-se de incubação por 18h-24h a  $50^\circ\text{C}$ . Após esta etapa de incubação, foi realizada uma troca de tampão e o material foi re-incubado nas condições acima referidas. Após, os blocos de agarose foram imediatamente preparados para a digestão ou mantidos a  $4^\circ\text{C}$  até serem utilizados.

Antes do tratamento com a enzima de restrição *Sma*I, cada bloco foi lavado com 2mL de tampão TE [Tris-HCl 10mM (pH 7,6), EDTA 0,1mM] por quatro vezes (duas vezes por uma hora e duas vezes por duas horas). Cada bloco foi, então, tratado com o tampão específico da enzima de restrição (New England BioLabs) por 2h na temperatura de 25°C para equilíbrio da reação e, após esse período, incubados com 20U da enzima de restrição *Sma*I (New England BioLabs), durante 18h-24h na temperatura de 25°C. Os blocos foram fundidos a 72°C e, então, aplicados nos reservatórios de géis de corrida, preparados com de agarose a 1,2% (p/v) (Invitrogen) em tampão TBE 0,5X (pH 8,3).

Os fragmentos de restrição foram separados em um sistema de eletroforese em campo pulsado (CHEF DR III, Bio-Rad), empregando os parâmetros: pulso inicial de 5,0 seg e final de 35 seg; voltagem de 6V/cm<sup>3</sup>; temperatura de 12°C; e tempo de corrida de 22h. Padrões de massas moleculares conhecidos (Pulse Marker, 50-1000Kb; Sigma Co.) foram utilizados para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA. Os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5mg/mL), observados em um transiluminador e fotografados sob luz UV.

A análise automatizada dos perfis de fragmentação das amostras bacterianas foi realizada com o auxílio do sistema *Image Analysis System*, empregando o programa *Molecular Analyst Fingerprinting Plus* versão 1.6 (Bio-Rad). O coeficiente de Dice foi utilizado para o cálculo dos índices de similaridade, e o método UPGMA, para a construção do dendrograma.

## RESULTADOS

---

### 1. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS AMOSTRAS BACTERIANAS

#### 1.1. Origem e Identificação das Amostras

Fizeram parte deste estudo 637 amostras coletadas entre janeiro de 1999 e dezembro de 2004. Essas amostras se apresentaram como cocos Gram-positivos aos pares ou em cadeias curtas, não produziram a enzima catalase, e foram positivas para as provas de bile esculina, NaCl a 6,5%, PYR e LAP; sendo, portanto, caracterizadas como pertencentes ao gênero *Enterococcus*.

Em relação ao hospital de origem, a maioria das amostras (51,2%) foi isolada de pacientes internados na PSC, uma das sete unidades hospitalares do complexo. Além desse hospital, as amostras foram também isoladas do HSR (12,9%), HSF (8,6%), HCSA (8,0%), HDVS (6,6%), PPF (6,6%) e HSJ (6,1%). Nesses hospitais, amostras provenientes de UTI representaram os seguintes percentuais: 26,1% na PSC, 15,8% no HSR, 16,4% no HSF, 19,6% no HCSA, 35,7% no HDVS, 14,3% no PPF e 20,5% no HSJ.

Com relação ao sítio de isolamento, as amostras estudadas puderam ser divididas em dois grupos, a saber: (a) amostras recuperadas de sítios clinicamente significantes e (b) amostras recuperadas de culturas de vigilância, coletadas com auxílio de *swabs* retais. *Enterococcus* provenientes de sítios clínicos significativos

representaram a maioria das amostras (n = 534; 83,8%). As fontes de isolamento foram: urina (282/534; 52,8%), ferida operatória (48/534; 9,0%), abscesso (46/534; 8,6%), secreção de cateter (41/534; 7,7%), fluidos estéreis (34/534; 6,4%), sangue (28/538; 5,2%), trato respiratório (4/534; 0,7%), prótese femural (1/534; 0,2%) e prótese cardíaca (1/534; 0,2%). Já, as amostras recuperadas de culturas de vigilância representaram 16,2% do total de amostras (n = 103).

Os fluidos estéreis compreenderam líquido abdominal (17 amostras), seguido de líquido de diálise (12 amostras), líquido peritoneal (5 amostras) e líquido sinovial (1 amostra). E, em relação ao trato respiratório, foi isolada uma amostra de cada um dos seguintes materiais: aspirado traqueal, escarro e lavado broncoalveolar.

A **Tabela 4** apresenta as fontes de isolamento das 637 amostras de *Enterococcus* incluídas no estudo, relacionando-as com a espécie identificada. Importante salientar que para 49 (7,7%) das amostras não foi possível determinar com precisão o espécime clínico de origem do microrganismo, uma vez que estas possuíram apenas informação genérica da origem do isolamento, como “secreção”.

Das 637 amostras bacterianas estudadas, 594 (93,2%) foram caracterizadas como *E. faecalis*, sendo também isolados *E. faecium* (n = 20; 3,1%), *E. gallinarum* (n = 17; 2,7%), *E. casseliflavus* (n = 4; 0,6%), *E. durans* (n = 1; 0,2%) e *E. hirae* (n = 1; 0,2%).



Por se tratar de espécies de isolamento pouco freqüente a partir de seres humanos, as amostras de *E. durans* e *E. hirae* foram também submetidas à identificação utilizando o sistema automatizado MicroScan (Dade Behring). Ambas foram confirmadas com 96 e 93% de probabilidade, respectivamente.

## 1.2. Determinação da Susceptibilidade aos Antimicrobianos

Os percentuais de amostras não-susceptíveis aos antimicrobianos ao longo do período estudado (1999-2004), de acordo com a técnica de disco-difusão e com critérios interpretativos do CLSI (2008), são demonstrados na **Tabela 5** e **Figura 1**. Ao longo do período avaliado, o índice de resistência para virtualmente todos os antimicrobianos aumentou. Para alguns, no entanto, esse aumento foi mais evidente, como é o caso da vancomicina, gentamicina e, especialmente, ciprofloxacina. Por outro lado, o percentual de resistência a níveis elevados de estreptomicina decaiu no decorrer do período avaliado.

Durante os seis anos de estudo, os percentuais de resistência entre enterococos coletados nas diferentes instituições hospitalares avaliadas foram bem variados, sendo que os índices mais elevados foram observados para tetraciclina (59,2%), eritromicina (52,1%) e ciprofloxacina (41,9%). Por outro lado, foi consideravelmente baixa a freqüência de isolamento de amostras apresentando resistência à ampicilia (0,5%) e todos os isolados apresentando esse fenótipo pertenceram à espécie *E. faecium*. Nenhum isolado foi produtor de

$\beta$ -lactamase. Baixo percentual de resistência foi observado também para nitrofurantoína (0,9%).

Embora não tenha sido detectada resistência à linezolida, 6 (0,9%) isolados apresentaram-se com resistência intermediária à essa droga, sendo 5 identificados como *E. faecalis* e 1 como *E. gallinarum*. Não foi detectada resistência à quinupristin/dalfopristin entre amostras não-*E. faecalis*. A resistência à níveis elevados de aminoglicosídeos foi caracterizada em 16,8% das amostras para a estreptomicina e em 30,3% das amostras para a gentamicina.

Ainda pela técnica de disco-difusão, 60 (9,4%) amostras foram resistentes à vancomicina e 6 (0,9%) apresentaram resistência intermediária à esse antimicrobiano. Todas as amostras plenamente resistentes foram identificadas como *E. faecalis*. Já, entre aquelas apresentando resistência intermediária, 4 foram identificadas como *E. gallinarum* (CIM = 8  $\mu\text{g/mL}$ ), 1 como *E. casseliflavus* (CIM = 1  $\mu\text{g/mL}$ ) e 1 como *E. faecalis* (CIM = 2  $\mu\text{g/mL}$ ). Todas as amostras com resistência intermediária foram susceptíveis à teicoplanina. Por outro lado, entre os 60 *E. faecalis* resistentes à vancomicina, 59 mostraram-se, também, resistentes à teicoplanina pela técnica de disco-difusão.

A **Tabela 6** apresenta os resultados da técnica de disco-difusão referentes à frequência de amostras de cada espécie distribuídas nas três categorias (Sensível, Intermediário e Resistente). De uma forma geral, amostras de *E. faecium* apresentaram percentuais de resistência aos antimicrobianos mais

elevados em relação à espécie *E. faecalis*. E, analisando as demais espécies isoladas, os índices de resistência foram, em geral, consideravelmente menores. Nenhum fenótipo de resistência foi observado nas amostras de *E. durans* e *E. hirae*.

Todos os isolados foram submetidos aos testes de triagem para detecção de resistência à vancomicina e resistência à níveis elevados de aminoglicosídeos e ampicilina. Os resultados desses testes e a comparação com resultados dos testes de disco-difusão são demonstrados na **Tabela 7**.

Em relação à triagem para resistência à níveis elevados de ampicilina, houve concordância entre os resultados dos testes fenotípicos. Apenas 3 amostras (0,5%) mostraram-se resistentes, apresentando CIM de ampicilina igual a 16 µg/mL, conforme determinado por E-test®.

Os resultados observados para os testes de disco-difusão e de triagem para resistência a níveis elevados de gentamicina também foram concordantes entre si. Todas as 193 (30,3%) amostras resistentes pelos testes de disco-difusão foram positivas no teste de triagem, sendo as CIMs, determinada por E-test®, maiores que 1024 µg de gentamicina por mililitro.

Em contrapartida, algumas discordâncias em relação à determinação fenotípica da resistência à estreptomicina foram observadas entre as amostras testadas. Cento e nove amostras foram positivas no teste de triagem com

estreptomicina (17,1%). Três isolados (2,7%) da espécie *E. faecalis* apresentaram discrepâncias, sendo caracterizados como susceptíveis à estreptomicina no teste de disco-difusão e tendo resultado positivo no teste de triagem. Todos eles apresentaram CIM maior que 1024 µg de estreptomicina por mililitro, conforme definido através da utilização de fitas de E-test<sup>®</sup>. Ainda, 6 amostras, também identificadas como *E. faecalis*, foram negativas para o teste de triagem em agar e mostraram resistência intermediária à estreptomicina, no teste de disco-difusão. As CIMs para essas 6 amostras foram as seguintes: 64 µg/mL para 2 isolados, 128 µg/mL para 3 isolados e 256 µg/mL para 1 isolado. Por fim, 1 amostra de *E. faecalis* apresentou resultado negativo no teste de triagem e foi caracterizada como resistente pelo teste de disco-difusão. A CIM de estreptomicina, determinada por E-test<sup>®</sup> para tal isolado foi >1024 µg/mL.

As leituras dos testes de triagem para resistência a níveis elevados de estreptomicina foram, em sua maioria, conclusivas após 24 horas de incubação. Cento e quarenta amostras (22,0%) apresentaram resultados positivos apenas após 48 horas, incluindo aquelas apresentando resultados discrepantes entre teste de triagem e de disco-difusão.

A resistência concomitante a níveis elevados de gentamicina e estreptomicina foi observada em 3,0% das amostras, com base nos testes de triagem. De acordo com a técnica de disco-difusão, 2,7% das amostras apresentaram esse fenótipo de resistência simultânea.

Em relação aos testes para a detecção de resistência à vancomicina, foi observado que, dentre as 637 amostras incluídas no estudo, 70 (11,0%) apresentaram-se positivas no teste de triagem para a resistência à vancomicina (CIM  $\geq$  6  $\mu\text{g/mL}$ ). Destas, 60 foram classificados como resistentes pela técnica de disco-difusão. Dentre as demais 10 amostras, 6 mostraram-se susceptíveis à vancomicina no teste de disco-difusão, mesmo apresentado resultados dos testes de triagem positivos e CIMs de 8  $\mu\text{g/mL}$ ; e 4 foram classificadas como intermediárias no teste de disco-difusão, apresentando CIM de 8  $\mu\text{g/mL}$  e resultado positivo no teste de triagem. Duas amostras, para as quais foram obtidos resultados negativos no teste de triagem, apresentaram resistência intermediária à vancomicina pela técnica de disco-difusão e CIM de 1 e 2  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A **Tabela 8** apresenta as características das amostras com resultados não-concordantes nas 3 diferentes técnicas fenotípicas de detecção de resistência à vancomicina.

Dessas 70 amostras de enterococos apresentaram testes de triagem positivos, 10 pertenciam a espécies intrinsecamente resistentes (9 *E. gallinarum* e 1 *E. casseliflavus*) e 60, à espécie *E. faecalis*. Durante o período de avaliação do estudo, não foi observada resistência à vancomicina entre amostras de *E. faecium* isoladas nos hospitais em questão. Todos os isolados de *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* apresentaram CIM de vancomicina igual a 8  $\mu\text{g/mL}$ , sendo que todos foram isolados a partir de culturas de vigilância. Sete amostras de *E. gallinarum*

foram provenientes da UTI adulto do PPF, enquanto que as outras 2, assim como a única amostra de *E. casseliflavus*, foram isoladas de pacientes da UTI do HCSA.

Todas as demais 60 amostras, identificadas como *E. faecalis*, foram consideradas como VRE, uma vez que apresentaram CIM de vancomicina maior que 256 µg/mL. A maioria delas (52/60; 86,7%) foi obtida a partir de culturas de vigilância. As demais foram recuperados dos seguintes espécimes clínicos: urina (3/60), ferida operatória (2/60), secreção de cateter (1/60), abscesso (1/60) e “secreções” (1/60).

A partir da análise dos fenótipos de resistência, foi possível a caracterização de amostras de *Enterococcus* multirresistentes. Para este fim, multirresistência foi aqui definida como a presença concomitante de resistência a três ou mais classes de antimicrobianos. Devido à importância singular da resistência aos glicopeptídeos, essa classe de antimicrobianos não foi incluída no critério de definição de multirresistência, mas, sim, tratada como grupo de amostras a parte. Dentre as 637 amostras, 36,4% (n = 232) apresentaram o fenótipo de multirresistência. A **Tabela 9** apresenta os perfis de susceptibilidade dessas amostras multirresistentes.

A maioria delas (76,7%; n = 178) foi obtida de sítios clinicamente significativos, sendo urina (46,1%; n = 82) o principal espécime envolvido. Além dessas, foram caracterizadas como multirresistentes amostras isoladas de secreção de cateter (13,5%; n=24), ferida operatória (9,6% n = 17), abscessos

(6,7%; n = 12), sangue (6,7%; n = 12), líquido abdominal (3,9%; n = 7), líquido de diálise (2,8%; n = 5), prótese femural (0,6%; n = 1), prótese cardíaca (0,6%; n = 1) e lavado broncoalveolar (0,6%; n = 1). Ainda, 16 (9,2%) amostras foram isoladas de sítios genericamente definidos como “secreções”. A partir de *swabs* retais, foram isoladas 54 (23,3%) amostras multirresistentes.

A análise dos perfis fenotípicos de resistência estratificada por espécie permitiu observar que a característica de multirresistência esteve presente em 40,0% (8/20) das amostras de *E. faecium* e em 37,7% (224/594) dos *E. faecalis*. Amostras com perfil de multirresistência não foram observadas entre as demais espécies.

Quando as 637 amostras de *Enterococcus* foram divididas em dois grupos, susceptíveis e resistentes à vancomicina, algumas peculiaridades foram observadas. Dentre as 567 amostras susceptíveis à vancomicina, 28,4% (n = 161) apresentaram esse fenótipo de multirresistência.

Por outro lado, considerando o grupo de amostras apresentando resistência à vancomicina, peculiaridades em relação à multirresistência foram observadas. A **Tabela 10** apresenta os perfis de susceptibilidade observados entre os *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina. Entre essas amostras de VRE, 91,7% (55/60) mostraram-se multirresistentes, sendo que a maioria delas (42/57) foram resistentes simultaneamente a cinco classes de antimicrobianos

(representadas por ciprofloxacina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina e tetraciclina).

Interessante ressaltar que, enquanto 95,0% (57/60) dessas amostras de VRE apresentaram resistência a níveis elevados de gentamicina, a resistência a níveis elevados de estreptomicina não foi detectada em nenhum desses isolados.

## 2.0. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

### 2.1. Detecção dos Genes de Resistência à Tetraciclina

A investigação da presença dos genes envolvidos na resistência a tetraciclina [*tet(k)*, *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)*] foi realizada por PCR. A distribuição dos determinantes de resistência à tetraciclina está apresentada na **Tabela 11**. Dentre as 377 amostras fenotipicamente resistentes, o gene *tet(M)* foi o prevalente, presente em 90,7% dessas amostras. Por sua vez, *tet(L)* foi caracterizado em 12,2% dos isolados e em 0,8% a reação de PCR foi positiva para o gene *tet(O)*. Não foi detectada a presença do gene *tet(K)*. Um duplo genótipo, associando *tet(L)* e *tet(M)*, foi observado em 15 amostras. Ainda, entre os isolados positivos para o gene *tet(O)*, um carregava também o gene *tet(M)*.

Em relação ao subgrupo de amostras de VRE, foi verificado que, exceto em uma amostra [positiva para o gene *tet(L)*], todas foram positivas para a



amplificação do gene *tet(M)*. Duas delas apresentaram duplo genótipo [*tet(L)* e *tet(M)*].

A **Figura 2** ilustra um gel representativo dos testes para detecção dos genes acima referidos, através da técnica de PCR.

## 2.2. Detecção dos Genes de Resistência à Eritromicina

Entre os três determinantes genéticos [*erm(A)*, *erm(B)* e *mef(A)*] pesquisados nas 332 amostras resistentes à eritromicina, o gene *erm(B)* foi o prevalente, sendo detectado em 99,1% dos isolados. Os três isolados restantes foram positivos para o gene *erm(A)* e pertenciam à espécie *E. faecium*.

Não foi observada, entre as amostras estudadas, a presença do gene *mef(A)*. A **Figura 3** mostra um gel representativo dos resultados de testes de PCR para a pesquisa dos genes relacionados à resistência a eritromicina.

## 2.3. Detecção dos Genes de Resistência a Níveis Elevados de Gentamicina e Estreptomicina

Através de uma reação de PCR multiplex, foram pesquisados os genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id*, *aph(3')-IIIa* e *ant(4')-Ia*. A partir de uma reação simples de PCR, o gene *ant(6)-I*, responsável pela resistência a níveis elevados de estreptomicina foi também pesquisado.

Entre os 193 *Enterococcus* apresentando resistência fenotípica a níveis elevados de gentamicina, 190 (98,5%) apresentaram somente *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* como determinante genético relacionado à esse fenótipo. Em relação às 3 amostras restantes, pertencentes à espécie *E. faecalis*, foi observado um duplo genótipo, associando-se *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* com *aph(3')-IIIa*. Todas as amostras tiveram CIMs para a gentamicina > 1024 µg/mL e todas aquelas que foram caracterizadas como VRE carregavam apenas o gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*.

O gene *ant(6)-I*, por sua vez, foi detectado em todos os isolados apresentando fenótipo de resistência a níveis elevados de estreptomicina. As **Figura 4 e 5** demonstram os géis resultantes das reações de PCR para a pesquisa dos genes relacionados à resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos.

#### **2.4. Detecção dos Genes de Resistência à Vancomicina**

Os determinantes genéticos de resistência à vancomicina foram pesquisados através de PCR multiplex. Dentre as 70 amostras positivas para a triagem em agar com 6 µg de vancomicina por mililitro, 9 (12,8%) apresentaram reação de PCR positiva para o gene *vanC1* (todos pertencentes à espécie *E. gallinarum*), uma (1,4%) para o gene *vanC2/3* (*E. casseliflavus*) e uma (1,4%) para o gene *vanB* (*E. faecalis*). As demais 59 (84,3%) amostras de VRE, todos pertencentes à espécie *E. faecalis*, carregavam o gene *vanA*. Não foi obtida

amplificação dos genes *vanD*, *vanE* e *vanG* para nenhuma das amostras estudadas.

A **Tabela 12** apresenta os genes relacionados aos fenótipos de resistência à vancomicina, bem como as CIMs para os glicopeptídeos, vancomicina e teicoplanina. Por sua vez, a **Figura 6** demonstra um gel representativo das reações de PCR para detecção dos genes de resistência à vancomicina.

### 3.0. ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA POR TÉCNICA DE PFGE

Dentre as 637 amostras de *Enterococcus* isoladas entre janeiro de 1999 e dezembro de 2004 e incluídas nesse estudo, foram selecionados alguns subgrupos para a análise da diversidade genética, através da técnica de PFGE. Nesse sentido, foram formados quatro subgrupos, a saber:

- Grupo 1 (60 amostras): representado por todas as amostras caracterizadas como VRE.
- Grupo 2 (28 amostras): formado por amostras de *E. faecalis* susceptíveis à vancomicina, porém apresentando resistência à níveis elevados de gentamicina associada à um fenótipo de multirresistência. Essas amostras foram distribuídas ao longo do período, incluindo amostras isoladas em todos os anos do estudo (1999 a 2004). À exceção de uma amostra isolada de *swab* retal, todas as demais foram recuperadas de sítios clinicamente

significativos. A **Tabela 13** lista os perfis de susceptibilidade de tais amostras.

- Grupo 3 (12 amostras): foram selecionadas amostras de *E. faecalis* susceptíveis à vancomicina e resistentes a níveis elevados de gentamicina, distribuídas ao longo do período (1999-2004), para fazerem parte desse subgrupo. Entretanto, essas amostras não apresentaram perfis de multirresistência, conforme observado na **Tabela 13**.
- Grupo 4 (11 amostras): representado por amostras sensíveis a níveis elevados de gentamicina distribuídas ao longo do período de estudo, associadas ao menor número de resistências observadas (**Tabela 13**).

O dendrograma, construído a partir da análise automatizada dos padrões de fragmentação do DNA cromossômico obtidos após digestão com a enzima *Sma*I das amostras de VRE, revelou a presença de um *cluster* principal, denominado grupo ou complexo clonal V<sub>A</sub>, do qual fizeram parte 48 (80,0%) amostras. Dentre as demais 12 amostras, três outros grupos clonais foram observados, formados por um número reduzido de amostras: V<sub>B</sub> (incluindo 3 amostras), V<sub>C</sub> (incluindo 2 amostras) e V<sub>D</sub> (incluindo 2 amostras). As amostras restantes apresentaram grande heterogeneidade, não sendo possível agrupá-las, utilizando-se um *cut-off* de 80% similaridade (**Figura 7**).

As amostras representantes do grupo clonal V<sub>B</sub>, as quais apresentaram perfis de fragmentação idênticos, possuíram um único antibiograma, sendo susceptíveis apenas à ampicilina, estreptomicina, nitrofurantoína e linezolida. Quanto aos determinantes genéticos responsáveis pelas resistências observadas, essas amostras também foram idênticas, carreando os genes *aac(6')-Ie-aph(2'')*, *erm(B)*, *tet(M)* e *vanA*. Ainda, foram isoladas no mesmo ano (2004) e possuíram a mesma origem: UTI-PSC. Ambas as amostras do grupo clonal V<sub>C</sub> apresentaram o mesmo antibiograma descrito para o grupo clonal V<sub>B</sub>, porém a origem (PSC e HSR) e o ano do isolamento (2000 e 2004) foram distintos entre elas. Exatamente o mesmo foi observado entre as duas amostras pertencentes ao grupo clonal V<sub>D</sub> (amostras isoladas no PPF e PSC, nos anos de 2000 e 2002, respectivamente). Os mesmos determinantes genéticos observados em V<sub>B</sub> foram caracterizados nos demais (V<sub>C</sub> e V<sub>D</sub>).

Por outro lado, entre as amostras incluídas no grupo clonal V<sub>A</sub>, uma variação mais ampla foi observada. As amostras pertencentes a este grupo clonal apresentaram 13 antibiogramas diferentes, denominados de I a XIII, sendo que a maioria delas (n = 30; 62,5%) tiveram o mesmo antibiograma verificado entre as amostras do grupo clonal V<sub>B</sub>. À exceção do HCSA, os VREs incluídos no grupo clonal V<sub>A</sub> foram recuperados de todos os demais hospitais do complexo. Ainda, em relação ao ano de isolamento, representantes do referido grupo clonal foram detectados desde 2000 até 2004. A **Tabela 14** demonstra os antibiogramas e o hospital de origem das amostras pertencentes aos grupos clonais V<sub>A</sub> e V<sub>B</sub>.

A amostra com reação de PCR positiva para o gene *tet(L)* foi incluída no grupo clonal  $V_A$ . Da mesma forma, pertenceram a este grupo clonal as duas amostras de VRE apresentando duplo genótipo de resistência à tetraciclina [*tet(L)* e *tet(M)*]. O genótipo de resistência à vancomicina comum à todos isolados desse grupo foi *vanA*. Por sua vez, a amostra de VRE carregando o gene *vanB* não foi agrupada nos *clusters* descritos acima.

Na análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, após digestão com *SmaI*, das amostras do Grupo 2, observou-se o predomínio de 2 *clusters*:  $G_A$  e  $G_B$ , compreendendo 50,0% (n = 14) e 25,0% (n = 7) das amostras, respectivamente.

À exceção de duas amostras, todos *E. faecalis* pertencentes ao clone  $G_A$  apresentaram o mesmo antibiograma: resistência à ciprofloxacina, cloranfenicol, eritromicina, norfloxacin e tetraciclina; susceptibilidade à estreptomicina, nitrofurantoína e linezolida, além de vancomicina, conforme critério de inclusão das amostras no Grupo 2 de tipagem molecular, acima descrito. Dentre as duas amostras com perfis de susceptibilidade distintos, uma delas apresentou resistência intermediária à nitrofurantoína e a outra mostrou-se resistente a níveis elevados de estreptomicina.

Representantes do *cluster*  $G_A$  foram isolados durante todo o período do estudo e foram recuperados de espécimes coletados de pacientes internados em seis dos sete hospitais que formam o CHSCPA. Por outro lado, o grupo clonal  $G_B$ ,

isolado nos dois últimos anos do estudo (2003 e 2004), apresentou uma disseminação basicamente limitada a um dos sete hospitais (PSC). O antibiótico observado nas amostras pertencentes à esse grupo clonal foi o mesmo observado de forma predominante entre as amostras incluídas no *cluster* G<sub>A</sub>.

As demais 7 amostras pertencentes ao Grupo 2 (*E. faecalis* multirresistentes apresentando resistência a níveis elevados de gentamicina e susceptibilidade à vancomicina) apresentaram elevado grau de variabilidade genética, muito embora tenham demonstrado perfil de susceptibilidade idêntico ao do grupo clonal G<sub>B</sub> e que predominou entre os representantes do *cluster* G<sub>A</sub>.

Em relação aos determinantes de resistência presentes nas amostras do Grupo 2, observou-se a presença de *erm*(B) e *aac*(6')-*le-aph*(2'')-*la* em todos os isolados, independente do grupo clonal. A resistência à tetraciclina esteve relacionada à presença do gene *tet*(M) na maioria das amostras dos *clusters* G<sub>A</sub> e G<sub>B</sub>, excetuando-se apenas uma amostra de cada um dos clones, nas quais o gene *tet*(L) foi detectado. Ainda, foi observada a ocorrência de duplo genótipo em 3 amostras pertencentes à G<sub>A</sub> (21,4%) e 1 pertencente à G<sub>B</sub> (14,3%). Nas amostras não pertencentes aos clones descritos acima, *tet*(M) esteve relacionado ao fenótipo de resistência à tetraciclina.

A **Figura 8** apresenta um gel representativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico das amostras de *E. faecalis* incluídas no Grupo 2, assim como o dendrograma resultante da análise automatizada.

Em relação ao Grupo 3, constituído por amostras apresentando resistência à níveis elevados de gentamicina, porém com um perfil multissensível, também foram diferenciados dois *clusters* (GS<sub>A</sub> e GS<sub>B</sub>) utilizando-se o *cut-off* de 80% (**Figura 9**). Do *cluster* GS<sub>A</sub> fizeram parte 3 amostras isoladas em 2001, das quais 2 apresentaram resistência à tetraciclina, eritromicina e estreptomicina. Essas amostras foram isoladas em dois hospitais distintos do CHSCPA (HCSA e PSC). Já, entre as 5 amostras agrupadas em GS<sub>B</sub>, 4 foram resistentes à eritromicina e uma resistente ao cloranfenicol. A resistência às quinolonas foi observado em todas as amostras deste *cluster*. O gene *erm*(B) esteve presente nas amostras com resistência à eritromicina, enquanto que o gene *tet*(M) foi detectado entre aquelas resistentes à tetraciclina.

As amostras do Grupo 4 mostraram baixo grau de correlação genética entre si, conforme observado no dendrograma construído a partir da análise dos respectivos perfis de fragmentação do DNA cromossômico após restrição com *Sma*I (**Figura 10**). Apenas duas amostras apresentaram coeficiente de similaridade superior a 80%, muito embora elas não tenham apresentado mesmo antibiograma e tenham sido isoladas de pacientes internados em hospitais distintos (HCSA e PSC).

A correlação genética entre amostras pertencentes aos Grupos 1 e 2 foi determinada através da construção de dendrogramas provenientes da análise computadorizada do perfil de fragmentação obtidos após PFGE de amostras



representativas de cada um dos *clusters* principais caracterizados. A **Figura 11** demonstra tal dendrograma.

**Tabela 1.** Características fenotípicas utilizadas para a identificação das espécies do gênero *Enterococcus* (FACKLAM, CARVALHO & TEIXEIRA, 2002) e gêneros relacionados

Espécie	Características fenotípicas <sup>a</sup>											
	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SUC	PYU	MGP
<b>Grupo I</b>												
<i>E. avium</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	V
<i>E. malodoratus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	V
<i>E. raffinosus</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	V
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. saccharolyticus</i> <sup>b</sup>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>E. pallens</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
<i>E. gilvus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<b>Grupo II</b>												
<i>E. faecalis</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
<i>Lactococcus</i> spp.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. faecium</i>	+	-	+	+	V	V	-	-	-	+	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+	+	V	+	-*	-*	+	+	V	+
<i>E. mundtii</i>	+	-	+	+	V	+	-	-	+	+	-	-
<i>E. gallinarum</i>	+	-	+	+	-	+	-	-*	-	+	-	+
<b>Grupo III</b>												
Todas espécies (ver tabela 2)	-	-	+	V	-	V	V	-	-	-	V	V
<b>Grupo IV</b>												
<i>E. asini</i> <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. sulfureus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
<i>E. cecorum</i> <sup>b</sup>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
<b>Grupo V</b>												
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	-	+	V	+	V	+	+	+	V	+
<i>E. gallinarum</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
<i>E. columbae</i> <sup>b</sup>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>Vagococcus</i> spp.	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+

<sup>a</sup>MAN, manitol; SOR, sorbose; ARG, arginina; ARA, arabinose; SBL, sorbitol; RAF, rafinose; TEL, telurito de potássio a 0,04%; MOT, motilidade; PIG, pigmento; SUC, sacarose; PYU, piruvato; MGP, metil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo; +, >90% positivo; V, variável; +\* ou -\*, exceções ocasionais (< 3% das cepas mostram reações aberrantes).

<sup>b</sup>Características fenotípicas baseadas em dados das cepas tipo.

**Tabela 2.** Características fenotípicas utilizadas para a diferenciação das espécies de *Enterococcus* do grupo III (modificado a partir de FACKLAM, CARVALHO & TEIXEIRA, 2002)

Espécie	Características fenotípicas <sup>a</sup>										
	LM	PYU	HIP	TEL	ARA	GYL	RAF	SUC	TRE	XYL	MGP
<i>E. durans</i>	A/C	-/0	+/82	-/0	-/0	-/0	-/0	-/0	+/100	-/	-/0
<i>E. villorum</i>	A/-	-/0	-/0	-/0	-/0	-/0	-/0	-/0	+/100	+/100	-/0
<i>E. ratti</i>	-/-	-/0	V/60	-/0	-/0	-/0	-/0	-/0	-/20	-/	-/0
<i>E. hirae</i>	A/-	-/6	-/3	-/0	-/0	-/5	+/100	+/100	+/100	-/	-/0
<i>E. dispar</i>	A/-	+/100	+/100	-/0	-/0	+/100	+/100	+/100	+/100	-/	+/100
<i>E. faecalis</i> <sup>b</sup>	A/C	+/76	-/13	+/88	-/0	-/12	--/0	-/0	-/12	-/	-/0
<i>E. faecium</i> <sup>b</sup>	A/V	-/0	V/56	-/6	+/100	-/6	-/13	-/13	+/75	-/	-/0

<sup>a</sup>LM, *litmus milk*; A, ácido; C, formação de coágulo; PYU, piruvato; HIP, hipurato; TEL, telurito de potássio a 0,04%; ARA, arabinose; GYL, glicerol; RAF, rafinose; SUC, sacarose; TER, trealose; XYL, xilose; MGP, metil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo; + ou - ou V/ número, interpretação/percentual de positivos; +, 85% ou mais de cepas positivas; -, 15% ou menos de cepas positivas; V, reações variáveis (16% a 84% de reações positivas).

<sup>b</sup>Variantes manitol-negativas.

**Tabela 3.** Seqüências iniciadoras utilizadas nos testes para pesquisa dos genes relacionados à resistência aos antimicrobianos

Antimicrobiano	Gene	Seqüência iniciadora (5'-3')	Amplicon	Referência
Vancomicina	<i>vanA</i>	CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA	732 pb <sup>a</sup>	Depardieu <i>et al.</i> (2004); Statake <i>et al.</i> (1997)
	<i>vanB</i>	GTGACAAACCGGAGGCGAGGA CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA	635 pb	
	<i>vanC1</i>	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	822 pb	
	<i>vanC2/3</i>	CGGGGAAGATGGCAGTAT CGCAGGGACGGTGATTTT	484 pb	
	<i>vanD</i>	TGTGGGATGCGATATTCAA TGCAGCCAAGTATCCGGTAA	500 pb	
	<i>vanE</i>	TGTGGTATCGGAGCTGCAG ATAGTTTAGCTGGTAAC	430 pb	
	<i>vanG</i>	CGGCATCCGTGTTTTTGA GAACGATAGACCAATGCCTT	941 pb	
Eritromicina	<i>Erm(A)</i>	GCA TGA CAT AAA CCT TCA AGG TTA TAA TGA AAC AGA	206 pb	Sutcliffe, Tait- Kamradt & Wondrack (1996)
	<i>Erm(B)</i>	GAA AGG GTA CTC AAC CAA ATA AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC	640 pb	
	<i>mef(A)</i>	AGT ATC ATT AATCAC TAG TGC TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG	348 pb	
HLR-A <sup>b</sup>	<i>aac(6')-le-aph(2'')-Ia</i>	CAGGAATTTATCGAAAATGGTAGAAAAG CACAATCGACTAAAGAGTACCAATC	369 pb	Vakulenko <i>et al.</i> (2003)
	<i>aph(2'')-Ib</i>	CTTGACGCTGAGATATATGAGCAC GTTTGTAGCAATTCAGAAACACCCTT	867 pb	
	<i>aph(2'')-Ic</i>	CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG	444 pb	
	<i>aph(2'')-Id</i>	GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC	641 pb	
	<i>aph(3')-IIIa</i>	GGCTAAAATGAGAATATCACCGG CTTTAAAAAATCATACAGCTCGCG	523 pb	
	<i>ant(4')-Ia</i>	CAAAGTCTAAATCGGTAGAAGCC GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT	294 pb	
	<i>ant(6)-I</i>	ACT GGC TTA ATC AAT TTG GG GCC TTT CCG CCA CCT CAC CG	577 pb	
Tetraciclina	<i>tet(K)</i>	TCG ATA GGA ACA GCA GTA CAG CAG ATC CTA CTC CTT	169 pb	Ng <i>et al.</i> (2001)
	<i>tet(L)</i>	TCG TTA GCG TGC TGT CAT TC GTA TCC CAC CAA TGT CAGC CG	267 pb	
	<i>tet(M)</i>	GTG GAC AAA GGT ACA ACG AG CGG TAA AGT TCG TCA CAC AC	406 pb	
	<i>tet(O)</i>	AAC TTA GGC ATT CTG GCT CAC TCC CAC TGT TCC ATA TCG TCA	515 pb	

<sup>a</sup>pb, pares de bases;

<sup>b</sup>HLR-A, High-Level resistance to aminoglycosides

**Tabela 4:** Fonte de isolamento das amostras de *Enterococcus* incluídas no presente estudo

Espécie (nº de isolados)	Material – nº de isolados (%)										
	Urina	“Secreções” <sup>a</sup>	Abscesso	Ferida operatória	Cateter	Fluidos estéreis <sup>b</sup>	Sangue	Trato respiratório <sup>c</sup>	Prótese cardíaca	Prótese femoral	Swab retal
<i>E. faecalis</i> (594)	275 (46,3)	48 (8,1)	44 (7,4)	43 (7,2)	39 (6,6)	31 (2,5)	23 (3,9)	3 (0,5)	1 (0,2)	1 (0,2)	86 (14,5)
<i>E. faecium</i> (20)	6 (30,0)	1 (5,0)	1 (5,0)	3 (15,0)	-	4 (20)	5 (25,0)	-	-	-	-
<i>E. gallinarum</i> (17)	-	-	1 (5,9)	2 (11,8)	1 (5,9)	-	-	-	-	-	13 (76,5)
<i>E. casseliflavus</i> (4)	1 (25,0)	-	-	-	1 (25,0)	-	-	-	-	-	2 (50,0)
<i>E. durans</i> (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (100)
<i>E. hirae</i> (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (100)

<sup>a</sup>amostras que tiveram a fonte de isolamento genericamente definida como “secreções”

<sup>b</sup>incluem: líquido abdominal; líquido de diálise; líquido peritoneal e líquido sinovial

<sup>c</sup>incluem uma amostra de cada um dos seguintes espécimes: aspirado traqueal, escarro e lavado broncoalveola

**Tabela 5.** Ocorrência de amostras de *Enterococcus* não-susceptíveis a antimicrobianos em hospitais da cidade de Porto Alegre, no decorrer do período do estudo (1999-2004)

Percentual de amostras não susceptíveis de acordo com o ano de isolamento <sup>a</sup>														
ATM <sup>b</sup>	1999 (n =79)		2000 (n =123)		2001 (n =121)		2002 (n =83)		2003 (n =75)		2004 (n =156)		TOTAL (n =637)	
	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R
AMP	0	0	0	0	0	0,8	0	0	0	2,7	0	0	0	0,5
CIP	16,4	17,7	11,4	37,4	6,6	38,8	8,4	45,8	8,0	44,0	7,0	57,0	9,3	41,9
CLO	17,7	24,0	18,7	35,8	6,6	35,5	8,4	32,5	17,3	40,0	15,4	41,7	14,0	35,8
ERI	36,7	45,6	34,9	47,1	20,7	59,5	7,2	53,0	12,0	49,3	16,7	54,5	21,7	52,1
EST	0	27,8	0,8	17,1	0	19,8	0	16,9	1,3	18,7	2,6	7,7	0,9	16,6
GEN	0	12,7	0	26,8	0	33,1	0	32,5	0	29,3	0	39,1	0	30,3
LIN	1,3	0	3,2	0	0,8	0	0	0	0	0	0	0	0,9	0
NIT	1,3	1,3	0	0	0	0	0	0	0	2,7	0	1,9	0,3	0,9
NOR	13,9	8,9	12,2	33,3	8,3	30,6	7,2	36,1	12,0	41,3	7,7	56,4	9,9	36,7
Q/D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TEC	0	0	0	7,3	0	10,7	0	10,8	0	9,3	0	13,5	0	9,3
TET	5,1	55,7	1,6	61,0	1,6	56,2	1,2	51,8	4,0	66,7	3,2	62,2	2,7	59,2
VAN	0	0	0	7,3	3,3	11,6	23,5	10,8	2,7	9,3	0	13,5	0,9	9,4

<sup>a</sup>categoria de susceptibilidade: I, intermediário; R, resistente.

<sup>b</sup>ATM, antimicrobianos: AMP, ampicilina; CIP, ciprofloxacina; CLO, cloranfenicol; ERI, eritromicina, EST, estreptomicina; GEN, gentamicina; LIN, linezolida; NIT, nitrofurantoína; NOR, norfloxacina; Q/D, quinupristina/dalfopristina; TEC, teicoplanina; TET, tetraciclina; VAN, vancomicina;

**Tabela 6.** Susceptibilidade aos antimicrobianos entre 637 amostras de *Enterococcus*, isoladas em hospitais da cidade de Porto Alegre, de acordo com as diferentes espécies identificadas

ATM <sup>b</sup>	Espécies / Categoria de Susceptibilidade <sup>a</sup> (% de Amostras)											
	<i>E. faecalis</i> (n = 594)			<i>E. faecium</i> (n=20)			<i>E. gallinarum</i> (n = 17)			<i>E. casseliflavus</i> (n =4)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
<b>AMP</b>	100	0	0	85,0	0	15,0	100	0	0	100	0	0
<b>CIP</b>	48,1	8,9	42,9	35,0	15,0	50,0	76,5	17,6	5,9	75,0	0	25,0
<b>CLO</b>	48,8	13,6	37,5	55,0	25,0	20,0	76,5	17,6	5,9	100	0	0
<b>ERI</b>	23,7	22,5	53,7	30,0	15,0	55,0	82,3	5,9	11,8	100	0	0
<b>EST</b>	82,1	0,8	18,3	70,0	5,0	25,0	94,1	0	5,9	100	0	0
<b>GEN</b>	68,4	0	31,6	50,0	0	50,0	100	0	0	100	0	0
<b>LIN</b>	99,2	0,8	0	100	0	0	94,1	5,9	0	100	0	0
<b>NIT</b>	98,8	0,3	0,8	95,0	0	5,0	100	0	0	100	0	0
<b>NOR</b>	52,9	9,2	37,9	35,0	15,0	50,0	64,7	23,5	11,8	75,0	25,0	0
<b>Q/D</b>	NA <sup>c</sup>	NA	NA	100	0	0	100	0	0	100	0	0
<b>TEC</b>	90,1	0	9,9	100	0	0	100	0	0	100	0	0
<b>TET</b>	37,0	2,7	60,3	25,0	5,0	70,0	70,6	0	29,4	100	0	0
<b>VAN</b>	89,7	0,2	10,1	100	0	0	76,5	23,5	0	75,0	25,0	0

<sup>a</sup>categoria de susceptibilidade:S, sensível; I, intermediário; R, resistente.

<sup>b</sup>ATM, antimicrobianos; AMP, ampicilina; CIP, ciprofloxacina; CLO, cloranfenicol; ERI, eritromicina, EST, estreptomicina; GEN, gentamicina; LIN, linezolida; NIT, nitrofurantoína; NOR, norfloxacina; Q/D, quinupristin/dalfopristin; TEC, teicoplanina; TET, tetraciclina; VAN, vancomicina;

<sup>c</sup>NA, não aplicável.

**Tabela 7.** Comparação dos resultados obtidos nos testes fenotípicos (disco-difusão e triagem em agar) para determinação da resistência à níveis elevados de ampicilina e aminoglicosídeos e da resistência à vancomicina, entre amostras de *Enterococcus* isoladas em hospitais de Porto Alegre

Antimicrobiano / Categoria de Susceptibilidade <sup>a</sup> no teste de DD <sup>b</sup> (n <sup>o</sup> )												
ATM/ resultado triagem em agar <sup>c</sup> (n <sup>o</sup> )	Ampicilina			Estreptomicina			Gentamicina			Vancomicina		
	S (634)	I	R (3)	S (524)	I (6)	R (107)	S (444)	I	R (193)	S (571)	I (6)	R (60)
<b>Ampicilina</b>												
POS (3)	-	-	3									
NEG (634)	634	-	-									
<b>Estreptomicina</b>												
POS (109)				3	-	106						
NEG (528)				520	6	1						
<b>Gentamicina</b>												
POS (193)							-	-	193			
NEG (444)							444	-	-			
<b>Vancimicina</b>												
POS (70)										6	4	60
NEG (567)										565	2	

<sup>a</sup>Categoria de susceptibilidade: S, sensível; I, intermediário; R, resistente.

<sup>b</sup>DD: disco-difusão

<sup>c</sup>ATM, antimicrobiano; POS, positivo; NEG, negativo.



**Tabela 8.** Características fenotípicas das amostras de *Enterococcus* apresentando resultados discordantes entre os testes de disco-difusão e triagem em agar para a caracterização de resistência à vancomicina

Amostra	Identificação	Resultado triagem em agar <sup>a</sup>	Resultado disco-difusão <sup>b</sup>	CIM <sup>c</sup> (µg/mL)
346	<i>E. gallinarum</i>	+	I	8
347	<i>E. gallinarum</i>	+	I	8
354	<i>E. gallinarum</i>	+	I	8
501	<i>E. gallinarum</i>	+	I	8
324	<i>E. gallinarum</i>	+	S	8
325	<i>E. casseliflavus</i>	+	S	8
326	<i>E. gallinarum</i>	+	S	8
348	<i>E. gallinarum</i>	+	S	8
351	<i>E. gallinarum</i>	+	S	8
368	<i>E. gallinarum</i>	+	S	8
315	<i>E. casseliflavus</i>	-	I	2
376	<i>E. faecalis</i>	-	I	1

<sup>a</sup>+, resultado positivo no teste de triagem em agar; -, resultado negativo no teste de triagem em agar.

<sup>b</sup>I, intermediário; S, sensível.

<sup>c</sup>CIM, Concentração Inibitória Mínima, determinada por E-test<sup>®</sup>.

**Tabela 9.** Antibiotipos definidos com base nos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos, entre as 232 amostras de *Enterococcus* apresentando fenótipo de multirresistência<sup>a</sup> e sua relação com as espécies

AB <sup>C</sup> (n)	Antimicrobianos <sup>b</sup>											Espécie (n)
	AMP	CIP	CLO	ERI	EST	GEN	LIN	NIT	NOR	TET	VAN	
I (59)	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	<i>E. faecalis</i> (58) <i>E. faecium</i> (1)
II (42)	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	<i>E. faecalis</i> (42)
III (20)	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	<i>E. faecalis</i> (20)
IV (11)	S	R	I	R	S	R	S	S	R	R	S	<i>E. faecalis</i> (9) <i>E. faecium</i> (2)
V (9)	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	<i>E. faecalis</i> (7) <i>E. faecium</i> (2)
VI (1)	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	<i>E. faecalis</i> (1)
VII (1)	S	R	R	R	S	R	S	I	R	R	S	<i>E. faecalis</i> (1)
VII (1)	S	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S	<i>E. faecalis</i> (1)
IX (1)	S	R	R	R	R	R	S	S	I	R	S	<i>E. faecalis</i> (1)
X (1)	S	R	R	R	I	R	S	S	R	R	S	<i>E. faecalis</i> (1)
XI (1)	S	R	I	R	S	R	S	S	S	R	R	<i>E. faecalis</i> (1)
XII (3)	S	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	<i>E. faecalis</i> (3)
XIII (6)	S	R	S	R	S	R	S	S	R	R	S	<i>E. faecalis</i> (6)
XIV (7)	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	<i>E. faecalis</i> (7)
XV (6)	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	<i>E. faecalis</i> (6)
XVI (5)	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	<i>E. faecalis</i> (5)
XVII (4)	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	<i>E. faecalis</i> (4)
XVIII (4)	S	I	R	R	R	S	S	S	S	R	S	<i>E. faecalis</i> (4)
XIX (4)	S	S	R	R	S	R	S	S	S	R	S	<i>E. faecalis</i> (4)
XX (1)	S	R	R	I	R	S	S	S	R	R	S	<i>E. faecalis</i> (3)
XXI (3)	S	R	I	R	S	R	S	S	R	S	S	<i>E. faecalis</i> (3)
XXII (3)	S	R	I	R	S	R	S	S	R	S	S	<i>E. faecalis</i> (3)
XXIII (3)	S	R	S	R	S	R	S	S	R	S	S	<i>E. faecalis</i> (3)
XXIV (3)	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	<i>E. faecalis</i> (3)
XXV (3)	S	I	S	R	R	S	S	S	S	R	S	<i>E. faecalis</i> (3)

AB <sup>c</sup>	Antimicrobianos <sup>b</sup>											Espécie (n)
	AMP	CIP	CLO	ERI	EST	GEN	LIN	NIT	NOR	TET	VAN	
XXVI (2)	S	R	R	I	S	R	S	S	R	R	R	<i>E. faecalis</i> (2)
XXVII (2)	S	R	S	R	R	S	S	S	R	R	S	<i>E. faecalis</i> (2)
XXVIII (2)	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	<i>E. faecalis</i> (2)
XXIX (2)	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S	<i>E. faecalis</i> (2)
XXX (1)	S	R	R	R	S	R	S	S	R	I	S	<i>E. faecalis</i> (1)
XXXI (1)	S	R	R	S	S	R	S	S	R	S	I	<i>E. faecalis</i> (1)
XXXII (1)	S	R	S	R	I	R	S	S	R	S	S	<i>E. faecalis</i> (1)
XXXIII (1)	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	<i>E. faecalis</i> (1)
XXXIV (1)	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	<i>E. faecalis</i> (1)
XXXV (1)	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	<i>E. faecalis</i> (1)
XXXVI (1)	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	<i>E. faecalis</i> (1)
XXXVII (1)	S	R	R	S	I	S	S	S	R	R	S	<i>E. faecium</i> (1)
XXXVIII (2)	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	<i>E. faecalis</i> (1) <i>E. faecium</i> (1)
XL (1)	S	R	I	R	S	S	S	S	I	R	S	<i>E. faecalis</i> (1)
LI (1)	S	R	I	R	S	S	S	S	R	R	S	<i>E. faecalis</i> (1)
LII (1)	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	<i>E. faecium</i> (1)
LIII (1)	S	I	R	R	R	S	S	S	I	R	S	<i>E. faecalis</i> (1)
LIV (1)	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S	<i>E. faecalis</i> (1)
LV (1)	S	S	I	R	R	R	S	S	S	R	S	<i>E. faecalis</i> (1)
LVI (1)	S	S	I	R	S	R	S	S	R	S	R	<i>E. faecalis</i> (1)
LVII (1)	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	<i>E. faecalis</i> (1)
LVIII (1)	S	I	S	R	S	S	S	S	I	R	R	<i>E. faecalis</i> (1)
LIX (1)	S	I	S	R	R	S	S	S	I	R	S	<i>E. faecalis</i> (1)
LX (1)	S	R	I	I	S	R	S	S	S	R	S	<i>E. faecalis</i> (1)
LXI (1)	S	I	I	R	R	S	S	S	S	R	S	<i>E. faecalis</i> (1)

<sup>a</sup> multirresistência: presença de resistência simultânea a, pelo menos, três classes de antimicrobianos

<sup>b</sup> Categoria de susceptibilidade: S, sensível; I, intermediário; R, resistente; AMP, ampicilina; CIP, ciprofloxacina; CLO, cloranfenicol; ERI, eritromicina; EST, estreptomicina; GEN, gentamicina; LIN, linezolida; NIT, nitrofurantoína; NOR, norfloxacina; TEC, teicoplanina; TET, tetraciclina; VAN, vancomicina

<sup>c</sup>AB, antibiótipo.

**Tabela 10.** Antibiotipos definidos com base nos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos entre amostras de VRE, isoladas durante o período do estudo

AB <sup>b</sup> (n)	Antimicrobianos <sup>a</sup>											Espécie (n)
	AMP	CIP	CLO	ERI	EST	GEN	LIN	NIT	NOR	TET	VAN	
I <sub>v</sub> (42)	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	<i>E. faecalis</i> (42)
II <sub>v</sub> (6)	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	<i>E. faecalis</i> (6)
III <sub>v</sub> (2)	S	R	R	I	S	R	S	S	R	R	R	<i>E. faecalis</i> (2)
IV <sub>v</sub> (1)	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	<i>E. faecalis</i> (1)
V <sub>v</sub> (1)	S	R	I	S	S	R	S	S	R	R	R	<i>E. faecalis</i> (1)
VI <sub>v</sub> (1)	S	R	I	R	S	R	S	S	R	R	R	<i>E. faecalis</i> (1)
VII <sub>v</sub> (1)	S	S	I	R	S	R	S	S	R	S	R	<i>E. faecalis</i> (1)
VIII <sub>v</sub> (1)	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	<i>E. faecalis</i> (1)
IX <sub>v</sub> (1)	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	<i>E. faecalis</i> (1)
X <sub>v</sub> (1)	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	<i>E. faecalis</i> (1)
XII <sub>v</sub> (1)	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	<i>E. faecalis</i> (1)
XIII <sub>v</sub> (1)	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	<i>E. faecalis</i> (1)
XIV <sub>v</sub> (1)	S	I	S	R	S	S	S	S	I	R	R	<i>E. faecalis</i> (1)

<sup>a</sup>Categoria de susceptibilidade: S, sensível; I, intermediário; R, resistente; AMP, ampicilina; CIP, ciprofloxacina; CLO, cloranfenicol; ERI, eritromicina; EST, estreptomicina; GEN, gentamicina; LIN, linezolida; NIT, nitrofurantóina; NOR, norfloxacina; TEC, teicoplanina; TET, tetraciclina; VAN, vancomicina

<sup>b</sup>AB, antibiotipo.

**Tabela 11.** Distribuição, por espécie, dos genes de resistência à tetraciclina entre 377 amostras de *Enterococcus* resistentes à tetraciclina, isolados em hospitais na cidade de Porto Alegre

Espécies	N° de amostras Tet-R <sup>a</sup>	N° de Amostras por Genótipo				
		<i>tet</i> (M)	<i>tet</i> (L)	<i>tet</i> (M) + <i>tet</i> (L)	<i>tet</i> (O)	<i>tet</i> (M) + <i>tet</i> (O)
<i>E. faecalis</i>	358/594	309	31	15	2	1
<i>E. faecium</i>	14/20	14	-	-	-	-
<i>E. gallinarum</i>	5/17	4	1	-	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	0/4	-	-	-	-	-
<i>E. durans</i>	0/1	-	-	-	-	-
<i>E. hirae</i>	0/1	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>377/637</b>	<b>327</b>	<b>32</b>	<b>15</b>	<b>2</b>	<b>1</b>

<sup>a</sup>Tet-R, resistentes a tetraciclina.

**Tabela 12.** Distribuição dos genes de resistência à vancomicina e características fenotípicas de resistência a glicopeptídeos entre amostras de *E. faecalis*

Gene	Espécie (nº de amostras)	CIM <sup>a</sup> de vancomicina (µg/mL)	CIM de teicoplanina (µg/mL)
<i>vanA</i>	<i>E. faecalis</i> (59)	>256	>256
<i>vanB</i>	<i>E. faecalis</i> (1)	>256	1
<i>vanC1</i>	<i>E. gallinarum</i> (9)	8	1
<i>vanC2/3</i>	<i>E. casseliflavus</i> (1)	8	1
<i>vanD</i>	-	-	-
<i>vanE</i>	-	-	-
<i>vanG</i>	-	-	-

<sup>a</sup>CIM, Concentração Inibitória Mínima, determinada por E-test<sup>®</sup>

**Tabela 13.** Características fenotípicas de resistência a antimicrobianos entre amostras de *Enterococcus* isoladas em hospitais da cidade de Porto Alegre, selecionadas para tipagem molecular (grupos 2, 3 e 4), através de PFGE

Grupo/ Subgrupo (n)		Antimicrobianos <sup>a</sup>										
		AMP	CIP	CLO	ERI	EST	GEN	LIN	NIT	NOR	TET	VAN
<b>Gru po 2</b> (n = 28)	2 <sup>a</sup> (26)	S	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S
	2B(1)	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
	2C (1)	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
<b>Gru po 3</b> (n = 12)	3A (2)	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S
	3B (2)	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	I
	3C (2)	S	S	I	R	R	R	S	S	S	S	S
	3D (2)	S	R	S	R	S	R	S	S	R	R	S
	3E (1)	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
	3F(1)	S	R	S	R	I	R	S	S	R	R	S
	3G (1)	S	R	I	S	S	R	S	S	R	R	S
	3H (1)	S	R	I	R	S	R	S	S	R	R	S
<b>Gru po 4</b> (n = 11)	4A (2)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	4B (2)	S	R	S	R	S	S	S	I	R	R	I
	4C (2)	S	R	S	I	S	R	S	S	R	R	S
	4D (1)	S	S	I	I	S	S	S	R	S	S	S
	4E (1)	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R
	4F (1)	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S
	4G (1)	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
	4H (1)	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

<sup>a</sup>Categoria de susceptibilidade: S, sensível; I, intermediário; R, resistente; AMP, ampicilina; CIP, ciprofloxacina; CLO, cloranfenicol; ERI, eritromicina; EST, estreptomicina; GEN, gentamicina; LIN, linezolida; NIT, nitrofurantoína; NOR, norfloxacina; TEC, teicoplanina; TET, tetraciclina; VAN, vancomicina

**Tabela 14.** Características fenotípicas de resistência a antimicrobianos entre amostras de VRE, pertencentes aos complexos clonais V<sub>A</sub> e V<sub>B</sub>, procedentes de hospitais da cidade de Porto Alegre

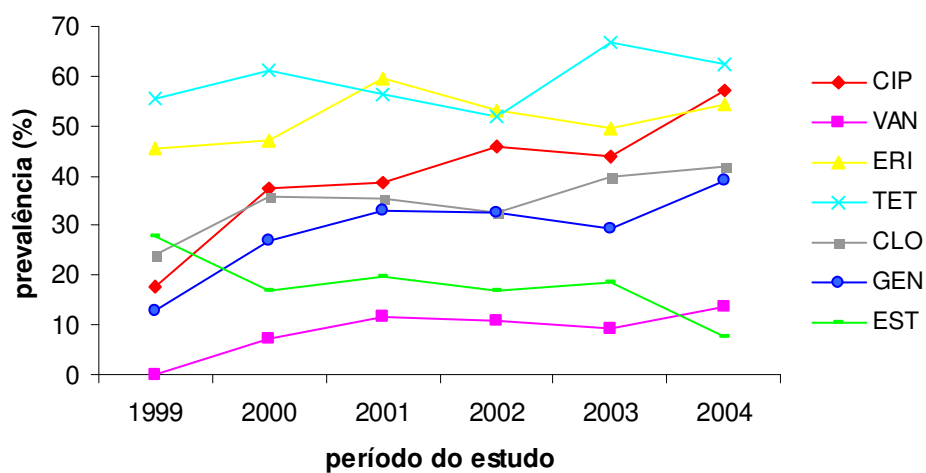
cluster (n)	Antimicrobianos <sup>a</sup>											Origem <sup>b</sup>	
	AMP	CIP	CLO	ERI	EST	GEN	LIN	NIT	NOR	TET	VAN		
V <sub>A</sub> (n = 48)	I (30)	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	PSC (26) HDVS (4)
	II (6)	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	PSC (4) HSJ (2)
	III (2)	S	R	R	I	S	R	S	S	R	R	R	HDVS (1) HSJ (1)
	IV (1)	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	PPF
	V (1)	S	R	I	S	S	R	S	S	R	R	R	PSC
	VI (1)	S	R	I	R	S	R	S	S	R	R	R	PSC
	VII (1)	S	S	I	R	S	R	S	S	R	S	R	PSC
	VIII (1)	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	PSC
	VIV (1)	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	PSC
	X (1)	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	PSC
	XI (1)	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	HSF
	XII (1)	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	PSC
	XIII (1)	S	I	S	R	S	S	S	S	I	R	R	PSC
V <sub>B</sub> (n = 3)	-	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	PSC

<sup>a</sup> Categoria de susceptibilidade: S, sensível; I, intermediário; R, resistente; AMP, ampicilina; CIP, ciprofloxacina; CLO, cloranfenicol; ERI, eritromicina; EST, estreptomicina; GEN, gentamicina; LIN, linezolida; NIT, nitrofurantoína; NOR, norfloxacina; TEC, teicoplanina; TET, tetraciclina; VAN, vancomicina

<sup>b</sup>PSC, Policlínica Santa Clara; HDVS, Hospital Don Vicente Scherer; HSF, Hospital São Francisco; PPF, Pavilhão Pereira Filho; HSJ, Hospital São José; HSR, Hospital Santa Rita

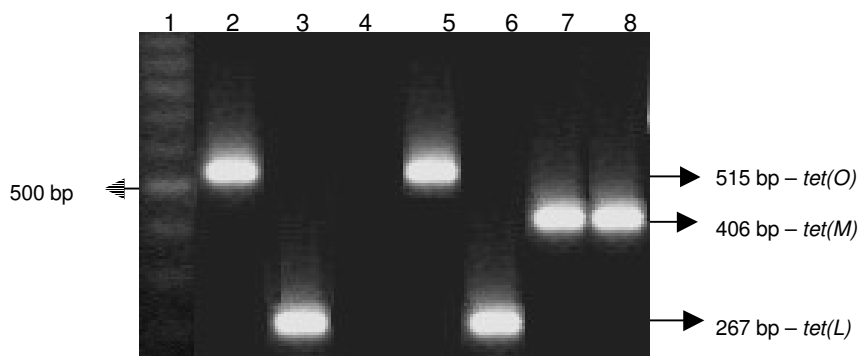


**Figura 1.** Prevalência de amostras de *Enterococcus* resistentes aos diferentes antimicrobianos, de acordo com o período de isolamento, em hospitais da cidade de Porto Alegre



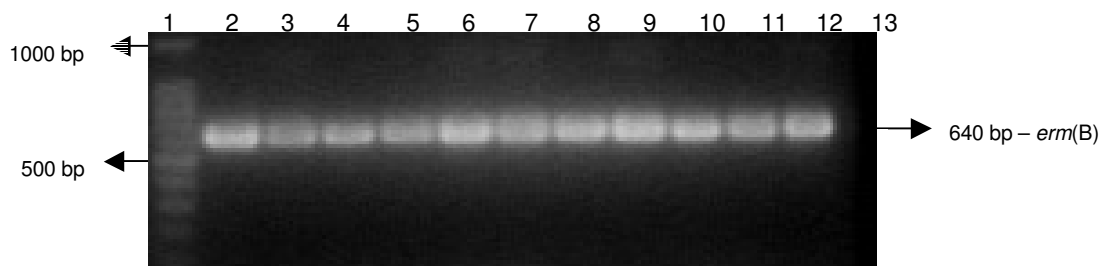
CIP, ciprofloxacina; VAN, vancomicina; ERI, eritromicina; TET, tetraciclina; CLO, cloranfenicol; GEN, gentamicina; EST, estreptomicina

**Figura 2.** Gel representativo da detecção, por técnica de PCR, dos genes relacionados à resistência à tetraciclina em amostras de *Enterococcus* isolados em hospitais da cidade de Porto Alegre



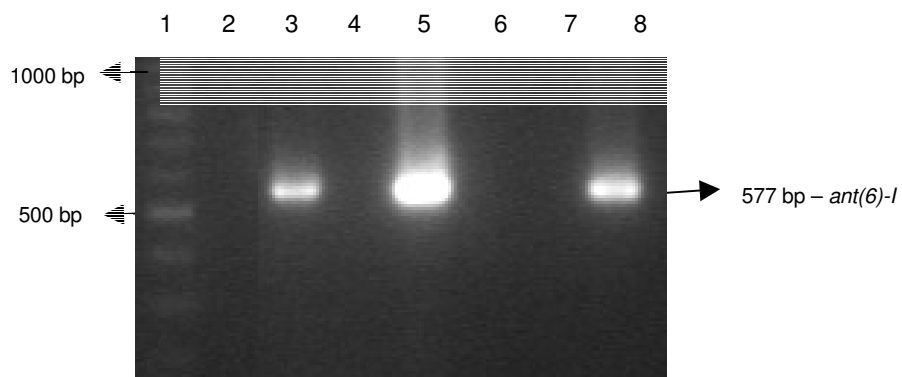
**1.** *Kb ladder* ; **2.** controle + *tet(O)*; **3.** controle + *tet(L)*; **4.** controle - ; **5.** amostra *tet(O)* +; **6.** amostra *tet(L)* +; **7.** amostras *tet(M)* +; **8.** controle + *tet(M)*

**Figura 3.** Gel representativo da detecção, por técnica de PCR, dos genes relacionados à resistência à eritromicina em amostras de *Enterococcus* isolados em hospitais da cidade de Porto Alegre



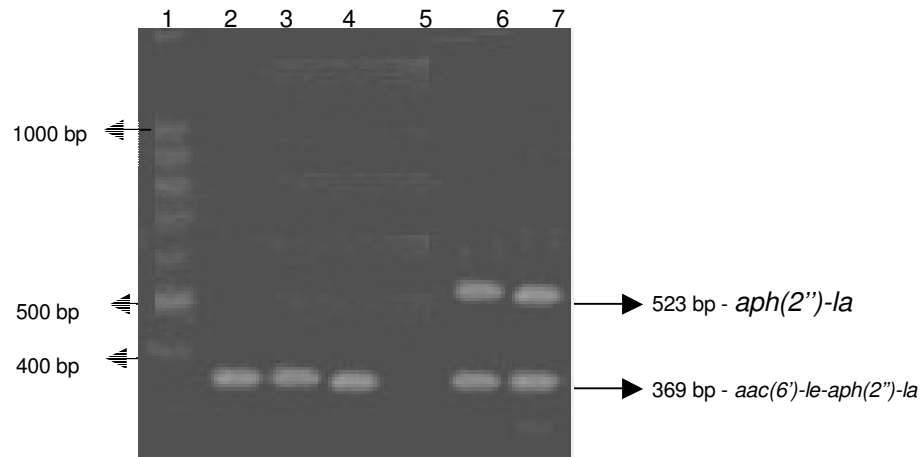
**1.** *Kb ladder* ; **2.** controle + *erm(B)*; **3 a 12.** amostras *erm(B)* +; **13.** controle -

**Figura 4.** Gel representativo da detecção, por técnica de PCR, do gene relacionado à resistência a níveis elevados de estreptomicina em amostras de *Enterococcus* isolados em hospitais da cidade de Porto Alegre



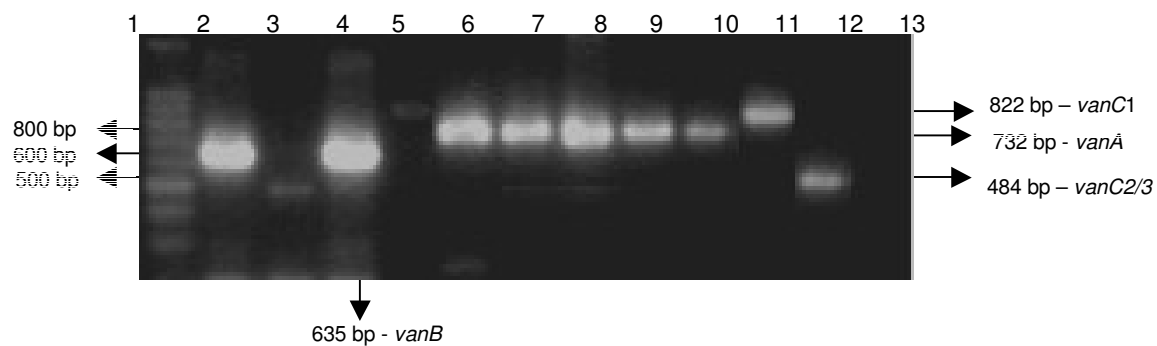
**1.** *Kb ladder*; **2.** controle -; **3.** controle + *ant(6)-I*; **4, 6 e 7.** amostras *ant(6)-I* -; **5 e 8.** amostras *ant(6)-I* +

**Figura 5.** Gel representativo da detecção, por técnica de PCR, do gene relacionado à resistência a níveis elevados de gentamicina em amostras de *Enterococcus* isolados em hospitais da cidade de Porto Alegre



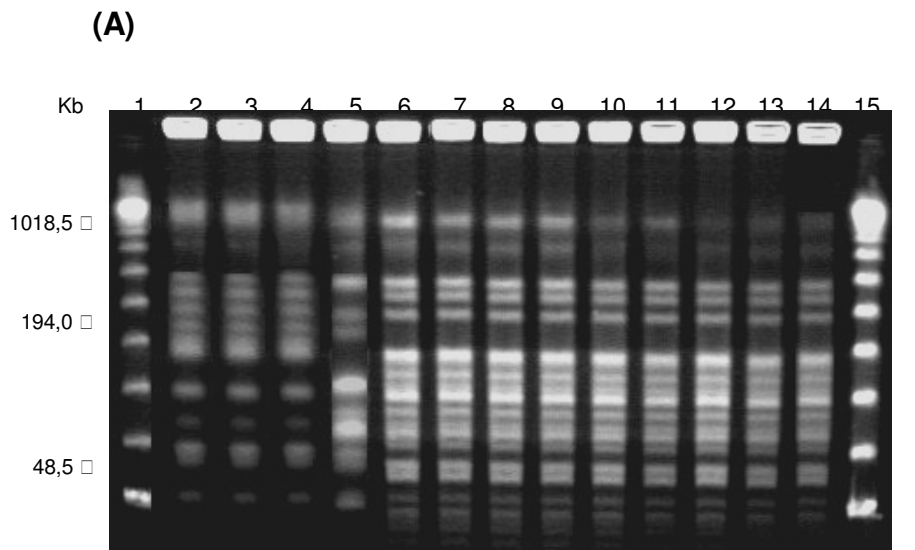
**1.** *Kb ladder*; **2 a 4.** amostras *aac(6')-le-aph(2'')-la* +; **5.** controle -; **6 e 7.** amostras *aac(6')-le-aph(2'')-la* e *aph(2'')-la* +

**Figura 6.** Gel representativo da detecção, por técnica de PCR, dos genes relacionados à resistência à vancomicina em amostras de *Enterococcus* isolados em hospitais da cidade de Porto Alegre

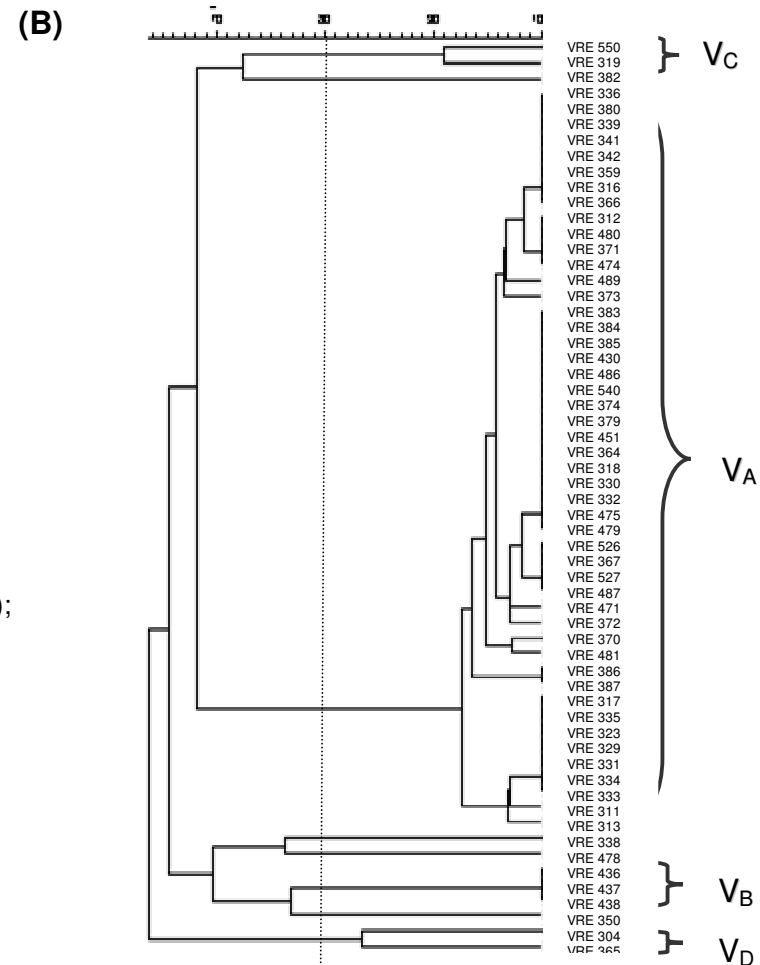


**1.** *Kb ladder*; **2.** controle + *vanB*; **3.** controle + *vanC2/3*; **4.** amostra *vanB* +; **5.** controle + *vanC1*; **6.** controle + *vanA*; **7 a 10.** amostras *vanA* +; **11.** amostra *vanC1* +; **12.** amostra *vanC2/3* +; **13.** controle -

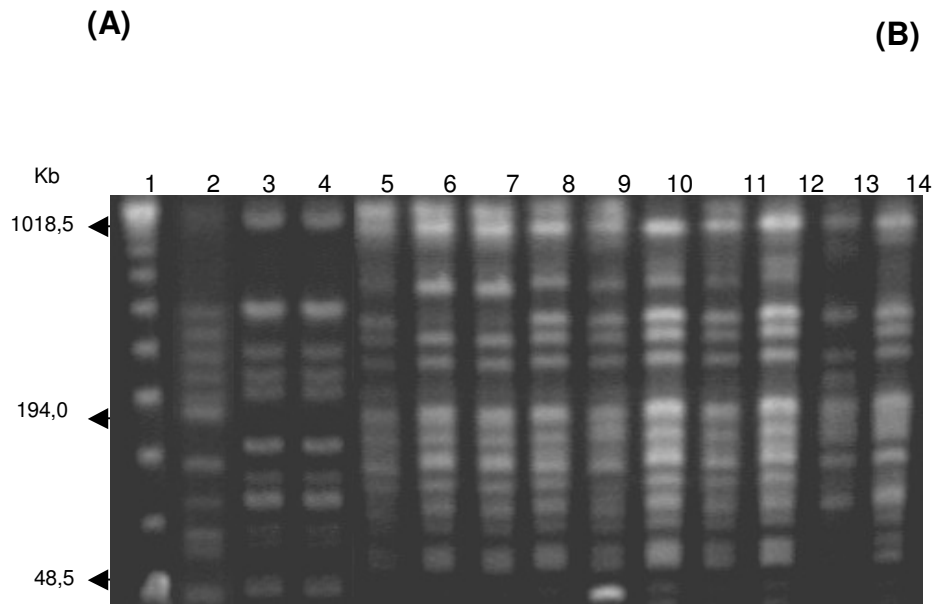
**Figura 7. (A)** Gel representativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, obtidos após digestão com a enzima *Sma*I, de amostras de *Enterococcus faecalis* apresentando resistência plena à vancomicina **(B)** Dendrograma resultante da análise computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico de amostras com tais características



1 e 15. Padrões de Massa Molecular; 2 a 4. amostras representativas do clone  $V_B$  (2. 436; 3. 437; 4. 438); 5. amostra com genótipo *vanB* (550); 6 a 14. amostras representativas do clone  $V_A$  (6. 317; 7. 387; 8. 323; 9. 329; 10. 331; 11. 334; 12. 333; 13. 335; 14. 311)

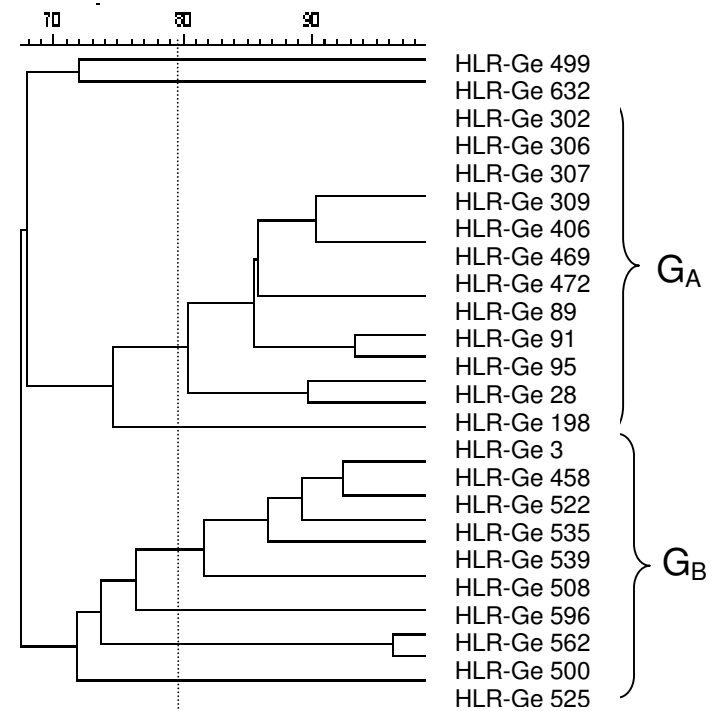


**Figura 8. (A)** Gel representativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, obtidos após digestão com a enzima *Sma*I, de amostras de *Enterococcus faecalis* susceptíveis à vancomicina apresentando HLR-Ge associada a multirresistência **(B)** Dendrograma resultante da análise computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico de amostras com tais características



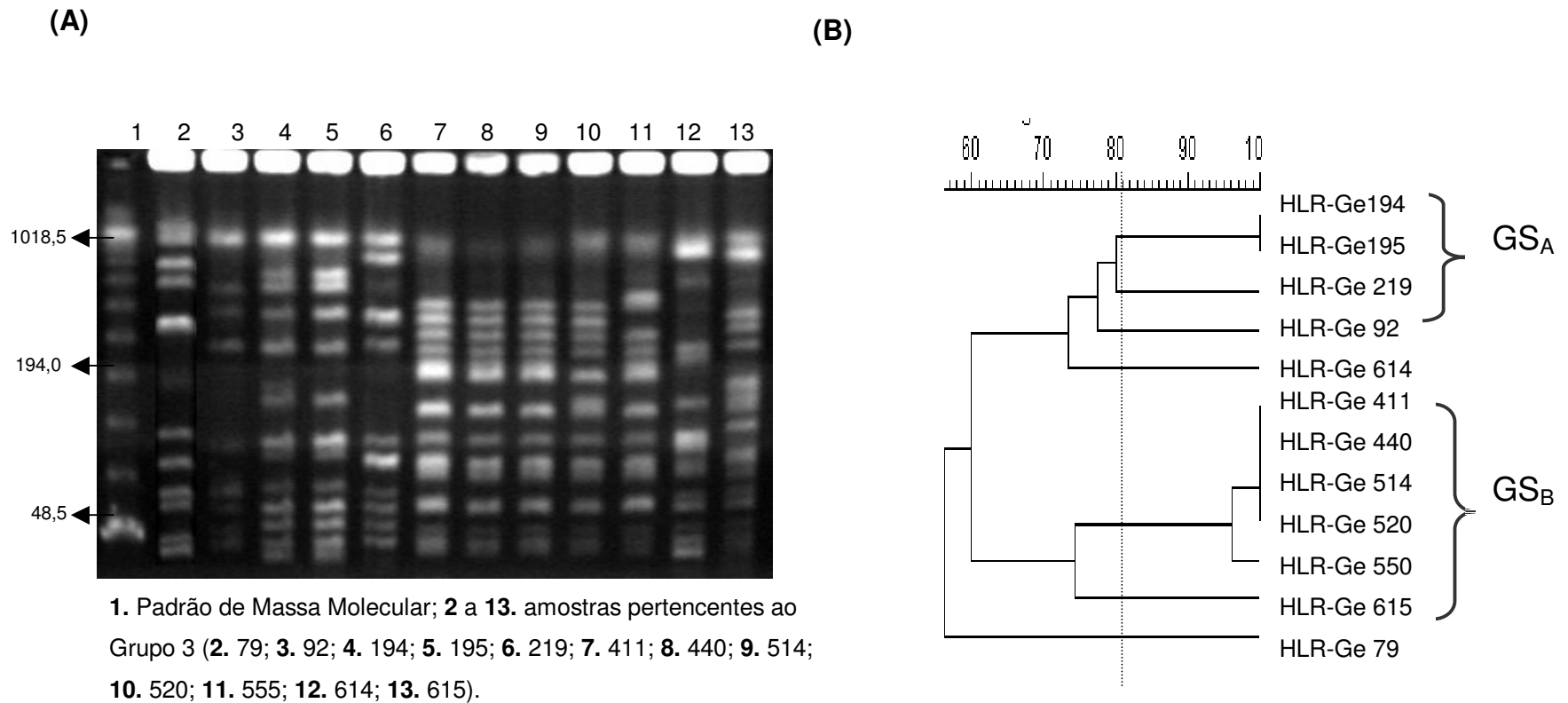
1. Padrão de Massa Molecular; 2 a 4. amostras representativas do clone  $G_B$  (2. 525; 3. 535; 4. 539); 5 a 14. amostras representativas do clone  $G_A$  (5. 89; 6. 198; 7. 91; 8. 302; 9. 306; 10. 307; 11. 309; 12. 406; 13. 458; 14. 613)

**(B)**



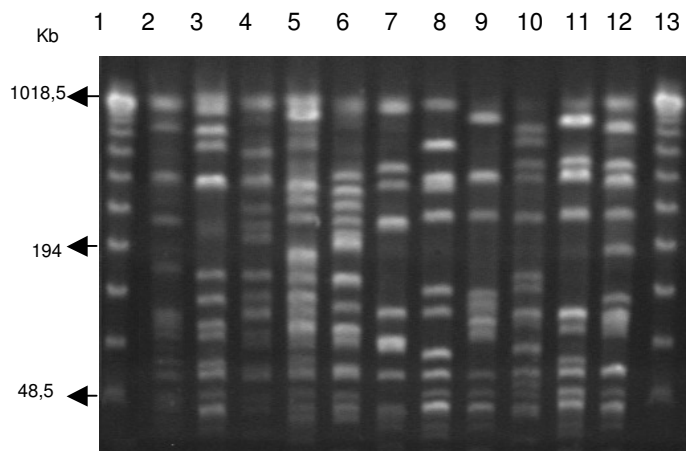


**Figura 9. (A)** Gel representativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, obtidos após digestão com a enzima *Sma*I, de amostras de *Enterococcus faecalis* susceptíveis à vancomicina apresentando HLR-Ge, porém multissensíveis **(B)** Dendrograma resultante da análise computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico de amostras com tais características



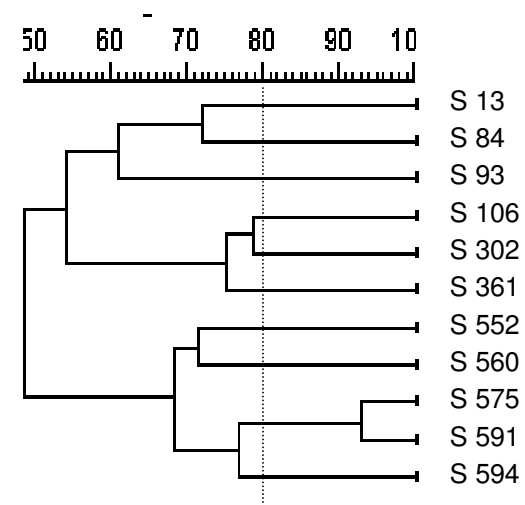
**Figura 10. (A)** Gel representativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, obtidos após digestão com a enzima *Sma*I, de amostras de *Enterococcus faecalis* susceptíveis à vancomicina e à níveis elevados de gentamicina **(B)** Dendrograma resultante da análise computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico de amostras com tais características

**(A)**

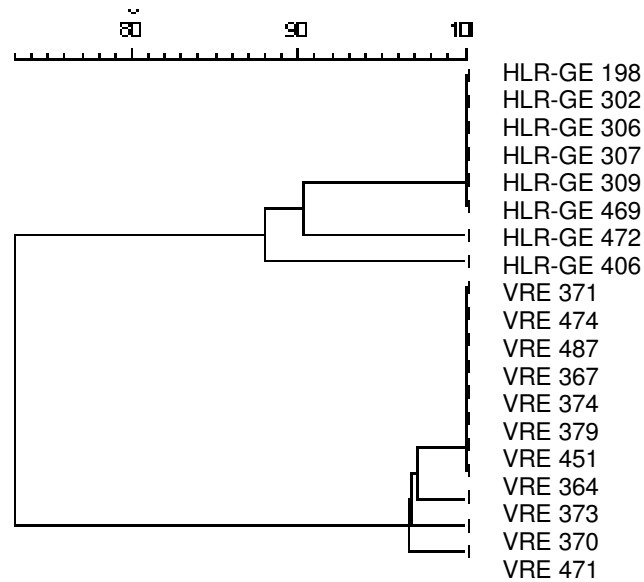


**1 e 13.** Padrões de Massa Molecular; **2 a 12.** amostras pertencentes ao Grupo 4 (**2.** 13; **3.** 84; **4.** 93; **5.** 106; **6.** 302; **7.** 361; **8.** 552; **9.** 560; **10.** 575; **11.** 591; **12.** 594; **13.** 625).

**(B)**



**Figura 11.** Dendrograma resultante da análise computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, obtidos após restrição com *Sma*I, de amostras representativas do grupo clonal predominante de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina ( $V_A$ ) e do grupo clonal predominante de *Enterococcus faecalis* apresentando HLR-Ge associado a multirresistência ( $G_A$ )



## DISCUSSÃO

---

Microrganismos atualmente incluídos no gênero *Enterococcus* foram, por longo período, caracterizados como pertencentes aos *Streptococcus* do grupo D de Lancefield. A partir da década de 70, baseado em diferenças fenotípicas e no arranjo celular, Kalina (*apud* FACKLAM, CARVALHO & TEIXEIRA, 2002) propôs que *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium*, integrantes do grupo dos enterococos, fossem reorganizados taxonomicamente em outro gênero, denominado *Enterococcus*. Desde então, evidências genéticas sugerindo a criação do novo gênero foram surgindo e sendo reforçadas, culminando na aceitação do novo gênero *Enterococcus*, em 1984, por Schleifer and Klipper-Balz.

Características marcantes do gênero, as quais auxiliaram na observação da necessidade de separação em relação aos *Streptococcus*, tornam a identificação presuntiva do mesmo relativamente fácil de ser efetuada. Características morfotintoriais, associadas com resultados de provas bioquímicas amplamente difundidas, como hidrólise da esculina na presença de sais biliares a 40%, crescimento em meio contendo NaCl a 6,5%, produção das enzimas pirrolidonil arilamidase e leucina aminopeptidase, assim como a ausência de atividade da enzima catalase e crescimento em extremos de temperatura (10°C e 45°C), possibilitam a caracterização de uma amostra como pertencente ao gênero *Enterococcus*. Mesmo que algumas espécies, tais como *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. pallens* e *E. saccharolyticus* não sejam capazes de hidrolizar o PYR, a produção

da enzima pirrolidonil arilamidase é considerada prova bioquímica de grande valia, dada a baixa freqüência de isolamento dessas espécies, principalmente, a partir de espécimes humanos (FACKLAM, CARVALHO & TEIXEIRA, 2002).

Apesar do número considerável de novas espécies relatadas nos últimos anos, conseqüência da evolução nas técnicas moleculares associadas aos estudos taxonômicos, *E. faecalis* permanece como a espécie mais freqüentemente isolada a partir de seres humanos, seja relacionada à colonização ou infecção (MALANI, KAUFFMAN & ZERVOS, 2002). Em segundo lugar, encontra-se *E. faecium*, seguido por outras espécies com prevalências variáveis, embora consideravelmente menores (TYRRELL *et al.*, 2002; MONDINO *et al.*, 2003; HIGASHIDE *et al.*, 2005; IARIA *et al.*, 2005; GUVEN *et al.*, 2006; JONES *et al.*, 2007; MURAO *et al.*, 2007; MERQUIOR *et al.*, 2008). O aprimoramento nos esquemas de identificação permitiu uma melhor caracterização dessas espécies com baixa freqüência de isolamento, contribuindo para estudos de epidemiologia dos *Enterococcus*.

Estudos sobre a prevalência das espécies de *Enterococcus* em nosso meio têm demonstrado similaridades (d'AZEVEDO, 2001; MONDINO, *et al.*, 2003; TITZE-DE-ALMEIDA *et al.*, 2004; HORNER *et al.*, 2005). Entretanto, estudos brasileiros com esse enfoque são, ainda, limitados. Nesse sentido, um dos objetivos do presente trabalho foi avaliar a freqüência de isolamento das diferentes espécies no Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre (CHSCPA), RS, e avaliar as suas características de susceptibilidade a antimicrobianos.

A importância clínica da identificação das espécies do gênero é crescente, não sendo difícil compreender as justificativas para esse fato: (a) a participação, cada vez maior, de espécies mais raras em processos infecciosos humanos (GUVEN *et al.*, 2006; JONES *et al.*, 2007; MURAO *et al.*, 2007) e, (b) as peculiaridades em relação à patogenicidade e aos perfis de susceptibilidade observados entre elas (FACKLAM, CARVALHO & TEIXEIRA, 2002).

Ainda que o esquema de identificação fenotípica utilizado neste estudo (TEIXEIRA, CARVALHO & FACKLAM, 2007) seja de grande valia para a determinação das espécies de *Enterococcus*, este mostra-se trabalhoso e demorado, com algumas provas necessitando de até dez dias de incubação para que os resultados sejam conclusivos. Entretanto, a maioria das amostras tende a apresentar resultados definitivos dos testes em um período de incubação de 24 a 48 hs (d'AZEVEDO, 2001).

No presente estudo, as amostras previamente identificadas como *Enterococcus* pelo Laboratório Central do CHSCPA foram confirmadas em relação ao gênero e submetidas ao referido esquema de identificação bioquímica das espécies.

Reiterando dados previamente publicados e citados anteriormente, a espécie mais freqüentemente isolada foi *E. faecalis*, seguida por *E. faecium*, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*. Foram isolados, também, mesmo que em número pouco relevante, *E. durans* e *E. hirae*.

A prevalência de *E. faecalis* como agente etiológico de infecções enterocócicas está, possivelmente, associada a um maior potencial de virulência dos microrganismos dessa espécie. De fato, a maioria dos fatores de virulência descritos nesse gênero tem sido relacionada a *E. faecalis* e alguns poucos, à *E. faecium* (GILMORE *et al.*, 2002).

Interessante ressaltar que, nos últimos anos, a proporção em relação à frequência de isolamento de *E. faecalis* e *E. faecium* parece ter tendência a diminuir (BHAVNANI *et al.*, 2000). Essa observação pode ser explicada pelas resistências adquiridas, originando cepas multirresistentes, mais comuns entre *E. faecium* do que em *E. faecalis*. Nesse contexto, a aquisição de determinantes de resistência passa a ser um importante fator de virulência, originando cepas mais bem adaptadas ao ambiente hospitalar o que leva a um aumento na prevalência de infecções enterocócicas relacionadas à espécie *E. faecium* (LEAVIS *et al.* 2006).

*E. gallinarum* e *E. casseliflavus* são ocasionalmente isolados a partir de casos de infecções em seres humanos (IARIA *et al.*, 2005; MERQUIOR *et al.*, 2008; ORTU *et al.*, 2008). Apesar de apresentarem resistência intrínseca a baixos níveis de vancomicina, a detecção do gene *vanA* em *E. gallinarum* (CAMARGO *et al.*, 2004; MERQUIOR *et al.*, 2008) atenta para o fato de essas espécies passarem a ser fontes de disseminação horizontal de genes relacionados à resistência aos glicopeptídeos.

A diferenciação das espécies *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. faecium* pode ser, algumas vezes, difícil de ser realizada. Isso porque o número de provas bioquímicas capazes de efetivamente diferenciar essas espécies é pequeno (são três: produção de ácido a partir do MGP, motilidade e produção de pigmento) (TEIXEIRA, CARVALHO & FACKLAM, 2007). Além disso, é relatada a ocorrência de amostras atípicas de *E. casseliflavus* que não produzem pigmento e que são imóveis, bem como amostras de *E. gallinarum* imóveis (TEIXEIRA *et al.*, 1997; CLARCK *et al.*, 1998) e de cepas atípicas de *E. faecium* (TEIXEIRA *et al.*, 1995) dificultando sua diferenciação e identificação precisa.

No entanto, neste estudo, a identificação dessas espécies não apresentou dificuldades adicionais, uma vez que todas as 17 amostras de *E. gallinarum* foram móveis e a produção de pigmento foi observada nas 4 amostras de *E. casseliflavus*. Pela associação dessas características com os resultados da prova do MGP, a diferenciação em relação à amostras de *E. faecium* também não mostrou impecilhos.

Apesar de serem pouco freqüentemente isolados de humanos, *E. durans* e *E. hirae* (GREEN *et al.*, 2006; CANALEJO *et al.*, 2008) regularmente representam uma pequena alíquota de cepas presentes em coleções de isolados clínicos de *Enterococcus* provenientes de hospitais. Essas duas espécies apresentam uma similaridade de DNA ribossômico (rDNA) 16S maior que 98,8%, sendo notoriamente difíceis de diferenciar por testes convencionais (DEVRIESE *et al.*, 2002).



A partir das provas bioquímicas utilizadas neste trabalho, essas duas espécies foram caracterizadas com base no resultado da produção de ácido a partir da D-rafinose. Interessante observar que essa diferenciação somente pôde ser confirmada no terceiro dia de incubação, onde *E. hirae* passou a apresentar resultado positivo para essa prova. As demais características fisiológicas aqui avaliadas não possibilitaram a diferenciação efetiva dessas espécies.

O sistema automatizado MicroScan foi utilizado como ferramenta auxiliar na confirmação da identificação fenotípica das amostras de *E. durans* e *E. hirae*. Para ambas, o resultado foi confirmado, apresentando alto índice de probabilidade (96 e 98%, respectivamente), fato este que não é rotineiramente observado ao serem utilizados sistemas automatizados.

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a eficácia dos sistemas automatizados comercialmente disponíveis na identificação das espécies de *Enterococcus*. De modo geral, são observados resultados muito bons na identificação das espécies mais freqüentemente isoladas, *E. faecalis* e *E. faecium*; porém, resultados não muito satisfatórios são alcançados quando são avaliadas as espécies mais raras (IWEN *et al.*, 1999; d'AZEVEDO *et al.*, 2004).

Em relação à fonte de isolamento das amostras incluídas no presente estudo, dentre os sítios clinicamente significantes, a urina (52,8%) foi a mais freqüente, seguida de ferida operatória (9,0%) e abscessos (8,6%). Em geral, esses valores vêm ao encontro de dados epidemiológicos publicados em estudos

nacionais e internacionais (MALANI *et al.*, 2002; DERVISOGLOU *et al.*, 2006; NABER *et al.*, 2008).

Chama a atenção a ocorrência de 3 amostras provenientes de trato respiratório (embora não se saiba se essas foram amostras coletadas de processos infecciosos ou colonização), 1 de líquido sinovial e 1 de prótese femural, uma vez que infecções enterocócicas nesses sítios podem ocorrer, mas são raras. Como exemplo, Umgelter e colaboradores (2007) descreveram o isolamento de *E. faecium*, associado à *Klebsiella oxytoca* e *Candida glabrata*, a partir do lavado broncoalveolar e aspirado traqueal de um paciente de 71 anos com pancreatite necrotizante. Já, Murao e colaboradores (2007) relataram um caso de artrite infecciosa causada por *E. faecalis*, em um paciente com diabetes mellitus, e sugeriram que o evento inicial do quadro infeccioso teria sido uma infecção urinária relacionada a esse microrganismo.

As características intrínsecas de resistência, associadas à extraordinária capacidade de aquisição de outros determinantes genéticos, situam os *Enterococcus* como importantes patógenos nosocomiais atualmente. Apesar do desenvolvimento recente de diversos estudos focados nos potenciais fatores de virulência dos enterococos (GILMORE *et al.*, 2002; COBO *et al.*, 2008), o acúmulo de mecanismos de resistência a diferentes classes de antimicrobianos permanece sendo seu mais bem definido fator de virulência, dificultando consideravelmente o tratamento de infecções enterocócicas no ambiente hospitalar (GILMORE *et al.*, 2002).

A emergência e disseminação dessas cepas multirresistentes contribuiu consideravelmente para o aumento no interesse pela epidemiologia das infecções enterocócicas (LEAVIS *et al.*, 2006). Mesmo assim, ainda são consideravelmente restritos os dados em relação ao perfil de susceptibilidade dos enterococos circulantes em nosso meio, incluindo a região Sul do Brasil, o que justifica o interesse especial deste trabalho nas características de resistência dos microrganismos isolados e nos determinantes genéticos relacionados à essas resistências.

Considerando os resultados dos testes de disco-difusão, 59,2% das amostras de *Enterococcus* foram resistentes à tetraciclina, 52,1% à eritromicina, 41,9% à ciprofloxacina, 36,7% à norfloxacina, 35,8% ao cloranfenicol e 0,9% à nitrofurantoína. Não foram detectadas amostras resistentes à linezolida. Entretanto 6 (0,9%) amostras apresentaram resistência intermediária à esse antimicrobiano, sendo 5 *E. faecalis* e 1 *E. gallinarum*.

Embora o relato de ocorrência de resistência à linezolida ainda seja pouco freqüente (VILELA *et al.*, 2006; POURSHAFIE *et al.*, 2008), alguns trabalhos têm demonstrado um aumento na incidência de amostras plenamente resistentes ou com resistência intermediária, decorrente do aumento do uso desse antimicrobiano (SCHEETZ *et al.*, 2008), com a eventual ocorrência de surtos de *Enterococcus* resistentes à linezolida (KAINER *et al.*, 2007).

A combinação quinupristin/dalfopristin não apresenta atividade contra *E. faecalis* por serem estas intrinsecamente resistentes à estreptogramina A (KAK & CHOW, 2002). Por outro lado, entre as amostras não-*E. faecalis* incluídas no estudo, não foi observada resistência à esse antimicrobiano.

A análise dos perfis de susceptibilidade, de acordo com as espécies, demonstrou, em geral, percentuais mais elevados de resistência entre as amostras identificadas como *E. faecium*. Da mesma forma, amostras multirresistentes foram mais comuns em amostras de *E. faecium*. De fato, essa espécie é intrinsecamente mais resistente, se comparada à *E. faecalis* (MALANI, KAUFFMAN & ZERVOS, 2002). Além disso, diversos autores têm demonstrado que a frequência de isolamento de cepas multirresistentes é maior entre isolados de *E. faecium* (PAPAPARASKEVAS *et al.*, 2000; ZANELLA *et al.*, 2003; BUSANI *et al.*, 2004).

Devido às limitadas opções terapêuticas disponíveis no caso de infecções causadas por VRE, o CLSI (2008) recomenda que sejam testados eritromicina, tetraciclina e cloranfenicol, para serem utilizados como alternativas de tratamento nesses casos. Durante o período de estudo, os índices de resistência à esses antimicrobianos foi elevado, o que compromete sua utilização como terapia alternativa, agravando o impacto das infecções causadas por amostras de VRE nos hospitais avaliados.

Mesmo não sendo rotineiramente utilizados em infecções enterocócicas, diversos autores relatam índices de resistência à esses antimicrobianos

semelhantes aos observados no presente trabalho ou mais elevados. Busani e colaboradores (2004) mostraram que 92,0% dos *E. faecalis* eram resistentes à tetraciclina, 79,0% à eritromicina, e 36,0% ao cloranfenicol. Por outro lado, López e colaboradores (2008), estudando *E. faecium* com susceptibilidade reduzida à quinupristin-dalfopristin, observaram que apenas 12,8% eram resistentes à tetraciclina. Entretanto, dados obtidos pelo Programa SENTRY (SADER *et al.*, 2004) demonstram que 90,4%, 70,6% e 42,2% dos *Enterococcus*, coletados na América Latina, entre 1997 e 2001, apresentaram resistência à eritromicina, tetraciclina e cloranfenicol, respectivamente.

No Brasil, Mondino e colaboradores (2003) encontraram 53,0% de resistência à eritromicina, 52,2% de resistência à tetraciclina e 34,4% de resistência ao cloranfenicol. d'Azevedo (2001) avaliou amostras de *Enterococcus* isoladas também na cidade de Porto Alegre, nos anos 1996 e 1997 e observou índices de resistência de 62,0%, 42,6% e 24,8% para tetraciclina, eritromicina e cloranfenicol, respectivamente. Em comparação aos nossos dados, percebe-se que a freqüência de isolamento de amostras apresentando esses fenótipos aumentou consideravelmente para eritromicina e cloranfenicol, mantendo-se praticamente constante para tetraciclina, a qual já apresentava um índice de resistência consideravelmente elevado.

A localização dos determinantes genéticos que codificam essas resistências em plasmídeos e/ou transposons conjugativos explica a ampla disseminação dos

mesmos, não só entre os *Enterococcus*, mas também entre microrganismos de outros gêneros bacterianos (KAK & CHOW, 2002).

Em relação aos determinantes genéticos responsáveis pela resistência à tetraciclina, o gene *tet(M)* foi o prevalente, seguido pelo gene *tet(L)*, o que está de acordo com os resultados obtidos por diferentes autores (AARESTRUP *et al.*, 2000; DE LEENER *et al.*, 2004; NISHIMOTO *et al.*, 2005; KLIBI *et al.*, 2006; MACOVEI & ZUREK, 2006; POETA *et al.*, 2007; BORBONE *et al.*, 2008). O gene *tet(M)* é amplamente distribuído e tem sido encontrado em uma grande variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Esse fato está, provavelmente, relacionado à associação do gene *tet(M)* com elementos conjugativos. Em *Enterococcus*, esse gene está classicamente relacionado à família de transposons conjugativos Tn916/Tn1545 (AGERSO *et al.*, 2006).

Além disso, foi demonstrado que *Enterococcus* contém diversos genes *tet(M)*, presentes em elementos genéticos móveis variados (Tn916/Tn1545 e elementos Tn5397-like), o que justifica a ampla disseminação desse gene no gênero, podendo sugerir que esses microrganismos tenham importante papel na evolução do mesmo e na transferência horizontal de elementos móveis, carreando esse gene (AGERSO *et al.*, 2006).

Ainda, o gene *tet(K)* não foi detectado e o gene *tet(O)* foi caracterizado em apenas três amostras, concordando com os resultados de outros trabalhos que demonstram uma frequência muito baixa, ou nula, de detecção desses genes no

gênero *Enterococcus* (DE LEENER *et al.*, 2004; NISHIMOTO *et al.*, 2005; MACOVEI & ZUREK, 2006).

Nos enterococos, a resistência aos macrolídeos está relacionada à presença dos genes *erm(A)*, *erm(B)* e *mef(A)*. As amostras avaliadas apresentaram, em sua maioria, o gene *erm(B)*, à exceção de três *E. faecium* positivos para o gene *erm(A)*. A elevada prevalência do gene *erm(B)* nesse gênero é bem documentada (DE LEENER *et al.*, 2004; QUIÑONES *et al.*, 2005; KLIBI *et al.*, 2006; BORBONE *et al.*, 2008), assim como a co-transferência do mesmo com diversos outros determinantes de resistência (LESTER *et al.*, 2004; GARCIA-MIGURA, LIEBANA & JENSEN, 2007). Também está bem estabelecida a baixa frequência de isolamento de amostras de *Enterococcus* portadores do gene *erm(A)* (EMANEINI, ALIGHOLI & AMINSHAHI, 2008).

A baixa frequência de resistência à nitrofurantoína em *Enterococcus* foi observada em diferentes estudos, nas mais diversas regiões geográficas (d'AZEVEDO, 2001; BUTT, LEGHARI & MAHMOOD, 2004; HORNER *et al.*, 2005; QUIÑONES *et al.*, 2005; FADDA *et al.*, 2005). Nosso estudo reitera esses dados, sugerindo a excelente atividade desse antimicrobiano em infecções enterocócicas das vias urinárias.

Nossos dados em relação à resistência às quinolonas vem ao encontro de outros trabalhos publicados, tanto no Brasil (MONDINO *et al.*, 2003; TITZE-DE-ALMEIDA *et al.*, 2004), como em outros países, com pequenas variações

(BILLSTRÖM *et al.*, 2008; ZHANEL *et al.*, 2008). Em decorrência da ampla utilização das quinolonas, especialmente ciprofloxacina, no tratamento de infecções enterocócicas do trato urinário, tem sido observado, nos últimos anos, um aumento crescente no número de amostras resistentes (TANKOVIC *et al.*, 1996).

A resistência a níveis elevados de fluorquinolonas tem sido associada a mutações consecutivas. Dessa forma, mutações no gene *parC* dos enterococos parece ser o primeiro passo na resistência às quinolonas. Uma(s) mutação (ões) adicional (is) na QRDR do gene *gyrA* dos *Enterococcus* parece ser o segundo passo, resultando em uma cepa com resistência a níveis elevados de quinolonas (KANEMATSU *et al.*, 1998). Entretanto, um trabalho mais recente demonstra ausência de mutações em *gyrA* e *parC* em mutantes com baixos níveis de resistência às quinolonas, sugerindo que outros alvos de mutações além dos genes acima descritos, estariam relacionados à redução da susceptibilidade às quinolonas (WICKMAN *et al.*, 2006).

Nesse sentido, o uso prévio desse antimicrobiano seria fator de risco para o desenvolvimento de níveis elevados de resistência (TANKOVIC *et al.*, 1996). Interessante observar que, enquanto cerca de 22,0% das amostras estudadas por d'Azevedo (2001) provenientes também de Porto Alegre, no período de 1996 e 1997, foram resistentes à ciprofloxacina, nós detectamos 41,9% de amostras resistentes, demonstrando que a resistência a esse antimicrobiano praticamente duplicou entre o período dos dois estudos.



A resistência à ciprofloxacina tem sido associada com resistência a níveis elevados de gentamicina (TANKOVIC *et al.*, 1996; PAPAPARASKEVAS *et al.*, 2000). De fato, essa correlação fica clara em nosso estudo, uma vez que entre as amostras resistentes à níveis elevados de gentamicina, 92,2% foram resistentes à ciprofloxacina, enquanto que, entre isolados susceptíveis à níveis elevados de gentamicina, apenas 21,6% apresentaram resistência à ciprofloxacina. Como a resistência a aminoglicosídeos e quinolonas não se caracteriza como resistência cruzada (já que mecanismos distintos estão relacionados aos fenótipos de resistência), tem sido sugerido que a resistência à ciprofloxacina tenha ocorrido inicialmente em um isolado apresentando resistência a níveis elevados de gentamicina. A partir daí, essas características teriam evoluído concomitantemente (TANKOVIC *et al.*, 1996).

Analisando, ainda, resultados da técnica de disco-difusão, 0,5% dos isolados apresentaram resistência à níveis elevados de ampicilina, 30,3% à níveis elevados de gentamicina e 16,8% à níveis elevados de estreptomicina. Devido à importância clínica da resistência a esses antimicrobianos e pela possibilidade de falhas na detecção acurada da resistência utilizando a técnica acima descrita, são recomendados testes de triagem para resistência à vancomicina, resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (CLSI, 2008) e níveis elevados de ampicilina (TEIXEIRA *et al.*, 2000). Esses testes foram realizados e resultados idênticos, em relação ao disco-difusão, foram observados para níveis elevados de ampicilina e de gentamicina. Entretanto, para a vancomicina (dados discutidos posteriormente)

e níveis elevados de estreptomicina, alguns resultados discordantes foram observados.

Neste estudo, 3 amostras de *E. faecium* apresentaram resistência à ampicilina, com CIM igual a 16 µg/mL. Não foram observados *E. faecalis* resistentes à esse antimicrobiano. Essa frequência de resistência é, em geral, menor do que a observada em outros estudos brasileiros. Mondino e colaboradores (2003) observaram 2,8% de resistência à ampicilina no gênero *Enterococcus*, dado muito semelhante (3,0%) ao encontrado por d'Azevedo (2001). Entretanto, Titzede-Almeida e colaboradores (2004) reportaram 12% de *E. faecalis* apresentando esse fenótipo. Da mesma forma, Andrade e colaboradores (2006) demonstraram um percentual de resistência à ampicilina consideravelmente mais elevado (11,8%) ao analisarem amostras de infecções do trato urinário na América Latina.

Em outros países, a resistência à ampicilina também pode apresentar percentuais variados, mas é, em geral, baixa quando são consideradas amostras de *E. faecalis* (CHRISTIANSEN *et al.*, 2007; MARTINEZ-ODRIZOLA *et al.*, 2007); muito embora, índices de resistência tão elevados quanto 27% (KAÇMAZ & AKSOY, 2005) tenham sido relatados.

Uma situação bastante diferente é observada ao serem analisadas amostras de *E. faecium*. As características intrínsecas dessa espécie determinam um nível de resistência aos beta-lactâmicos consideravelmente mais elevado do que aquele observado em *E. faecalis* (MURRAY, 1990). Da mesma forma, o

percentual de *E. faecium* com resistência adquirida a níveis elevados de beta-lactâmicos é notoriamente maior, nas mais diversas regiões geográficas.

No trabalho de Christiansen e colaboradores (2007), onde 0,2% dos *E. faecalis* eram resistentes à níveis elevados de ampicilina, foi observado que 77% dos *E. faecium* apresentavam esse fenótipo. Da mesma forma, entre 1500 amostras de *E. faecalis* e *E. faecium*, menos de 2% dos *E. faecalis* mostraram-se resistentes à ampicilina, enquanto que 83% dos *E. faecium* foram resistentes à esse antimicrobiano (MUNDY, SAHM & GILMORE, 2000), o que confirma diferenças inerentes à espécie.

Essa resistência a níveis elevados de ampicilina pode atingir 80% dos isolados dessa espécie na Europa (FORTÚN *et al.*, 2002). Como exemplo, na Suécia, 77% dos *E. faecium* analisados apresentaram tal fenótipo (BILLSTRÖM *et al.*, 2008) e na Holanda, 78% (TOP *et al.*, 2008).

A emergência de *E. faecium* resistentes à ampicilina nos Estados Unidos ocorreu na década de 80 e parece ter precedido a emergência de *E. faecium* resistentes à vancomicina (SHEPARD & GILMORE, 2002). Desde então, estudos de epidemiologia molecular de amostras de *E. faecium* derivadas tanto de humanos quanto de animais revelou a existência de uma linhagem genética de *E. faecium* resistente à vancomicina, denominada complexo clonal 17 (CC17), a qual está associada a surtos e infecções nosocomiais nos cinco continentes. O CC17 é caracterizado pela resistência à ampicilina e quinolonas. É provável que a

aquisição de resistência à ampicilina tenha sido um evento inicial na adaptação do *E. faecium* no ambiente hospitalar, facilitando a subsequente emergência de *E. faecium* com resistência à vancomicina (WILLEMS *et al.*, 2005).

Da mesma forma, mas com 10 anos de atraso, na Europa tem sido relatada a emergência do CC17, resultando em alterações na proporção *E. faecalis*/*E. faecium* (considerando amostras invasivas), sendo 78% dos *E. faecium* resistentes à ampicilina. Todas essas alterações favorecem o surgimento de cepas resistentes à vancomicina (TOP *et al.*, 2008). No Brasil, a análise molecular das cepas relacionadas ao primeiro surto de VRE da espécie *E. faecium* não demonstrou uma relação dessas cepas com o CC17, sugerindo uma história evolucionária distinta para as amostras brasileiras (TITZE-DE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Por outro lado, outro grupo de pesquisadores brasileiros observou a presença deste clone epidêmico entre *E. faecium* resistentes à vancomicina provenientes de hospitais de São Paulo (CAMARGO, GILMORE & DARINI, 2006).

As três amostras de *E. faecium* resistentes à ampicilina isoladas por nós foram recuperados da corrente circulatória de pacientes internados em dois hospitais diferentes (1 do PPF; 2 do HCSA). Apesar do pequeno número de amostras, não foi observado um antibiotipo único entre elas, já que a resistência à níveis elevados de gentamicina foi observada em 1 isolado (PPF) e a resistência à ciprofloxacina em dois isolados (1 do PPF e 1 do HCSA). Conforme esperado, nenhum isolado produziu a enzima  $\beta$ -lactamase. Embora tenha sido relatada por alguns autores (JESUDASON *et al.*, 1998), a produção dessa enzima em amostras

de *Enterococcus* é rara e ainda não foi relatada no Brasil (STERN, CARVALHO E TEIXEIRA, 1994; CEREDA *et al.*, 1997; MENDONÇA, 1998; MONDINO *et al.*, 2003).

O impacto da resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos está relacionado principalmente à limitação em alcançar resultados sinérgicos a partir da associação com  $\beta$ -lactâmicos ou glicopeptídeos, o que pode trazer problemas no tratamento de infecções enterocócicas graves. A vigilância periódica desse fenótipo de resistência parece ser primordial para evitar sua disseminação.

Durante o período do nosso estudo, 30,3% dos enterococos mostraram-se resistentes a níveis elevados de gentamicina, com base nos resultados dos testes de triagem. Dados semelhantes foram observados em outros estudos brasileiros, mostrando 28,1% de amostras com esse fenótipo (MASCHIETO *et al.*, 2004) ou índices um pouco menores, como 22% (TITZE-DE-ALMEIDA *et al.*, 2004). Em Porto Alegre, um estudo prévio demonstrou que 26,4% das amostras de *Enterococcus* apresentaram esse fenótipo (d'AZEVEDO, DIAS & TEIXEIRA, 2006).

Percentuais variados de resistência podem ser observados, dependendo da região geográfica. Apenas 2% dos *E. faecium* isolados na Suécia foram caracterizados como HLR-Ge (BILLSTRÖM *et al.*, 2008). Na Itália, Zarrilli e colaboradores (2005) verificaram que 44% dos *E. faecalis* e 52% dos *E. faecium* foram resistentes a níveis elevados de gentamicina. Em Cuba, índices menores foram relatados, 37% e 30% para *E. faecalis* e *E. faecium*, respectivamente

(QUIÑONES *et al.*, 2005). Em amostras provenientes da Austrália, HLR-Ge foi caracterizada em 35,8% dos *E. faecalis* e 52,2% em *E. faecium* (CHRISTIANSEN *et al.*, 2007). Na América Latina, de acordo com dados do Programa SENTRY, 44,1% dos *Enterococcus* apresentaram esse fenótipo (SADER *et al.*, 2004).

Os dados obtidos nos diferentes estudos demonstram que os percentuais de resistência podem variar de acordo com as áreas geográficas e estas variações podem ser explicadas pela capacidade de disseminação de elementos genéticos que codificam as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, bem como pela pressão seletiva que o uso de certos antimicrobianos exerce sobre a população microbiana de cada instituição e de cada local (AGERSO *et al.*, 2006).

Como já descrito por diferentes autores, a resistência a níveis elevados de gentamicina está frequentemente relacionada à presença do gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (PAPAPARASKEVAS *et al.*, 2000; DAIKOS *et al.*, 2003; SAEEDI *et al.*, 2004; ZARRILLI *et al.*, 2005; ABBASSI, ACHOUR & HASSEN, 2007). Estudos têm demonstrado que os genes de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos estão presentes em plasmídeos ou elementos conjugativos localizados no cromossomo, dos quais os prevalentes são transposons conjugativos relacionados à transferência horizontal dos determinantes de resistência (TOMITA *et al.*, 2002).

A frequência de transferência do gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* pode chegar a  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$  por célula receptora (TOMITA *et al.*, 2002). Essa elevada frequência de transferência, associada à grande heterogeneidade genética de amostras

apresentando HLR-Ge demonstram a importância da transferência horizontal desse gene na emergência de cepas com esse fenótipo (ABBASSI, ACHOUR & HASSEN, 2007).

Em relação à distribuição entre as espécies, HLR-Ge foi observada em 31,6% dos *E. faecalis* e 25,0% dos *E. faecium*, contrariando alguns estudos que demonstram percentuais maiores entre *E. faecium* (PAPAPARASKEVAS *et al.*, 2000; ZARRILLI *et al.*, 2005; CHRISTIANSEN *et al.*, 2007). Por outro lado, Busani e colaboradores (2004) demonstraram ser *E. faecium* mais resistentes à  $\beta$ -lactâmicos e *E. faecalis* mais resistentes à níveis elevados de gentamicina, o que está de acordo com nossos resultados. Ainda, é provável que essas discordâncias sejam resultado da forte associação observada entre resistência à vancomicina (detectada, neste estudo, somente em amostras de *E. faecalis*) e resistência à níveis elevados de gentamicina. Essa associação será, no entanto, discutida posteriormente.

Interessante ressaltar que 94,3% dos *Enterococcus* apresentando HLR-Ge foram resistentes à eritromicina. De fato, tem sido relatada a co-transferência dos genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* e o elemento genético Tn5405-like, carreando o gene *erm(B)*, ressaltando-se que o lugar ideal para essa transferência seria o intestino de diferentes animais, incluindo humanos (LESTER *et al.*, 2004).

Ao contrário do que foi observado para os resultados dos testes de triagem acima descritos, quando comparados resultados de disco-difusão e teste de

triagem em agar para a estreptomicina, algumas discrepâncias ocorreram. Pela primeira técnica, 16,6% das amostras foram resistentes à níveis elevados de estreptomicina, enquanto que, pela triagem, 17,1% mostraram-se resistentes. Três isolados apresentaram falsa-susceptibilidade pelo disco-difusão, uma vez que todas essas amostras apresentaram o gene *ant(6)-Ia*. Essas discordâncias em relação às técnicas já foram relatadas (SWENSON *et al.*, 1995; d'Azevedo, 2001) e realça dificuldades que podem ser enfrentadas na caracterização fenotípica dessas resistências. Ainda, 7 amostras apresentaram resultados falso-positivos no disco-difusão, todas elas com reações de PCR negativas. Dessas, 6 foram negativas na triagem e foram caracterizadas como intermediárias pelo disco-difusão, representando erros menores, possivelmente relacionados ao tamanho reduzido dos halos e sua interpretação correspondente (CLSI, 2008).

Percentuais variados de resistência a níveis elevados de estreptomicina são observados, sendo, em geral, menores do que os percentuais de amostras apresentando HLR-Ge. Na América Latina, 37,3% dos *Enterococcus* foram resistentes à níveis elevados de estreptomicina (SADER *et al.*, 2004). Especificamente no Brasil, esses percentuais são menores e variados: 30,4% (MONDINO *et al.*, 2003); 8% (TITZE-DE-ALMEIDA *et al.*, 2004); 24,8% (d'AZEVEDO *et al.*, 2006).

Da mesma forma que para a gentamicina, essa variabilidade na freqüência de isolamento de amostras apresentando HLR-St relaciona-se diretamente à capacidade de disseminação dos elementos genéticos que codificam a EMA



associada à esse fenótipo; bem como à pressão seletiva exercida pelo antimicrobiano. O determinante genético relacionado à resistência à níveis elevados de estreptomicina, *ant(6)-Ia*, foi amplificado nas amostras com esse fenótipo.

Ao contrário do que foi observado por Qu e colaboradores (2006), em que a maioria das amostras apresentavam concomitantemente resistência a níveis elevados de gentamicina e estreptomicina, nós observamos que apenas 3,0% das amostras apresentaram esse fenótipo, conforme resultados dos testes de triagem. Esses dados vão ao encontro de resultados de outros autores na mesma cidade (d'AZEVEDO, DIAS & TEIXEIRA, 2006), indicando que a maioria das amostras ali circulantes preserva o efeito sinérgico entre um aminoglicosídeo e um agente ativo contra a parede celular.

A resistência aos glicopeptídeos foi definida fenotipicamente pelas técnicas de disco-difusão, triagem em agar para a vancomicina e determinação da CIM através de E-test<sup>®</sup>. Amostras plenamente resistentes (60 *E. faecalis* com CIM de vancomicina > 256 µg/mL) foram bem caracterizadas pelos métodos acima descritos.

No entanto, em nosso trabalho, a técnica de disco-difusão não foi acurada para a detecção de níveis intermediários dessa resistência. Essa constatação vai ao encontro dos resultados obtidos por outros autores. Trabalhos demonstram bons desempenhos dos métodos fenotípicos na detecção da resistência do tipo

VanA. Entretanto, as resistências do tipo VanB e VanC correlacionam-se, em geral, a uma falsa susceptibilidade quando testadas pelo disco-difusão (ENDZ *et al.*, 1998; JONES *et al.*, 2002).

O maior interesse na epidemiologia das infecções enterocócicas, bem como a necessidade de formar bancos de dados locais, úteis no desenvolvimento de políticas de vigilância justificam a importância da correta detecção dos mais diferentes fenótipos de resistência à vancomicina (JONES *et al.*, 2002). Além disso, o aumento na frequência de isolamento de *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* como agentes etiológicos de infecções humanas (PRAKASH *et al.*, 2005; IARIA *et al.*, 2005; MERQUIOR *et al.*, 2008; ORTU *et al.*, 2008) torna imprescindível a determinação acurada da resistência aos glicopeptídeos nessas espécies, para garantir a eficácia do tratamento.

Para isso, a triagem em agar parece ser a técnica mais confiável e de fácil execução para a detecção dos diferentes fenótipos de resistência à vancomicina pelo laboratório clínico (CETINKAYA, FALK & MAYHALL, 2000).

Apesar de não ser um glicopeptídeo utilizado no Brasil, a determinação da resistência à teicoplanina é realizada para a melhor caracterização dos fenótipos de resistência à vancomicina. Muito embora existam relatos recentes de incongruência entre fenótipo de vancomicina e perfil de susceptibilidade esperado para teicoplanina (BERKTAS, YAMAN & OZTURK, 2008), as amostras se apresentaram, em geral, de maneira esperada. Não foram observadas

discordâncias entre disco-difusão e CIM e os resultados correlacionaram-se totalmente com o fenótipo/genótipo Van/*van* presente nas amostras.

Dentre as 637 amostras que fizeram parte deste estudo, 11,0% foram resistentes à vancomicina (CIM  $\geq$  6  $\mu\text{g/mL}$ ), sendo que, destas, 9,4% foram plenamente resistentes à vancomicina (CIM  $>$  256  $\mu\text{g/mL}$ ). A frequência de isolamento de VRE varia, dependendo da região geográfica. Na República Tcheca, entre 2002 e 2004, 1,1% dos *Enterococcus* isolados era VRE (KOLAR *et al.*, 2005). Percentuais baixos de isolamento de VRE (0,2%) também foram observados na Austrália (CHRISTIANSEN *et al.*, 2007) e em Cuba (1,2%) (QUIÑONES *et al.*, 2005). No Canadá, 6,7% dos *Enterococcus* isolados entre 2005 e 2006 eram resistentes à vancomicina (ZHANEL *et al.*, 2008). Ainda, em um estudo com 264 enterococos da Turquia, não foi observada presença de VRE (KAÇMAZ & AKSOY, 2005).

Em contrapartida, alguns países apresentam percentuais consideravelmente mais elevados de isolamento de VRE. Na Polônia, Mlynarczyk e colaboradores (2007) detectaram 18% de VRE. Em hospitais gregos, 20,5% dos *Enterococcus* eram VRE (GIKAS *et al.*, 2005).

No Brasil, o primeiro VRE foi isolado em 1996 (DALLA COSTA *et al.*, 1998) e, desde então, tem sido isolado em diferentes regiões do país (CEREDA *et al.*, 2002; ZANELLA *et al.*, 2003; CAIAFFA FILHO *et al.*, 2003; FURTADO *et al.*, 2005a; FURTADO *et al.*, 2006; VILELA *et al.*, 2006; RIBAS *et al.*, 2007). A frequência de

isolamento varia, dependendo da região e do tipo de amostra analisada. Em São Paulo, Furtado e colaboradores (2005b) observaram que, entre amostras coletadas de *swab* retal de pacientes de UTI, 33% eram VRE. Nesta mesma cidade, um estudo retrospectivo de três anos demonstrou um considerável aumento na resistência à vancomicina entre *Enterococcus*. No ano 2000, o percentual de VRE era 9,5%, subindo para 14,7% em 2001 e 15,8% em 2002 (Furtado *et al.*, 2005a). Já, no Rio de Janeiro, a partir de amostras de fezes coletadas de pacientes internados e de indivíduos sadios da comunidade, Mondino e colaboradores (2003) não detectaram amostras apresentando resistência plena à vancomicina. O mesmo foi observado por Maschieto e colaboradores (2004), em São Paulo.

Prevalências baixas de VRE (1,8%) entre amostras de colonização também foram observadas por Tressoldi e colaboradores (2006); enquanto que, em um grupo de pacientes transplantados renais, avaliados por Freitas e colaboradores (2006), a frequência de amostras fecais positivas para VRE foi consideravelmente maior (13,6% - sendo 50% deles pertencentes às espécies *E. faecalis* e *E. faecium*). Entre pacientes submetidos à procedimento de diálise, 14,4% tiveram amostras fecais positivas para VRE, dos quais 25% eram *E. faecium* e 3,6% eram *E. faecalis*. Os demais representavam amostras intrinsecamente resistentes à vancomicina (Barbosa *et al.*, 2004). d'Azevedo e colaboradores (2008) analisaram amostras provenientes de culturas de vigilância de pacientes internados em uma UTI de um Hospital de São Paulo, durante um mês e observaram que 45,7% das culturas foram positivas para a presença de VRE, caracterizando uma situação de surto por esse microrganismo.

Na região Sul do Brasil, ainda são consideravelmente escassos os dados sobre epidemiologia de *Enterococcus*, sobretudo VRE. Hörner e colaboradores (2005) isolaram apenas uma (0,5%) amostra de *E. faecalis* resistente à vancomicina, em um universo de 233 enterococos provenientes de um hospital terciário na cidade de Santa Maria. Já, em Porto Alegre, o isolamento do primeiro VRE ocorreu no ano 2000 (d'AZEVEDO *et al.*, 2000). Desde então, estudos analisando características fenotípicas e genotípicas das amostras circulantes, isoladas de humanos, nessa cidade não têm sido publicados. Um estudo recente (PELICIOLI *et al.*, 2008) analisou a heterogeneidade fenotípica e genotípica de amostras de *Enterococcus* provenientes desta cidade; porém, foram amostras de origem alimentar.

Em nosso estudo, todas as amostras plenamente resistentes à vancomicina foram *E. faecalis*, semelhante ao observado por alguns autores no Brasil (HÖRNER *et al.*, 2005; FREITAS *et al.*, 2006; FURTADO *et al.*, 2006; TRESSOLDI *et al.*, 2006; VILELA *et al.*, 2006). Entretanto, outros estudos brasileiros associam o isolamento de VRE com a espécie *E. faecium* (CEREDA *et al.*, 2002; CAMARGO, GILMORE & DARINI, 2006), relacionados, inclusive a surtos hospitalares (TITZE-DE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

Da mesma forma, dados internacionais demonstram a importante participação da espécie *E. faecium* entre amostras de VRE (CORSO *et al.*, 2007; LAMBIASE *et al.*, 2007; WERNER *et al.*, 2007; ZHENG *et al.*, 2007; NOVAIS *et al.*, 2008; TOP *et al.*, 2008). De acordo com Deshpande e colaboradores (2007), *E.*

*faecium* representou 91,0% dos VRE isolados na Europa e América do Norte, enquanto que 7,8% foram *E. faecalis*. Entretanto, diferenças locais foram observadas, uma vez que, na América do Norte, *E. faecalis* teve uma frequência de isolamento muito menor (6,7%) se comparada à Europa (25,0%). *E. faecium* representou 71,0% e 91,8% dos VRE na Europa e América do Norte, respectivamente.

Não está claro o motivo pelo qual *E. faecium* resistentes à vancomicina não tem sido isolados na região Sul do Brasil. Uma característica importante dos VRE isolados em Porto Alegre é que eles ainda mantém boa susceptibilidade à ampicilina, possibilitando a associação sinérgica desse antimicrobiano com aminoglicosídeos, quando a cepa em questão for susceptível, para o tratamento de infecções graves.

A endemicidade do VRE pode levar a sérias conseqüências em hospitais terciários (como é o caso do CHSCPA), os quais possuem número elevado de pacientes com doença de base grave, imunocomprometidos, transplantados, entre outros (KURUP *et al.*, 2008). Estudos têm demonstrado que VRE está independentemente associado a um aumento na mortalidade em pacientes com bacteremias (DIAZGRANADO *et al.*, 2005). Além disso, as infecções causadas por VRE podem também resultar em um aumento significativo da morbidade, do tempo de hospitalização e dos custos. Portanto, medidas agressivas para o controle do VRE são requeridas e incluem, dentre outras, a identificação e isolamento de pacientes portadores (KURUP *et al.*, 2008).

Ainda que outros sítios possam ser colonizados por VRE e, portanto, utilizados em culturas de vigilância, amostras de fezes ou períneo são as que apresentam melhores resultados quanto à recuperação do microrganismo (CANO *et al.*, 2008). Em nosso estudo, todos os 10 enterococos apresentando resistência a níveis baixos de vancomicina foram recuperados de culturas de vigilância. Da mesma forma, a maioria (86,7%) dos *Enterococcus* plenamente resistentes à vancomicina foram isolados a partir de *swabs* retais, reiterando a importância e a necessidade dessas culturas em hospitais de alta complexidade.

Na análise dos perfis de susceptibilidade, nossos resultados demonstram a presença de amostras multirresistentes mais frequentemente entre VRE do que em amostras de *Enterococcus* susceptíveis à vancomicina. Busani e colaboradores (2004), entretanto, não encontraram diferenças significativas nos índices de resistência aos antimicrobianos nos grupos VRE e VSE (*Vancomycin Susceptible Enterococci*), desde que fossem da mesma espécie e origem. Já, Pourshafie e colaboradores (2008) não compararam grupos de amostras, porém, observaram que a maioria dos VRE estudados foi resistente aos quatro principais antimicrobianos testados (aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina,  $\beta$ -lactâmicos). No Brasil, Vilela e colaboradores (2006) verificaram esse mesmo perfil de multirresistência em todos os VRE avaliados.

Algumas características de resistência parecem ter uma associação mais clara com VRE. Yazgi e colaboradores (2002), por exemplo, observaram resistência a níveis elevados de gentamicina em 30,6% e 64,7% dos VSE e VRE,

respectivamente. Essa correlação também pode ser observada em estudos brasileiros (VILELA *et al*, 2006) e vem ao encontro dos nossos resultados, uma vez que 95,0% dos VRE possuíam o fenótipo HLR-Ge. De fato, a co-transferência das resistências à vancomicina e gentamicina já foi relatada (TOMITA *et al.*, 2002). Da mesma forma, co-transferência dos genes *erm(B)* e *vanA* já foi relatada (GARCIA-MIGURA, LIEBANA & JENSEN, 2007) e provavelmente justifica a presença de ambos os fenótipos em 85,0% dos VRE isolados por nós.

Se, por um lado, a resistência a níveis elevados de gentamicina foi constantemente observada nas amostras de VRE, por outro, nenhuma delas apresentou-se resistente a níveis elevados de estreptomicina. d'Azevedo, Dias & Teixeira (2006) tiparam amostras de Porto Alegre com esse fenótipo e observaram uma grande heterogeneidade entre elas, podendo indicar que essas amostras têm origem comunitária e que infecções por esses microrganismos são, predominantemente, endógenas.

Devido ao reduzido uso da estreptomicina nos hospitalares avaliados, a pressão seletiva desenvolvida por esse antimicrobiano é pequena, não sendo a resistência a ele uma condição *sine qua non* para a adaptabilidade dos microrganismos nos hospitais. Ao contrário, a gentamicina é um antimicrobiano amplamente utilizado no tratamento de infecções de diversas etiologias, justificando a importância do desenvolvimento desse fenótipo de resistência pelos microrganismos para o desenvolvimento de cepas altamente adaptadas ao ambiente nosocomial e com potencial endêmico.



Nesse sentido, torna-se importante salientar que a resistência à níveis elevados de estreptomicina foi a única, entre as demais analisadas, que sofreu queda considerável, no decorrer do período do estudo, conforme demonstrado pela **Figura 1**. Esta observação reitera resultados obtidos por d'Azevedo, Dias e Teixeira (2006), os quais sugerem que infecções causadas por amostras apresentando HLR-St são predominantemente endógenas nas instituições avaliadas.

Com relação à caracterização dos determinantes genéticos responsáveis pela resistência à vancomicina, o gene *vanA* foi detectado em 98,3% das amostras apresentando resistência plena à vancomicina, enquanto *vanB* foi detectado em apenas uma. É bem documentada na literatura essa maior prevalência do *cluster vanA* (MANIATIS *et al.*, 2001; KURIYAMA *et al.*, 2003; CORSO *et al.*, 2007; de NIEDERHÄUSERN *et al.*, 2007; DESHPANDE *et al.*, 2007; ZHENG *et al.*, 2007; NOVAIS *et al.*, 2008), inclusive no Brasil (CEREDA *et al.*, 2002; CAIAFFA FILHO *et al.*, 2003; ZANELLA *et al.*, 2003; CAMARGO *et al.*, 2004; CAMARGO *et al.*, 2005; VILELA *et al.*, 2006; d'Azevedo *et al.*, 2008).

O *cluster vanA* está localizado em um transposon da família Tn3, o Tn1546. Esse transposon não codifica funções conjugativas e sua ampla disseminação tem sido atribuída à sua presença em plasmídeos conjugativos (DARINI, PALEPOU & WOODFORD, 2000). O arranjo dos genes estruturais, responsáveis pelo fenótipo VanA, é freqüentemente, interrompido por seqüências de inserção (*Insertion Sequence*, IS), conferindo heterogeneidade ao Tn1546, a

qual pode também estar relacionada a mutações nos genes *vanR* e *vanS* e movimento das IS no Tn1546. Esse polimorfismo do Tn1546 pode ser explorado na determinação de rotas de transmissão, monitoramento da disseminação dos elementos *vanA* e investigação da evolução do VRE (SUNG, KHAM & NAWAZ, 2008).

A variabilidade genética de amostras de *Enterococcus* apresentando características específicas foi determinada utilizando a técnica de PFGE. Apesar da grande diversidade de técnicas disponíveis para tipagem molecular de *Enterococcus*, os resultados de um grande número de investigações indicam que a análise dos perfis de restrição do DNA cromossômico (utilizando a enzima *Sma*I) por PFGE é muito útil para o estudo de cepas apresentando uma variedade de perfis de resistência, mostrando um alto poder discriminatório (FACKLAM, CARVALHO & TEIXEIRA, 2002).

Como exemplo, Pourshafie e colaboradores (2008) concluíram que a técnica de PFGE foi a mais discriminatória na tipagem de 900 VRE, em relação à ribotipagem. Ainda, Top e colaboradores (2008) compararam PFGE e MLVA na tipagem de *E. faecium* resistentes à vancomicina e observaram que a subtipagem determinada por PFGE foi mais discriminatória. Por sua vez, d'Agatha e colaboradores (2001) avaliaram AFLP e PFGE, concluindo que, embora resultados do AFLP sejam comparáveis a PFGE para outros microrganismos como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, para VRE o PFGE permanece sendo o método de escolha.

Sendo assim, atualmente PFGE é o método de tipagem mais útil e confiável, considerado por muitos pesquisadores como padrão-ouro para a análise epidemiológica de infecções enterocócicas nosocomiais (FACKLAM, CARVALHO & TEIXEIRA, 2002).

O resultado da tipagem das 60 amostras de *E. faecalis* apresentando resistência à vancomicina demonstrou a existência de um clone principal, V<sub>A</sub>, formado por 80,0% dos VRE e três outros clones menores (V<sub>B</sub>, V<sub>C</sub> e V<sub>D</sub>). A disseminação clonal de VRE tem sido demonstrada por diversos autores. Kuriyama e colaboradores (2003) observaram o predomínio de um clone de VRE entre isolados clínicos, o mesmo encontrado nas superfícies, sugerindo uma origem ambiental para essas cepas. Na Itália, 25 dos 26 VRE isolados em 2003 e 2004, foram agrupados em um mesmo *cluster* (LAMBIASE *et al.*, 2007).

Embora muito incomum nos hospitais da Nova Zelândia, Manson e colaboradores (2003) caracterizaram o mesmo clone predominante em animais nesse país e em 8 isolados clínicos, demonstrando a importância dos animais como reservatórios de clones de VRE. Na Argentina, 56,0% dos VRE pertenceram ao mesmo clone, o qual esteve presente em 19 hospitais, sendo predominante em 17. Dados deste trabalho sugerem a disseminação intra e inter-hospital de um clone epidêmico de *E. faecium* carreando o elemento *vanA* (CORSO *et al.*, 2007). Da mesma forma, na Turquia, perfis de PFGE idênticos foram observados entre as amostras de VRE. Mesmo sendo raro seu isolamento nos hospitais turcos atualmente, esses dados alertam para a possibilidade do VRE tornar-se

emergente a partir da disseminação deste clone, muito bem adaptado ao ambiente nosocomial (COMERT *et al.*, 2007). Essa bem-reconhecida disseminação clonal justifica-se pelo fato de que, uma vez estabelecido em um determinado ambiente hospitalar, esses clones tornam-se extremamente difíceis de erradicar (DESHPANDE *et al.*, 2007).

Por outro lado, Pourshafie e colaboradores (2008), analisando amostras de VRE do Iran, concluíram não haver disseminação clonal dessas cepas, uma vez que grande variabilidade genética foi observada entre elas. Na China, a tipagem molecular de 13 VRE obtidos nos últimos cinco anos demonstraram uma grande variabilidade genética, sugerindo que a resistência à vancomicina é capaz de emergir em diferentes cepas de *E. faecium* (ZHENG *et al.*, 2007).

Ainda, Deshpande e colaboradores (2007), como parte do programa SENTRY, avaliaram amostras de VRE da Europa e América do Norte e concluíram que a disseminação clonal parece ser o fator dominante na compreensão da disseminação de cepas de VRE multirresistentes em ambos os continentes e o monitoramento das mesmas é crítico para o controle epidemiológico desses microrganismos. Já, em Portugal, tanto a disseminação clonal quanto a transferência horizontal de elementos genéticos particulares parecem desempenhar um papel relevante na recente ampla disseminação do VRE (NOVAIS *et al.*, 2008).

No Brasil, Vilela e colaboradores (2006) caracterizaram como idênticas as amostras de VRE da região nordeste do Brasil. Ainda, 16 dos 20 VRE pertencentes ao primeiro surto relacionado à espécie *E. faecium* no país foram agrupados em um mesmo *cluster*, confirmando a disseminação clonal dessas cepas (TITZE-DE-ALMEIDA *et al.*, 2006), conclusão esta observada por outros autores brasileiros (CEREDA *et al.*, 2002).

Mesmo a disseminação clonal tendo um papel importante na endemicidade do VRE, vários padrões de disseminação podem ser observados em uma situação não caracterizada como surto, podendo ser desde monoclonal, policlonal a oligoclonal. A heterogeneidade de amostras de VRE em hospitais onde esse microrganismo é endêmico provavelmente reflete a pressão seletiva desenvolvida em pacientes de alto risco associada à inclusão de novas cepas no hospital, trazidas por pacientes ou profissionais da saúde (d'Azevedo *et al.*, 2008).

Amostras do clone  $V_A$  foram isoladas durante todo o período em praticamente todos (exceto HCSA) os hospitais do CHSCPA, muito embora esses hospitais estejam localizados em prédios geograficamente distintos. Essas características sugerem uma excelente adaptabilidade deste clone ao ambiente hospitalar, o que permitiu a persistência dele por longos períodos. Embora tenham sido observados diferentes antibiogramas entre amostras do clone  $V_A$ , 62,5% delas foram resistentes à ciprofloxacina, eritromicina, tetraciclina, norfloxacina, ao cloranfenicol e a níveis elevados de gentamicina, levando a crer que essa

multirresistência é um dos fatores que justifica essa bem sucedida adaptação ao ambiente nosocomial.

A tipagem das amostras apresentando resistência a níveis elevados de gentamicina e um perfil de multirresistência, não incluindo resistência à vancomicina revelou a existência de dois clones principais  $G_A$  e  $G_B$ , representando 75.0% (n=21) das amostras. O clone  $G_A$  foi formado por 14 isolados (50.0%), enquanto o clone  $G_B$  representou 25,0% das amostras apresentando HLR-Ge associada a um perfil de multirresistência. Analisando as características específicas dos clones, em relação ao período de isolamento e origem das amostras, percebe-se que  $G_A$  esteve presente nas instituições avaliadas desde o início da coleta das amostras e parece ser de difícil erradicação. Por outro lado, o clone  $G_B$  parece ser emergente, considerando que foi isolado em poucos hospitais do complexo e apenas nos dois últimos anos do estudo (2003 e 2004). Entretanto, por apresentar características de multirresistência idênticas e uma similaridade genética relativamente grande com  $G_A$  (aproximadamente 70,0%) é razoável considerar que este também pode ser um clone endêmico nas instituições, sendo de difícil erradicação.

Embora alguns poucos autores, em diferentes países, tenham relatado a disseminação de clones específicos de *Enterococcus* com HLR-Ge (PAPAPARASKEVAS *et al.*, 2000; SAEEDI *et al.*, 2004), a maioria dos trabalhos demonstram que a epidemiologia dessas amostras é complexa, havendo, por um lado, uma heterogeneidade intra-espécie e, por outro, a disseminação de

microclones, contendo isolados idênticos ou intimamente relacionados. Portanto, a emergência de amostras apresentando HLR-Ge teria relação tanto com a disseminação de cepas específicas, quanto com a transferência horizontal de determinantes genéticos de resistência, especialmente *aac(6')-Ie-aph(2'')*-Ia (DONABEDIAN *et al.*, 2003; RODRÍGUEZ-BAÑO *et al.*, 2004; ZARRILLI *et al.*, 2005; QU *et al.*, 2006; ABBASSI, ACHOUR & HASSEN, 2007).

No Brasil, entretanto, Mondino e colaboradores (2003) observaram a presença de um grupo clonal principal (incluindo amostras de fontes clínicas e intestinais) em diferentes hospitais, sugerindo disseminação intra e inter-hospitais das cepas. Resultados semelhantes foram relatados por outros autores brasileiros (CARVALHO, 1998; MENDONÇA, 1998, PAULA, 2000; MONDINO, 2001).

d'Azevedo, Dias & Teixeira (2006), analisando amostras também da cidade de Porto Alegre, caracterizaram um grupo clonal principal entre as 107 amostras de *Enterococcus* apresentando HLR-Ge. Esse clone principal agrupou 70,8% dos isolados e esteve presente em três hospitais da cidade. Ainda, os perfis do grupo clonal predominante foram também relacionados ao perfil de uma cepa representativa do grupo clonal predominante previamente identificado na cidade do Rio de Janeiro e Niterói (CARVALHO, 1998; MONDINO *et al.*, 2003).

O perfil de bandas do grupo clonal predominante  $G_A$  determinado por nós relaciona-se, também, com aquele previamente observado por d'Azevedo, Dias e Teixeira (2006). Esse fato reitera a extraordinária adaptabilidade dessas cepas ao

ambiente dos hospitais estudados, uma vez que puderam ser detectadas na mesma instituição desde 1996 até 2004. Além disso, os perfis de fragmentação do DNA cromossômico após digestão com *Sma*I das amostras do clone G<sub>A</sub> apresentaram um coeficiente de similaridade de 75,0% em relação ao clone predominante de VRE, V<sub>A</sub>.

Baseado nisso, é possível estabelecer a epidemiologia molecular das amostras de VRE. Previamente ao isolamento do primeiro VRE no complexo hospitalar avaliado, o clone de *E. faecalis* apresentando HLR-Ge já apresentava-se endêmico e bem estabelecido nas instituições, conforme demonstrado pelos nossos resultados associados aos obtidos por d'Azevedo, Dias e Teixeira (2006). A partir daí, e como resultado da pressão seletiva desenvolvida pela ampla utilização de vancomicina em terapia empírica nessa instituição de saúde, as amostras adquiriram determinantes genéticos de resistência à vancomicina, levando à endemicidade do VRE nesses hospitais. Enquanto em amostras de *E. faecium* isoladas nos Estados Unidos e Europa, a resistência à ampicilina parece ser um evento prévio ao surgimento de resistência à vancomicina e necessário para a adaptabilidade no ambiente hospitalar (WILLEMS *et al.*, 2005), para as nossas amostras de *E. faecalis*, as quais mantêm total susceptibilidade à ampicilina, a resistência a níveis elevados de gentamicina parece ter esse mesmo importante papel.

Na análise das amostras apresentando HLR-Ge, porém com perfil de multisensibilidade, mesmo que tenha sido possível a caracterização de dois clones



principais, maior variabilidade genética foi observada e uma baixa similaridade genética em relação ao Grupo 2 foi caracterizada. Por fim, em amostras susceptíveis à níveis elevados de gentamicina, uma grande heterogeneidade foi detectada, sendo formado apenas 1 *cluster* (duas amostras), utilizando-se um *cut-off* de 80,0%. A análise desses dados reforça a possibilidade de uma origem endógena dessas amostras e um pequeno potencial endêmico das mesmas.

## CONCLUSÕES

---

Este estudo fornece um extenso conjunto de informações sobre as características fenotípicas e genotípicas de amostras de *Enterococcus* isoladas em hospitais na cidade de Porto Alegre, RS, ilustrando os aspectos evolutivos da resistência a antimicrobianos durante um período de 6 anos. Esses dados dão sequência e ampliam observações anteriores, constituindo, portanto, uma importante base de dados a ser utilizada para o desenvolvimento de estratégias mais adequadas para o tratamento e prevenção das infecções enterocócicas nas instituições investigadas.

A partir dos resultados alcançados no presente trabalho, é possível concluir que:

- Durante o período estudado, a espécie mais frequentemente isolada nos hospitais incluídos no estudo foi *E. faecalis*, seguido por *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans* e *E. hirae*. O principal espécime clínico envolvido no isolamento dessas espécies foi urina;
- Percentuais elevados de resistência foram observados para virtualmente todos os antimicrobianos, especialmente entre isolados pertencentes às espécies *E. faecalis* e *E. faecium*;

- Os percentuais de resistência aumentaram, de forma considerável, para praticamente todos os antimicrobianos, considerando-se o primeiro e o último ano do estudo. Essa elevação na ocorrência de amostras resistentes apenas não foi observada em relação à estreptomicina, para a qual foi observada uma diminuição nos percentuais de resistência no decorrer do período;
- Entre os testes fenotípicos avaliados, foram observadas discordâncias de resultados na detecção de resistência à vancomicina e à níveis elevados de estreptomicina;
- A ocorrência de resistência esteve relacionada predominantemente aos genes *erm(B)*, *tet(M)*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* e *vanA* para eritromicina, tetraciclina, aminoglicosídeos e vancomicina, respectivamente;
- Amostras resistentes à vancomicina agruparam-se em dois clones principais, sendo um extensivamente distribuído entre os hospitais do complexo e presente ao longo de todos os anos do estudo;
- O grupo clonal predominante entre amostras apresentando resistência a níveis elevados de gentamicina associada a um perfil de multirresistência, porém com sensibilidade à vancomicina também pareceu estar muito bem adaptado ao ambiente dos hospitais avaliados, estando presente no decorrer do período;

- A similaridade genética entre amostras dos grupos clonais predominantes de VRE e isolados apresentando HLR-Ge sugere que a aquisição de resistência a níveis elevados de gentamicina possa ter sido um evento prévio e essencial para a adaptabilidade das cepas nos hospitais avaliados. A partir disso, e como resultado da pressão seletiva decorrente do uso abusivo de vancomicina, essas amostras adquiriram determinantes genéticos de resistência a esse antimicrobiano. Nesse sentido, o clone predominante de VRE isolado nos hospitais durante o período avaliado parece ser de difícil erradicação, necessitando de medidas efetivas de bloqueio da disseminação destas cepas.

Sendo assim, esse trabalho fornece dados importantes no que diz respeito à epidemiologia molecular de amostras apresentando HLR-Ge e resistência à vancomicina. Tais dados podem ser de grande valia para o desenvolvimento de políticas de controle de infecção objetivando erradicar ou evitar a disseminação intra e inter- hospitais dentro do complexo de saúde avaliado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AARESTRUP, F.M.; BUTAYE, P. & WITTE, W. 2002. Nonhuman reservoirs of enterococci. p 55-99. *In*: Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Courvalin, P., Dunny, G.M., Murray, B.E. & Rice, L.B. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. ASM Press, Washington DC. P. 55-100.

ABBASSI, M.S.; ACHOUR, W. & HASSEN, A.B. 2007. High-Level gentamicin-resistant *Enterococcus faecium* strains isolated from bone marrow transplant patients: accumulation of antibiotic resistance genes, large plasmids and clonal strain dissemination. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **29**: 658-664.

AGERSO, Y.; PEDERSEN, A.G. & AARESTRUP, F.M. 2006. Identification of Tn5397-like and Tn916-like transposons and diversity of the tetracycline resistance gene tet (M) in enterococci from humans, pigs and poultry. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**: 832-839.

ANDEREGG, T.R.; SADER, H.S.; FRITSCH, T.R.; ROSS, J.E. & JONES, R.N. 2005. Trends in linezolid susceptibility patterns: report from the 2002-2003 worldwide Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) Program. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **26**: 13-21.

ANDERSON, D.J.; MURDOCH, D.R.; SEXTON, D.J.; RELLER, L.B.; STOUT, J.E.; CABELL, C.H. & COREY, G.R. 2004. Risk factors for infective endocarditis in patients with enterococcal bacteremia: a case-control study. *Infection* **32**: 72-77.

ANDERSON, D.J.; OLAISSON, J.R.; MIRO, J.M.; HOEN, B.; SELTON-SUTY, C.; DOCOLECOMPTE, T.; ABRUTYN, E.; HABIBI, G.; EYKYN, S.; PAPPAS, P.A.; FOWLER, V.G.; SEXTON, D.J.; ALMELA, M., COREY, G.R. & CABELL, C.H. 2005. Enterococcal prosthetic valve infective endocarditis: report of 45 episodes from International Collaboration on Endocarditis-merged database. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **24**: 665-670

ANDRADE, S.S.; SADER, H.S.; JONES, R.N.; PEREIRA, A.S.; PIGNATARI, A.C.C. & GALES, A.C. 2006. Increased resistance to first-line agents among bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in Latin America: time for local guidelines? Mem. Inst. Oswaldo Cruz **101**: 741-748.

ANTALEK, M.D.; MYLOTTE, J.M.; LESSE, A.J. & SELICK JR., J.A. 1995. Clinical and molecular epidemiology of *Enterococcus faecalis* bacteremia, with special reference to strains with high-level resistance to gentamicin. Clin. Infect. Dis. **20**: 103-109.

ARTHUR, M., MOLINAS, C., DEPARDIEU, F. & COURVALIN, P. 1993. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursor in *Enterococcus faecium* BM4147. J. Bacteriol. **175**: 117-127.

BARBOSA, D.; LIMA, L.; SILBERT, S.; SADER, H.; CENDOROGLO, M.; CAMARGO, L.; VIANNA, L.; BELASCO, A. & SESSO, R. 2004. Evaluation of the prevalence and risk factors for colonization by vancomycin-resistant *Enterococcus* among patients on dialysis. Am. J. Kidney Dis. **44**: 337-343.

BENTORCHA, F.G. & HORAUD, T. 1991. Tetracyclin resistance heterogeneity in *Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemother. **35**: 808-812.

BERKTAS, M.; YAMAN, G. & OZTURK, O. 2008. Intrinsic teicoplanin resistance of *E. casseliflavus/gallinarum* strains reported by BD Phoenix Automated Microbiology System due to *vanC* gene. J. Clin. Microbiol. Doi 10.1128/JCM.00795-08. Disponível em: <http://jcm.asm.org/cgi/reprint/JCM.00795-08v1.pdf> Acesso em 10 jul. 2008.

BHAVNANI, S.M.; DRAKE, J.A.; FORREST, A.; DEINHART, J.A.; JONES, R.N.; BIEDENBACH, D.J. & BALLOU, C.H. 2000. A nationwide, multicenter, case-control study comparing risk factors, treatment, and outcome for vancomycin-resistant and – susceptible enterococcal bacteremia. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **36**: 145-158.

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

BLAIMONT, B.; CHARLIER, J. & WAUTERS, G. 1995. Comparative distribution of *Enterococcus* species in faeces and clinical samples. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* **8**: 87-92.

BORBONE, S.; LUPO, A.; MEZZATESTA, L.; CAMPANILE, F.; SANTAGATI, M. & STEFANI, S. 2008. Evaluation of the *in vitro* activity of tigecycline against multiresistant Gram-positive cocci containing tetracycline resistance determinants. *Int. J. Antimicrob. Agents* **31**: 209-215.

BOYCE, J.M.; OPAL, S.M.; POTTER-BYNOE, G.; LAFORGE, R.G.; ZERVOS, M. J.; FURTADO, G.; VICTOR, G. & Medeiros, A.A. 1992. Emergence and nosocomial transmission of ampicillin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**: 1032-1039.

BOYD, D.A.; WILLEY, B.M.; FAWACETT, D.; GILLANI, N. & MULVEY, M.R. 2008. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, *vanL*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **52**: 2667-2672

BUGG, T.D.; WRIGHT, G.D.; DUTKA-MALEN, S.; ARTHUR, M.; Courvalin, P. & WALSH, C.T. 1991. Molecular basis of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry* **30**: 1408-1415.

BYERS, K.E.; ANGLIM, A.M.; ANNESKI, C.J. & FARR, B.M. 2002. Duration of colonization with Vancomycin-Resistant *Enterococcus*. *Infect. Control Epidemiol.* **23**: 207-211.

BUTT, T., LEGHARI, M.J. & MAHMOOD, A. 2004. In-vitro activity of nitrofurantoin in enterococcus urinary tract infection. J. Pak. Med. Assoc. **54**: 466-469.

BUSANI, L.; DEL GROSSO, M.; PALADINI, C.; GRAZIANI, C.; PANTOSTI, A.; BIAVASCO, F. & CAPRIOLI, A. 2004. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and-resistant enterococci isolated in Italy from raw meat products, farm animals, and human infections. Int. J. Food Microbiology **97**: 17-22.

CAIAFFA FILHO, H.H.; ALMEIDA, G.D.; OLIVEIRA, G.A.; SARAHYBA, L.; MAMIZUKA, E.M. & BURATTINI, M.N. 2003. Molecular characterization of *van* genes found in vancomycin-resistant *Enterococcus* sp. isolated from the Hospital das Clínicas, FMUSP, São Paulo, Brazil. Braz. J. Infect. Dis. **7**: 173-174.

CAMARGO, I.I.B.C.; BARTH, A.L.; PILGER, K.; SELIGMAN, B.G.S.; MACHADO, A.R.L. & Darini, A.L.C. 2004. *Enterococcus gallinarum* carrying the *vanA* gene cluster: first report in Brazil. Braz. J. Med. Biol. Res. **37**: 1669-1671.

CAMARGO, I.L.; GILMORE, M.S. & DARINI, A.L. 2006. 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.

CANALEJO, E.; BALLESTEROS, R.; CABEZUDO, J.; GARCÍA-ARATA, M.I. & MORENO, J. 2008. Bacteraemic spondylodiscitis caused by *Enterococcus hirae*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **27**: 613-615.

CANO, M.E.; DOMÍNGUEZ, M.A.; EZPELETA, C.; PADILLA, B.; DE ARELLANO, E.R. & MARTINEZ-MARTINEZ, L. 2008. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. Enfer. Infecc. Microbiol. Clin. **26**: 220-229.



CARVALHO, M.G.S. 1998. Caracterização bio-epidemiológica de *Enterococcus* e microrganismos relacionados, com ênfase na aplicação de métodos moleculares. Tese de Doutorado. IM, UFRJ, RJ, Brasil.

CARVALHO, M.G.S.; TEIXEIRA, L.M. & FACKLAM, R.R. 1998. Use of tests for acidification of methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside and susceptibility to efrotomycin for differentiation of strains of *Enterococcus* and some related genera. J. Clin. Microbiol. **36**: 1584-1587.

CARVALHO, M.G.S.; STEIGERWALT, A.G.; MOREY, R.E.; SHEWMAKER, P.L.; TEIXEIRA, L.M. & FACKLAM, R.R. 2004. Characterization of Three new enterococcal species, *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E1, *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E2, *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E3, isolated from human clinical specimens. J. Clin. Microbiol. **42**: 1192-1198.

CARVALHO, M.G.; STEIGERWALT, A.G.; MOREY, R.E.; SHEWMAKER, P.L.; FALSEN, E.; FACKLAM, R.R. & TEIXEIRA, L.M. 2008. Designation of the provisional new *Enterococcus* species CDC PNS-E2 as *Enterococcus sanguinicola* sp. nov., isolated from human blood, and identification of a strain previously named *Enterococcus* CDC PNS-E1 as *Enterococcus italicus* Fortina, Ricci, Mora and Manachini 2004. J. Clin. Microbiol. **46**: 3473-3476.

CASADEWALL, B. & COURVALIN, P. 1999. Characterization of the *vanD* glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. J. Bacteriol., **181**: 3644-3648.

CASSONE, M.; DEL GROSSO, M.; PANTOSTI, A.; GIORDANO, A. & POZZI, G. 2008. Detection of genetic elements carrying glycopeptide resistance clusters in *Enterococcus* by DNA microarrays. Mol. Cel.Probes **22**: 162-167.

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

CEREDA, R.; PIGNATARI, A.C.; HASHIMOTO, A. & SADER, H. 1997. *In vitro* antimicrobial activity against enterococci isolated in an university hospital in São Paulo, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* **1**: 83-90.

CEREDA, R.F.; GALES, A.C.; SILBERT, S.; JONES, R.N. & SADER, H.S. 2002. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Brazil. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **23**: 19-22.

CHOW, J.W.; THAL, L.A.; PERRI, M.B.; VAZQUEZ, J.A.; DONABEDIAN, S.M.; CLEWELL, D.B. & ZERVOS, M.U. 1993. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 2474-2477.

CHRISTIANSEN, K.J.; TURNIDGE, J.D.; BELL, J.M.; GEORGE, N.M.; PEARSON, J.C. & AUSTRALIAN GROUP ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE. 2007. Prevalence of antimicrobial resistance in *Enterococcus* isolates in Australia, 2005: report from the Australian Group on Antimicrobial Resistance. *Commun. Dis. Intell.* **31**: 392-397.

CLARK, N.C.; COOKSEY, R.C.; HILL, B.C.; SWENSON, J.M. & TENOVER, F.C. 1993. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 2311-2317.

CLARK, N.C.; TEIXEIRA, L.M.; FACKLAM, R.R. & TENOVER, F.C. 1998. Detection and differentiation of *vanC1*, *vanC-2* and *vanC-3* glycopeptide resistance genes in enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2294-2297.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, seventeenth informational supplement, document M100-S17. CLSI, Wayne, Pa, USA.

COBO MOLINOS, A.; ABRIOUEL, H.; OMAR, N.B.; LÓPEZ, R.L.; GALVEZ, A. 2008. Detection of ebp (endocarditis- and biofilm- associated pilus) genes in enterococcal isolates from clinical and non-clinical origin. *Int. J. Food Microbiol.* **126**: 123-126.

COLURN, P.S.; PILLAR, C.M.; JETT, B.D.; HAAS, W. & GILMORE, M.S. 2004. *Enterococcus faecalis* senses target cells and in response expresses cytolysin. *Science* **306**: 2270-2272.

COMERT, F.B.; KULAH, C.; AKTAS, E.; OZLU, N. & CELEBI, G. 2007. First isolation of vancomycin-resistant enterococci and spread of a single clone in a university in northwestern Turkey. *Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis.* **26**: 57-61.

COQUE, T.M.; PATTERSON, J.E.; STECKELBERG, J.M. & MURRAY, B.E. 1995. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized patients and community-based persons. *J. Infect. Dis.* **171**: 1223-1229.

COQUE, T.M.; TOMAYKO, J.F.; RICKE, S.C.; OKHYUSEN, P.C. & MURRAY, B.E. 1996. Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 2605-2609.

CORSO, A.C.; GAGETTI, P.S.; RODRÍGUEZ, M.M.; MELANO, R.G.; CERIANA, P.G.; FACCONI, D.F.; GALAS, M.F. & VRE ARGENTINEAN COLLABORATIVE GROUP. 2007. Molecular epidemiology of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* in Argentina. *Int. J. Infect. Dis.* **11**: 69-75.

COURVALIN, P. 2006. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clin. Infect. Dis.* **42**:S25-S34.

COUTO, R.C.; CARVALHO, E.A.A.; PEDROSA, T.M.G.; PEDROSO, E.R.; NETO, M.C. & BISCIONE, F.M. 2007. A 10-year prospective surveillance of nosocomial infections in neonatal intensive care units. *Am. J. Infect. Control* **35**: 183-189.

CUZON, G.; NAAS, T.; FORTINEAU, N. & NORDMANN, P. 2008. A novel Chromogenic medium for detection of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* e *E. faecalis*. J. clin. Microbiol. **46**: 2442-2444.

DAHL, K.H.; SIMONSEN, G.S.; OLSVIK, O. & SUNDSFJORD, A. 1999. Heterogeneity in the *vanB* gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. Antimicrob. Agents Chemother. **43**: 1105–1110.

D'AGATHA, E.M.; GERRITS, M.M.; TANG, Y.W.; SAMORE, M. & KUSTERS, J.G. 2001. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment-length polymorphism for epidemiological investigations of common nosocomial pathogens. Infect. Control Hosp. Epidemiol. **22**: 550-554.

D'AGATHA, E.M.C.; GAUTAM, S.; GREEN, W.K. & TANG, Y.W. 2002. High rate of false-negative results of the rectal swabs culture method in detection of gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci. Clin. Infect. Dis. **34**: 167-172.

DAIKOS, G.L.; BAMIAS, G.; KATTAMIS, C.; ZERVOS, M.J.; CHRISTAKIS, G.; PETRIKKOS, G.; TRIANTAFYLLOPOULOU, P.; ALEXANDROU, H. & SYRIOPOULOU, V. 2003. Structure, locations, and transfer frequencies of genetic elements conferring high-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis* isolates in Greece. Antimicrob. Agents Chemother. **47**: 3950-3953.

DALLA COSTA, L.M.; SOUZA, D.C.; MARTINS, L.T.F.; ZANELLA, R.C.; BRANDILEONE, M.C.; BOKERMANN, S.; SADER, H.S. & SOUZA, A.P.H.M. 1998. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brazil. Braz. J. Infect. Dis. **2**: 160-163.

DARINI, A.L.; PALEPOU, M.F. & WOODFORD, N. 2000. Effects of the movement of insertion sequences on the structure of VanA glycopeptide resistance elements in *Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemother. **44**: 1362-1364.

DA SILVA, P.S.; MONTEIRO NETO, H. & SEJAS, L.M. 2007. Successful treatment of vancomycin-resistant enterococcus ventriculitus in a child. Braz. J. Infect. Dis. **11**: 297-299.

d'AZEVEDO, P.A.; KACMAN, S.B.; SCHMALFUSS, T. & RODRÍGUEZ LM. 2000. Primeiro caso de *Enterococcus* resistente a vancomicina isolado em Porto Alegre, RS. J. Bras. Patol. Méd. Labo. **36**: 258.

d'AZEVEDO, PA. 2001. Diversidade fenotípica e genotípica de *Enterococcus* isolados em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado. UFRJ, R.J., Brasil.

d'AZEVEDO, P.A.; CANTARELLI, V.; INANIME, E.; SUPERTI, S.; DIAS, C.A.G. 2004. Avaliação de um sistema automatizado na identificação de espécies de *Enterococcus*. J. Bras. Pat. Med. Lab. **48**: 217-219.

d'AZEVEDO PA, DIAS CAG & TEIXEIRA LM. 2006 Genetic diversity and antimicrobial resistance of Enterococcal isolates from Southern region of Brazil. Rev. Inst. Méd. Trop. **48**: 11-16.

d'AZEVEDO, P.A.; FURTADO, G.H.; MEDEIROS, E.A.; SANTIAGO, K.A.; SILBERT, S. & PIGNATARI, A.C. 2008. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci strains eight years apart from its first isolation in São Paulo, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 50: 195-198.

DE LEENER, F.; MARTEL, A.; DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F. 2004. Distribution of the *erm(B)* gene, tetracycline resistance genes and *Tn1545*-like transposons in macrolide- and lincosamide resistant enterococci from pigs and humans. Microb. Drug Resist. **10**: 341-345.

DE NIEDERHÄUSERN, S.; SABIA, C.; MESSI, P.; GUERRIERI, E.; MANICARDI, G. & BONDI, M. 2007. vANa-TYPE Vancomycin-resistant enterococci in equine and swine rectal swabs and in human clinical samples. Curr. Microbiol. **55**: 240-246.

DEPARDIEU, F.; PERICHON, B. & COURVALIN, P. 2004. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. **42**: 5857-5860.

DERVISOGLOU, A.; TSIODRAS, S.; KANELLAKOPOULOU, K., PINIS, S.; GALANAKIS, N.; PIERAKAKIS, S.; GIANNAKAKIS, P.; LIVERANOU, S. NTASIOU, P.; KARAMPALI, E.; IORDANOU, C. & GIAMARELLOU, H. 2006. The value of chemoprophylaxis against *Enterococcus* species in elective cholecystectomy. Arch Surg. **141**: 1162-1167.

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

DEVRIESE, L.A.; VANCANNEYT, M.; DESCHEEMAER, P.; BAELE, M., VAN LANDUYT, H.W.; GORDTS, B.; BUTAYE, P.; SWINGS, J. & HAESBROUCK, F. 2002. Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*. J. Applied Microbiology **92**: 821-827.

DIAZGRANADO, C.A.; ZIMMER, S.M.; KLEIN, M. & JERNIGAN, J.A. 2005. Comparison of mortality associated with vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bloodstream infections: a meta-analysis. Clin. Infect. Dis. **41**: 327-332.

DOMIG, K.J. MAYER, H.K. & KNEIFEL, W. 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* sp. 2. Pheno- and genotypic criteria. Int. J. Food Microbiol. **88**: 165-188.

DONABEDIAN, S.M.; THAL, L.A.; HERSHBERGER, E.; PERRI, M.B.; CHOW, J.W.; BARTLETT, P. JONES, R.; JOYCE, K. ROSSITER, S.; GAY, K.; JOHNSON, J.; MACKINSON, C.; DEBESS, E.; MADDEN, J.; ANGULO, F. & ZERVOS, M.J. 2003. Molecular characterization of gentamicin-resistant *Enterococci* in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. J. Clin. Microbiol. **41**: 1109-1113. Arch. Surg. **141**: 1162-1167.

DRAGHI, D.C.; BENTON, B.M.; KRAUSE, K.M.; THORNSBERRY, C.; PILLAR, C. & SAHM, D.F. 2008. In vitro activity of telavancin against recent Gram-positive clinical isolates: results of the 2004-05 Prospective European Surveillance Initiative. J. Antimicrob. Chemother. **62**: 116-121.

DUH, R.W.; SINGH, K.V.; MALATHUM, K. & MURRAY, B.E. 2001. *In vitro* activity of 19 antimicrobial agents against enterococci from healthy subjects and hospitalized patients and use of an *ace* gene probe from *Enterococcus faecalis* for species identification. Microbiol. Drug Resist. **7**: 39-46.

DUNNY, G.M.; LEONARD, B.A. & HEDBERG, P.J. 1995. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: interbacterial and host-parasite chemical communication. J. Bacteriol. **177**: 871-876.

DUTTA, I. & REYNOLDS, P.E. 2003. The vanC-3 vancomycin resistance gene cluster of *Enterococcus flavescens* CCM439. J. Antimicrob. Chemother. **51**: 703-706.

EATON, T.J. & GASSON, M.J. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchanges between food and medical isolates. Appl. Environ. Microbiol. **67**: 1628-1635.

EDMOND, M.B.; OBER, J.F.; WEINBAUM, D.L.; PFALLER, M.A.; HWANG, T.; SANFORD, M.D. & WENZEL, R.P. 1995. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: risk factors for infection. Clin. Infect. Dis., **20**: 1126-1133.

ELIOPOULOS, G.M. 1993. Aminoglycoside-resistant enterococcal endocarditis. Infect. Dis. Clin. North. Am. **7**: 117-133.

EMANEINI, M.; ALIGHOLI, M. & AMINSHAHI, M. 2008. Characterization of glycopeptides, aminoglycosides and macrolide resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospitals in Tehran. Pol. J. Microbiol. **57**: 173-178.





FADDA, G.; NICOLETTI, G.; SCHITO, G.C.; TEMPERA, G. 2005. Antimicrobial susceptibility patterns of contemporary pathogens from uncomplicated urinary tract infections isolated in a multicenter Italian survey: possible impact on guidelines. *J. Chemother.* **17**: 251-257.

FINES, M.; PERICHON, B.; REYNOLDS, P.; SAHM, D.F. & COURVALIN, P. 1999. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**: 2161-2164.

FALK, P.S.; WINNIKE, J.; WOODMANSEE, C.; DESANI, M. & MAYHALL, C.G. 2000. Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a burn unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **21**: 575-582.

FONTANA, R.; LIGOZZI, M.; PITTALUGA, F. & SATTA, G. 1996. Intrinsic penicillin resistance in enterococci. *Microb. Drug Resist.* **2**: 209-213.

FORTINA, M.G.; RICCI, G.; MORA, D. & MANACHINI, P.L. 2004. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1717-1721.

FORTÚN, J.; COQUE, T.M.; MARTÍN-DÁVILA, P.; MORENO, L.; CANTÓN, R.; LOZA, E.; BAQUERO, F. & MORENO, S. 2002. Risk factors associated with ampicillin resistance inpatients with bacteremia caused by *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**: 1003-1009.

FREEMAN, C.; ROBINSON, A.; COOPER, B.; MAZENS-SULLIVAN, M.; QUINTILIANI, R. & NIGHTINGALE, C. 1993. In vitro antimicrobial susceptibility of glycopeptide-resistant enterococci. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* **21**: 47-50.

[Freitas, M.C.; Pacheco-Silva, A.; Barbosa, D.; Silbert, S.; Sader, H.; Sesso, R. & Camargo, L.F.](#) 2006. Prevalence of vancomycin-resistant enterococcus fecal colonization among kidney transplant patients. *BMC Infect. Dis.* **22**: 133.

FURTADO, G.H.C.; MARTINS, S.T.; COUTINHO, A.P.; SOARES, G.M.M.S.; WEY, S.B. & SERVOLO, E.A. 2005a. Incidence of vancomycin-resistant *Enterococcus* at a university hospital in Brazil. Rev. Saúde Pública **39**: 1-5.

FURTADO, G.H.; MARTINS, S.T.; COUTINHO, A.P.; WEY, S.B. & MEDEIROS, E.A. 2005b. Prevalence and factors associated with rectal vancomycin-resistant enterococci colonization in two intensive care units in São Paulo, Brazil. Braz. Infect. Dis. **9**: 64-69.

FURTADO, G.H.; MENDES, R.F.; PIGNATARI, A.C.; WEY, S.B. & MEDEIROS, E.A. 2006. Risk factors for vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* bacteraemia in hospitalized patients: an analysis of two case-control studies. Am. J. Infect. Control. **34**: 447-451.

GARCIA-MIGURA, L.; LIEBANA, E. & JENSEN, L.B. 2007. Transposon characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) and dissemination of resistance associated with transferable plasmids. J. Antimicrob. Chemother. **60**: 263-268.

GIKAS, A.; CHRISTIDOU, A.; SCOULICA, E.; NIKOLAIDIS, P.; SKOUTELIS, A.; LEVIDIOTOU, S.; KARTALI, S.; MALTEZOS, E.; METALIDIS, S.; KIOUMIS, J.; HALIOTIS, G.; DIA, S.; ROUMBELAKI, M.; PAPAGEORGIU, N.; KRITSOTAKIS, E.I. & TSELENTIS, Y. 2005 Epidemiology and molecular analysis of intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci in greek hospitals. J. Clin. Microbiol. **43**: 5796-5799.

GILAD, J.; BORER, A.; RIESENBERG, K.; PELED, N.; SHNAIDER, A. & SCHLAEFFER, F. 1998. *Enterococcus hirae* septicemia in a patient with end-stage renal disease undergoing hemodialysis. Eur. J. Clin. Microbiol. Dis. **17**: 576-577.

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

GILMORE, M.S.; COBURN, P.S.; NALLAPAREDDY, S.R. & MURRAY, B.E. 2002. Enterococcal virulence.. *In*: Gilmore, M.S. Clewell, D.B., Courvalin, P., Dunny, G.M., Murray, B.E. & Rice, L.B. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. ASM Press, Washington DC. p 301-54

GIRAFFA, G. 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 163-171.

GONZALES, R.D.; SCHRECKENBERGER, P.C.; GRAHAM, M.B.; KELKAR, S.; DENBESTEN, K. & QUINN, J.P. 2001. Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet* **14**: 1179.

GORDILLO, M.E.; SINGH, K.V.; BAKER, C.J. & MURRAY, B.E. 1993. Typing of Group B streptococci: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and conventional electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 1430-1434.

GORDILLO, M.E.; SINGH, K.V. & MURRAY, B.E. 1993. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 1570-1574.

GORDON, S.; SWENSON, J.M.; HILL, B.C.; PIGOTT, N.E.; FACKLAM, R.R.; COOKSEY, R.C.; THORNSBERRY, C.; ENTEROCOCCAL STUDY GROUP; JARVIS, W.R. & TENOVER, F.C. 1992. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 2373-2378.

GREEN, M.R. ANASETTI, C., SANDIN, R.L., ROLFE, N.E. & GREENE, J.N. 2006. Development of daptomycin resistance in a bone marrow transplant patient with vancomycin-resistant *Enterococcus durans*. *J. Oncol. Pharm. Pract.* **12**: 179-181.

GRINHAUM, R.S.; GIMARÃES, T.; KUSANO, F.; HOSINO, N.; SADER, H. & CEREDA, R.F. 2003. A pseudo-outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **24**: 461-464.

GUERRERO, F.; MANUEL, L.; GOYENECHEA, A.; VERDEJO, C.; ROBLAS, R.F. & GORGOLAS, M. 2007. Enterococcal Endocarditis on Native and Prosthetic Valves: A Review of Clinical and Prognostic Factors With Emphasis on Hospital-Acquired Infections as a Major Determinant of Outcome. *Medicine* **86**: 363-377.

GUVEN, M.; BULUT, Y.; SEZER, T.; ALADAG, I.; EYIBILEN, A. & ETIKAN, I. 2006. Bacterial etiology of acute otitis media and clinical efficacy of amoxicillin-clavulanate versus azithromycin. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol* **70**: 915-923.

HAAS, W.; SHEPARD, B.D. & GILMORE, M.S. 2002. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature* **415**: 84-87.

HALL, L.M.C.; DUKE, B.; URWIN, G. & GUINEY, M. 1992. Epidemiology of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection in a teaching hospital in London, United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 1953-1957.

HANCOCK, L.E., & GILMORE, M.S. 2000. Pathogenicity of enterococci. *In*: Fischetti, V.A. & Novick, R.P. (ed.) *Gram-positive pathogens*: ASM Press. Washington, DC. P. 251-258.

HANDWERGER, S.; RAUCHER, B.; ALTARAC, D.; MONKA, J.; MARCHIONE, S.; SINGH, K.V.; MURRAY, B.E.; WOLFF, J. & WALTERS, B. 1993. Nosocomial outbreak due to *Enterococcus faecium* highly resistant to vancomycin, penicillin and gentamicin. *Clin. Infect. Dis.* **16**: 750-755.

HANNECART-POKORNI, E.; DEPUYDT, F.; DE WIT, L.; VAN BOSSUYT, E.; CONTENT, J. & VANHOOF, R. 1997. Characterization of 6'N-aminoglycoside acetyltransferase gene *aac(6')I* associated with a *sull*-type integron. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 314-318.

HIGASHIDE, T.; TAKAHASHI, M.; KOBAYASHI, A.; OHKUBO, S.; SAKURAI, M.; SHIRAO, Y.; TAMURA, T. & SOGIYAMA. 2005. Endophthalmitis caused by *enterococcus mundtii*. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 1475-1476.

HILL, E.E.; HERIJGERS, P.; CLAUS, P.; VANDERSCHUEREN, S.; HERREGODS, M.C. & PEETERMANS, W.E. 2007. Infective endocarditis: changing epidemiology and predictors of 6-month mortality: a prospective cohort study. *Eur. Heart Journal* **28**: 196-203.

HÖRNER, R.; LISCANO, M.G.H.; MARASCHIN, M.M.; SALLA, A.; MENEGHETTI, B.; FORNO, N.F.D. & RIGHI, R.A. 2005. Susceptibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* **41**: 391-395.

HSUEH, P.R., TENG, L.J., CHEN, Y.C., YANG, P.C., HO, S.W. & LUH, K.T. 2000. Recurrent bacteremic peritonitis caused by *Enterococcus cecorum* in a patient with liver cirrhosis. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2450-2452.

HUYCKE, M.M., SPIEGEL, C.A., & GILMORE, M.S. 1991. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1626-1634.

HUYCKE, M.H., SAHM, D.F. & GILMORE, M.S. 1998. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg. Infect. Dis.* **4**: 239-249.

IARIA, C.; STASSI, G.; COSTA, G.B., DI LEO, R.; TOSCANO, A.; CASCIO, A. 2005. Enterococcal meningitis caused by *Enterococcus casseliflavus*. First case report. *BMC Infect. Dis.* **14**: 3.

IKE, Y. & CLEWELL, D.B. 1992. Evidence that the hemolysin/bacteriocin phenotype of *Enterococcus faecalis* subsp. *Zymogenes* can be determined by plasmids in different incompatibility groups as well as by the chromosome. *J. Bacteriol.* **174**: 8172-8174.

IWEN, P.; RUPP, M.E.; SCHRECKENBERGER, P.C. & HINRICHS, S.H. 1999. Evaluation of the revised MicroScan Dried Overnight Gram-positive identification panel to identify *Enterococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 3756-3758.

JAYARATNE, P. & RUTHERFORD, C. 1999. Detection of clinically relevant genotypes of vancomycin-resistant enterococci in nosocomial surveillance specimens by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2090-2092.

JESUDASON, MV; PRATIMA, VL; PANDIAN, R, ABIGAIL, S. 1998. Characterization of penicillin resistant enterococci. *Indian J. Med. Microbiol.* **16**: 16-18.

JETT, B.D., HUYCKE, M.M., & GILMORE, M.S. 1994. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol. Rev.* **7**: 462-478.

JONES, R.N.; BEACH, M.L.; PFALLER, M.A. & DOERN, G.V. 1998. Antimicrobial activity of gatifloxacin tested against 1676 strains of ciprofloxacin-resistant gram-positive cocci isolated from patient infection in North and South America. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **32**: 247-252.

JONES, M.E.; GESU, G.; ORTISI, G.; SAHM, D.F.; CRITCHKY, I.A. & GOGLIO, A. FOR THE ASSICIAZIONE MICROBIOLOGI CLINICI ITALIANI (AMCLI) COMMITTEE FOR ANTIBIOTICS. 2002. Proficiency of italian clinical laboratories in detectiong reduced glycopeptide susceptibility in *Enterococcus* and *Staphylococcus* spp. using routine laboratory methodologies. *Clin. Microbiol. Infect.* **8**: 101-111.

JONES, S.; ENGLAND, R.; EYANS, M.; SOO, S.S.; VENJATESAN, P. 2007. Microbiologically confirmed meningoencephalitis due to *Enterococcus avium*: a first report. *J. Infect.* **54**: 129-131.

KAINER, M.A.; DEVASIA, R.A.; JONES, T.F. SIMMONS, B.P.; MELTON, K. CHOW, S.; BROYLES, J.; MOORE, K.L.; CRAIG, A.S. & SCHAFFNER, W. 2007. Response to emerging infection leading to outbreak of linezolid-resistant enterococci. *Emerg. Infect. Dis.* **13**: 1024-1030.

KAK, V. & CHOW, J.W. 2002. Acquired antibiotic resistance in enterococci. *In*: Gilmore, M.S. Clewell, D.B., Courvalin, P., Dunny, G.M., Murray, B.E. & Rice, L.B. *The enterococci*:

*pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. ASM Press, Washington DC. p 355-83

KANEMATSU, E.; DEGUCHI, T.; YASUDA, M.; KAWAMURA, T.; NISHINO, Y. & KAWADA, Y. 1998. Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of DNA topoisomerase IV associated with quinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 433-435.

KAPLAN, A.H.; GILLIGAN, P.H. & FACKLAM, R.R. 1988. Recovery of resistant enterococci during vancomycin prophylaxis. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 1216-1218.

KARIYAMA, R.; MITSUHATA, R.; CHOW, J.W.; CLEWELL, D.B. & KUMON, H. 2000. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance of isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 3092-3095.

KLIBI, N.; GHARBI, S.; MASMOUDI, A.; BEM SLAMA, K.; POETA, P.; ZARAZAGA, M.; FENDRI, C.; BOUDABOUS, A. & TORRES, C. 2006. Antibiotic resistance and mechanisms implicated in clinical enterococci in a Tunisian hospital. *J. Chemother.* **18**: 20-26.

KO, M.C.; LIU, C.K.; WOUNG, L.C.; LEE, W.K.; JENG, H.S.; LU, S.H.; CHIANG, H. S. & LI, C.Y. 2008. Species and Antimicrobial Resistance of Uropathogens Isolated from Patients with Urinary Catheter. *Tohoku J. Exp. Med.* **214**: 311-319.

KOCH, S.; HUFNAGEL, M.; THEILACKER, C. & HUEBNER, J. 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic and prophylactic possibilities. *Vaccine* **22**: 822-830.

KOLAR, M.; PANTUCEK, R.; BARDON, J.; CEKANOVA, L.; KESSELOVA, M.; SAUER, P.; VAGBEROVA, I. & KOUKALOVA, D. 2005. Occurrence of vancomycin-resistant enterococci in human and animals in the Czech Republic between 2002 and 2004. *J. Med. Microbiol.* **54**: 965-967.

KOORT, J.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; SUKURA, A. & BJORKROTH, J. 2004. *Enterococcus hermanniensis* sp. nov., from modified-atmosphere-packaged broiler meat and canine tonsils." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:1823-1827.

KURIYAMA, T.; WILLAMS, D.W.; PATEL, M.; LEWIS, M.A.O.; JENKINS, L.E.; HILL, D.W. & HOSEIN, I.K. 2003. Molecular characterization of clinical and environmental isolates of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* from a teaching hospital in Wales. *J. Med. Microbiol.* **52**: 821-827.

KURUP, A.; CHLEBICKI, M.P.; LING, M.L.; KOH, T.H.; TAN, K.Y.; LEE, L.C. & HOWE, K.B.M. 2008. Control of a hospital-wide vancomycin-resistant Enterococci outbreak. *Am. J. Infect. Control.* **36**: 206-211.

LAMBIASE, A.; DEL PEZZO, M.; PIAZZA, O.; PETAGNA, C.; DE LUCA, C. & ROSSANO, F. 2007. Typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains in a cohort of patients in an italian intensive care unit. *Infection* **35**: 428-433.

LAUPLAND, K.B.; ROSS, T.; PITOUT, J.D.; CHURCH, D.L. & GREGSON, D.B. 2007. Community-onset urinary tract infections: a population-based assessment. *Infection* **35**: 150-153.

LAW-BROWN, J. & MEYERS, P.R. 2003. *Enterococcus phoeniculicola* sp. nov., a novel member of the enterococci isolated from the uropygial gland of the Red-billed Woodhoopoe, *Phoeniculus purpureus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:683-685.

LEAVIS, H.L.; BONTEN, M.J.M. & WILLEMS, R.J.L. 2006. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 454-460.

LECLERCQ, R.; DERLOT, E.; DUVAL, J. & COURVALIN, P. 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med.* **319**: 157-161.



LECLERCQ, R.; DUTKA-MALEN, S.; DUVAL, J. & COURVALIN, P. 1992. Vancomycin resistance gene *vanC* is specific to *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**: 2005-2008.

LEE, W.G.; HUH, J.Y.; CHO, S.R. & LIN, Y.A. 2004. Reduction in glycopeptide resistance in vancomycin-resistant enterococci as a result of *vanA* cluster rearrangements. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 1379–81.

LENTINO, J.R.; NARITA, M. & YU, V.L. 2008. New antimicrobial agents as therapy for resistant gram-positive cocci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**: 3-15.

LESTER, C.H.; FRIDMODT-MOLLER, N. & HAMMERUM, A.M. 2004. Conjugal transfer of aminoglycoside and macrolide resistance between *Enterococcus faecium* isolates in the intestine of streptomycin-treated mice. *FEMS Microbiol Lett.* **235**: 385-391.

LEWIS, J.S.; OWENS, A.; CADENA, J.; SABOL, K.; PATTERSON, J.E. & JORGENSEN, J.H. 2005. Emergence of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 1664-1665.

LIGOZZI, M.; PITTALUGA, F. & FONTANA, R. 1996. Modification of penicillin-binding protein 5 associated with high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 354-357.

LÓPEZ, F.; CULEBRAS, E.; BETRIÚ, C.; RODRIGUEZ-AVIAL, I.; GÓMEZ, M. & PICAZO, J.J. 2008. Antimicrobial susceptibility and macrolide resistance genes in *Enterococcus faecium* with reduced susceptibility to quinupristin-dalfopristin: level of quinupristin-dalfopristin resistance is not dependent on *erm(B)* attenuator region sequence. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* [doi:10.1016/j.diagmicrobio.2008.06.004](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.06.004) Acesso em 07 de outubro de 2008.

LUNA, V.A.; COATES, P.; EADY, E.A.; COVE, J.H.; NGUYEN, T.T.H. & ROBERTS, M.C. 1999. A variety of gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes. J. Antimicrob. Chemother. **44**: 19-25.

LYEROVÁ, L.; VIKLICKÝ, O.; NEMCOVÁ, D. & TEPLAN, V. 2008. The incidence of infectious diseases after renal transplantation: a single-centre experience. Int. J. Antimicrob. Agents **31**: S58-62.

MA, X.; MICHIAKI, K.; TAKAHASHI, A.; TANIMOTO, K. & IKE, Y. 1998. Evidence of nosocomial infection in Japan caused by high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and identification of the pheromone-responsive conjugative plasmid encoding gentamicin resistance. J. Clin. Microbiol. **36**: 2460-2464.

MACOVEI, L. & ZUREK, L. 2006. Ecology of antibiotic resistance genes: characterization of enterococci from houseflies collected in food settings. Appl. Environ. Microbiol. **72**: 4028-4035.

MALANI, P.N., KAUFFMAN, C.A. & ZERVOS, M.J. 2002. Enterococcal disease, epidemiology and treatment. In: Gilmore, M.S. Clewell, D.B., Courvalin, P., Dunny, G.M., Murray, B.E. & Rice, L.B. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. ASM Press, Washington DC. p 385-408.

MALATHUM, K.; SINGH, K.V.; WEINSTOCK, G.M. & MURRAY, B.E. 1998. Repetitive sequence-based PCR versus pulsed-field gel electrophoresis for typing of *Enterococcus faecalis* at the subspecies level. J. Clin. Microbiol. **36**: 211-215.

MALTHOTRA-KUMAR, S.; HACCURIA, K.; MICHIELS, M.; IEVEN, M.; POYART, C.; HRYNIEWICZ, W. & GOOSSENS, H. 2008. Current trends in Rapid Diagnostics for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Glycopeptide-Resistant *Enterococcus*. J.Clin. Microb. **46**: 1577-1587.

MANSON, J.A.; KEIS, S.; SMITH, J.M. & COOK, G.M. 2003. A clonal lineage of VanA-type *Enterococcus faecalis* predominates in vancomycin-resistant enterococci isolated in New Zeland. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **47**: 204-210.

MARKOWITZ, S.M.; WELLS, V.D.; WILLIAMS, D.S.; STUART, C.G.; COUDRON, P.E. & WONG, E.S. 1991. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of  $\beta$ -lactamase-producing, aminoglycoside-resistant isolates of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 1075-1080.

MARTINEZ-ODRIZOLA, P.; MUÑOZ-SÁNCHEZ, J.; GUTIÉRREZ-MACIAS, A.; ARRIOLA-MARTINEZ, P.; MONTERO-APARICIO, E.; EZPELETA-BAQUEDANO, C.; CISTERNA-CÁNCER, R. MIGUEL DE LA VILLA, F. 2007. Na analysis of 182 enterococcal bloodstream infections: epidemiology, microbiology, and outcome. *Enferm. Infecc. Microbiol. Cli.* **25**: 503-507.

MASCHIETO, A.; MARTINEZ, R.; PALAZZO, I.C.V.; DARINI, A.L.C. 2004. Antimicrobial Resistance to *Enterococcus* sp. isolated from the intestinal tract of patients from a university hospital in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **99**: 763-767.

MASCINI, E.M.; BONTEN, M.J. 2005. Vancomycin-resistant enterococci: consequences for therapy and infection control. *Clin. Microbiol. Infect.* **11 (supl. 4)**: 43-46.

McKESSAR, S.J.; BERRY, A.M.; BELL, J.M.; TURNIDGE, J.D. & PATON, J.C. 2000. Genetic characterization of *vanG*, a novel resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 3224-3228

MEGRAN, D.W. 1992. Enterococcal endocarditis. *Clin. Infect. Dis.* **80**: 63-71.

MENDONÇA, C.R.V. 1998. Ocorrência e diversidade genética de enterococos, apresentando resistência a níveis elevados de antimicrobianos, isolados em quatro instituições de saúde na cidade do Rio de Janeiro. Tese de Mestrado. IMPPG, UFRJ, R.J., Brasil.

MERQUIOR, V.L.C.; PERALTA, J.M.; FACKLAM, R.R. & TEIXEIRA, L.M. 1994. Analysis of electrophoretic whole-cell protein profiles as a tool for characterization of *Enterococcus* species. *Curr. Microbiol.* **28**: 149-153.

MERQUIOR, V.L.; NETZ, D.J.; CAMELLO, T.C. & TEIXEIRA, L.M. 1997. Characterization of enterococci isolated from nosocomial and community infections in Brazil. *Adv. Exp. Med. Biol.* **418**: 281-283.

MERQUIOR, V.L.; GONÇALVES NEVES, F.P.; RIBEIRO, R.L.; DUARTE, R.S.; de ANDRADE MARQUES, E. & TEIXEIRA, L.M. 2008. Bacteraemia associated with a vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* strain harbouring both the *vanA* and *vanC1* genes. *J. Med. Microbiol.* **57**: 244-245.

[Młynarczyk, G.; Grzybowska, W.; Młynarczyk, A.; Tyski, S.; Kawecki, D.; Łuczak, M.; Chmura, A. & Rowiński, W.](#) 2007. Significant increase in the isolation of glycopeptide-resistant enterococci from patients hospitalized in the transplant surgery ward in 2004-2005. *Transplant Proc.* **39**: 2883-5.

MONDINO, S.S.B. 2001. Caracterização fenotípica e genotípica de enterococos isolados de portadores intestinais e de pacientes em dois hospitais da cidade de Niterói. Tese de Doutorado. Instituto de Microbiologia. IMPPG,UFRJ, R.J., Brasil.

MONDINO, S.S.B.; CASTRO, A.C.D.; MONDINO, P.J.; CARVALHO, M.G.; SILVA, K.M. & TEIXEIRA, L.M. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of clinical and intestinal enterococci isolated from inpatients and outpatients in two brazilian hospitals. *Microbiol. Drug. Resist.* **9**: 167-74.

MORRISON, D. WOODFORD, W. & COOKSON, B. 1997. Enterococci as emerging pathogens of humans. *J. Appl. Microbiol.* **83**: S89-SS99.

MUNDY, L.M.; SAHM, D.F., & GILMORE, M.S. 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 513-522.

MUNOZ-PRICE, L.S.; LOLANS, K. & QUINN, J.P. 2005. Emergence of resistance to daptomycin during treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* infection. Clin. Infect. Dis. **41**: 565-566.

MURAO, S.; HOSOKAWA, H.; HOSOKAWA, Y.; ISHIDA, T. & TAKAHARA, J. 1997. Discitis, Infectious arthritis, and bacterial meningitis in a patient with pancreatic diabetes. Internal Medicine **36**: 443-445.

MURRAY, B.E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. Clin. Microbiol. Rev. **3**: 46-65.

MURRAY, B.E. 1991. New aspects of antimicrobial resistance and the resulting therapeutic dilemmas. J. Infect. Dis. **163**: 1185-1194.

MURRAY, B.E.; LOPARDO, H.A.; RUBEGLIO, E.A.; FROSOLONO, M. & SINGH, K.V. 1992. Intra- hospital spread of a single gentamicin-resistant,  $\beta$ -lactamase-producing strain of *Enterococcus faecalis* in Argentina. Antimicrob. Agents Chemother. **36**: 230-232.

MURRAY, B.E. 2000. Vancomycin-resistant enterococcal infections. N. Eng. J. Med. **342**: 710-721.

NABER, K.G.; SCHITO, G.; BOTTO, H.; PALOU, J.; MAZZZEI, T. 2008. Surveillance study in Europe and Brazil on clinical aspects and antimicrobial resistance epidemiology in female with cystitis (ARESC): implications for empiric therapy. Eur. Urol. PMID: 18511178

NALLAPAREDDY, S.R.; DUH, R.W.; SINGH, K.V.; MURRAY BE. 2002. Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: pilot study using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. **40**: 868-876.

NNIS (2001) National Nosocomia Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary from January 1992-June 2001, issued August 2001. Am. J. Infect Control **29**: 4004-421.

NG, L.-K.; MARTIN, I.; ALFA, M. & MULVEY, M. 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol. Cell. Probes* **15**: 209-215.

NISHIMOTO, Y.; KOBAYASHI, N.; ALAM, M.M.; ISHINO, M.; UEHARA, N. & WATANABE, N. 2005. Analysis of the prevalence of tetracycline resistance genes in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a Japanese hospital. *Microb. Drug Resist.* **11**: 146-153.

NOVAIS, C.; FREITAS, A.R.; SOUZA, J.C.; BAQUERO, F.; COQUE, T.M. & PEIXE, L.V. 2008. Diversity of Tn1546 and its role in the dissemination of vancomycin-resistant enterococci in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 1001-1008.

OH, W.S.; KO, K.S.; SONG, J.H.; LEE, M.Y.; PARK, S.; PECK, K.R.; LEE, N.Y.; KIM, C.; LEE, H.; KIM, S.; CHANG, H.; KIM, Y.; JUNG, S.; SON, J.S.; YEOM, J.; KI, H.K. & WOO, G. 2005. High rate of resistance to quinupristin–dalfopristin in *Enterococcus faecium* clinical isolates from Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 5176–5178.

ORTU, M.; GABRIELLI, E.; CARAMMA, I.; ROSSOTTI, R.; GAMBIRASIO, M. & GERVASONI, C. 2008. *Enterococcus gallinarum* endocarditis in a diabetic patient. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **81**: e18-21.

PACHECO, A.B.E.; GUTH, B.E.C.; SOARES, K.C.C.; NISHIMURA, L.; DE ALMEIDA, D.F. & FERREIRA, L.C.S. 1997. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1521-1525.

PAPAPARASKEVAS, J.; VATOPOULOS, A.; TASSIOS, P.T.; AVLAMI, A.; LEGAKIS, N.J. & KALAPOTHAKI, V. 2000. Diversity among high-level aminoglycoside-resistant enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**: 277-83.

PATEL, R.; UHL, J.R.; HOPKINS, M.K. & COCKERILL, F.R. 1997. Multiplex PCR detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes in enterococci. J. Clin. Microbiol. **35**:703-707.

PAULA, G. R., 2000. Análise da diversidade genética de amostras de enterococos obtidas no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, de 1995 a 1997. Tese de Mestrado. UFRJ, RJ, Brasil.

PELICIOLI RIBOLDI, G.; PREUSSER DE MATTOS, E.; GUEDES FRAZZON, A.P. ALVES D'AZEVEDO, P.A. & FRAZZON, J. 2008. Phenotypic and genotypic heterogeneity of *Enterococcus* species isolated from food in Southern Brazil. J. Basic Microbiol. **48**: 31-37.

POETA, P.; COSTA, D.; IGREJAS, G.; ROJO-BEZARES, B.; SÁENZ, Y.; ZARAZAGA, M.; RUIZ-LARREA, F.; RODRIGUES, J. & TORRES, C. 2007. Characterization of *vanA*-containing *Enterococcus faecium* isolates carrying Tn5397-like and Tn916/Tn1545-like transposons in wild boars. Microb. Drug Resist. **13**: 151-156.

POURSHAFIE, M.R.; TALEBI, M.; SAIFI, M. KATOULI, M. ; ESHRAGHI, S.; KÜHN, I. & MÖLLBY, R. 2008. Clonal heterogeneity of clinical isolates of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with unique *vanS*. Trop. Med. Int. Health. **13**: 722-727.

PORTILLO, A.; RUIZ-LARREA, F.; ZARAZAGA, M.; ALONSO, A.; MARTINEZ, J.L. & TORRES, C. 2000. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* sp. Antimicrob. Agents Chemother., **44**: 967-971.

PRAKASH, V.P.; RAO, S.R.; PARIJA, S.C. 2005. Emergence of unusual species of enterococci causing infections, South India. BMC Infect. Dis. **5**: 5-14.

QU, T.T.; CHEN, Y.G.; YU, Y.S.; WEI, Z.Q.; ZHOU, Z.H. & LI, L.J. 2006. Genotypic diversity and epidemiology of high-level gentamicin resistant *Enterococcus* in a Chinese hospital. J. Infect. **52**: 124-130.

QUIÑONES, D.; GOÑI, P.; RUBIO, M.C.; DURAN, E.; GÓMEZ-LUS, R. 2005. Enterococci spp. isolated from Cuba: species frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* **51**: 63-67.

QUINTILIANI, R.; EVERS, S. JR. & COURVALIN, P. 1993. The *vanB* gene confers various levels of self-transferable resistance to vancomycin in enterococci. *J. Infect. Dis.* **167**: 1220-1223.

RAVEH, D.; ROSENZWEIG, I.; RUDENSKY, B.; WIENER-WELL, Y. & YINNON, A.M. 2006. Risk factors for bacteriuria due to *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus* spp in patients hospitalized via the emergency department. *Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis.* **25**: 331-334.

REIS, A.O.; CORDEIRO, J.C.; MACHADO, A.M. & SADER, H.S. 2001. In vitro antimicrobial activity of linezolid tested against vancomycin-resistant enterococci isolated in Brazilian hospitals. *Braz. J. Infect. Dis.* **5**: 243-251.

REIK, R.; TENOVER, F.C.; KLEI, E. & McDONALD, L.C. 2008. The burden of vancomycin-resistant enterococcal infections in US hospitals, 2003 to 2004. *Diagn. Infect. Dis.* **62**: 81-85.

RENDE-FOURNIER, R.; LECLERCQ, R.; GALIMAND, M.; DUVAL, J. & COURVALIN, P. 1993. Identification of the *satA* gene encoding a streptogramin A acetyltransferase in *Enterococcus faecium* BM4281. *Gene* **37**: 2119-2125.

REYNOLDS, P.E. & COURVALIN, P. 2005. Vancomycin resistance in enterococci due to synthesis of precursors terminating in D-alanyl-D-serine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 21-25.

RIBAS, R.M.; DARINI, A.L.; MOREIRA, T.A.; FREITAS, C. & GONTIJO FILHO PP. 2007. Vancomycin-resistant VanA phenotype *Enterococcus faecalis*: first case in Minas Gerais state and epidemiological considerations. *Braz. J. Infect. Dis.* **11**: 439-440.



RICE, L.B.; CARIAS, L.L.; DONSKEY, C.J. & RUDIN, S.D. 1998. Transferable, plasmid-mediated VanB-type glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 963-964.

RICE, L.B.; HUTTON-THOMAS, R.; LAKTICOVA, V.; HELFAND, M.S.; DONSKEY, C.J. 2004.  $\beta$ -Lactam antibiotics and gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci. *J. Infect. Dis.* **189**: 1113-1118.

RICH, R.L.; DEMELER, B.; KREIKEMEYER, B.; OWENS, R.T.; LABRENZ, S.; NARAYANNA, S.V.; WEINSTOCK, J.M.; MURRAY, B.E. & HOOK, M. 1999. Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* **274**: 26939-26945.

RICHARDS, M.J.; EDWARDS, J.R.; CULVER, D.H. & GAYNES, R.P. 2000. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **21**: 510-515.

ROBERTS, M.C. & HILLIER, L. 1990. Genetic basis of tetracycline resistance in urogenital bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34** 476-478.

ROBERTS, M.C.; SUTCLIFFE, J.; COURVALIN, P.; BOGO JENSEN, L.; ROOD, J. & SEPPALA. 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **43**: 2823-2830.

RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; RAMÍREZ, E.; MUNIAIN, M.A.; SANTOS, J.; JOYANES, P.; GONZÁLEZ, F.; GARCÍA-SÁNCHEZ, M. & MARTINEZ-MARTINEZ, L. 2005. Colonization by high-level aminoglycoside-resistant enterococci in intensive care unit patients: epidemiology and clinical relevante. *J. Hosp. Infect.* **60**: 353-359.

ROSSI, F. & ANDREAZZI, D. 2006. Overview of tigecycline and its role in the era of antibiotic resistance. *Braz. J. Infect. Dis.* **10**: 203-216.

ROUFF, K.L.; DE LA MAZA, L.; MURTAGH, M.J.; SPARGO, J.D. & FERRARO, M.J. 1990. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 435- 437.

RUIZ-GARBAJOSA, P.; CANTÓN, R.; PINTADO, V.; COQUE, T.M.; WILLEMS, R.; BAQUERO, F. DEL CAMPO, R. 2006. Genetic and phenotypic differences among *Enterococcus faecalis* clones from intestinal colonization and invasive disease. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**: 1193-1198.

RYBKINE, T.; MAINARDI, J.L.; SOUGAKOFF, W.; COLLATZ, E. & GUTMANN, L. 1998. Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of  $\beta$ -lactam resistance. *J. Infect. Dis.* **178**: 129-163.

SADER, H.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C.; SILVA, J.B.; PIGNATARI, A.C. & THE SENTRY PARTICIPANTS GROUP (LATIN AMERICA). 2004. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results from 1997 through 2001. *Braz. J. Infect. Dis.* **8**: 25-79.

SADER, H.S.; WATTERS, A.A.; FRITSCHKE, T.R. & JONES, R.N. 2007. Daptomycin antimicrobial activity tested against methicillin-resistant staphylococci and vancomycin-resistant enterococci isolated in European medical centers (2005). *BMC Infect. Dis.* **18**: 7-29.

SAEEDI, B.; HÄLLGREN, A.; ISAKSSON, B.; JONASSON, J.; NILSSON, L.E. & HANBERGER, H. 2004. Genetic relatedness of *Enterococcus faecalis* isolates with high-level gentamicin resistance from patients with bacteraemia in the south east of Sweden 1994-20012. *Scand. J. Infect. Dis.* **36**: 405-409.

SAHM, D.F.; FREE, SMITH, C.; EVELAND, M. & MUNDY, L.M. 1997. Rapid characterization schemes for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2026-30.

SATAKE, S.; CLARK, N.; RIMLAND, D.; NOLTE, F.S. & TENOVER, F.C. 1997. Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2325-2230.

SCHABERG, D.R.; CULVER, D.H., & GAYNES, R.P. 1991. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infections. *Am. J. Med.* **91**: 79S-82S.

SCHEETZ, M.H.; QI, C.; NOSKIN, G.A.; WARREN, J.R.; POSTELNICK, M.J.; MALXZYNSKI, M. HUANG, J. & ZEMBOWER, T.R. 2006. The clinical impact of linezolid susceptibility reporting in patients with vancomycin-resistant enterococci. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **56**: 407-413.

SCHEETZ, M.H.; KNECHTEL, S.A., MALCZYNSKI, M. POSTELNICK, M.J. & QI, C. 2008. Increasing incidence of linezolid-intermediate or –resistant vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains parallels increasing linezolid consumption. *Antimicrobi. Agents Chemother.* **52**: 2256-2259.

SCHLEIFER, K.H. & KILPPER-BÄLZ, R. 1984. 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.* **34**: 31-34.

SCHOONMAKER, D.J.; BOPP, L.H.; BALTCH, A.; SMITH, R.P.; RAFFERTY, M.E. & GEORGE, M. 1998. Genetic analysis of multiple vancomycin-resistant *Enterococcus* isolates obtained serially from two long-term-care patients. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2105-2108.

SCHULTE, B.; HEININGER, A.; AUTENRIETH, I.B. & WOLZ, C. 2008. Emergence of increasing linezolid-resistance in enterococci in a post-outbreak situation with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Epidemiol. Infect.* **136**: 1131-1133.

SHANKAR, N., Lockett, C.V., Baghdayan, A.S., Drachenberg, C., Gilmore, M.S. & Johnson, D.E. 2001. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun.*, **69**: 4366-4372.

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

SINGH, K.V.; COQUE, T.M.; WEINSTOCK, G.M. & MURRAY, B.E. 1998. In vivo testing of an *Enterococcus faecalis* efaA mutant and use of efaA homologs for species identification. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **21**: 323-331.

SOLTANI, M.; BEIGHTON, D.; PHILPOTT-HOWARD, J. & WOODFORD, N. 2000. Mechanisms of resistance to quinupristin-dalfopristin among isolates of *Enterococcus faecium* from animals, raw meat, and hospital patients in Western Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 433-436.

SONG, J. KO, K.S.; SUH, Y.; OH, W.S. ; KANG, C. ; CHUNG, D.R.; PECK, K.R.; LEE, N.Y. & LEE, W.G. 2008. Clinical implications of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) with VanD phenotype and *vanA* genotype. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**: 838-844.

SUNG, K.; KHAN, S.A. & NAWAZ, M.S. 2008. Genetic diversity of Tn1546-like elements in clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Int. J. Antimicrob. Agents* **31**: 549-554.

STERN, C.S.; CARVALHO, M.G.S. & TEIXEIRA, L.M.1994. Characterization of enterococci isolated from human and nonhuman sources in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **20**: 61-67.

STRUELENS M. J. & the Members of the European Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM) of the European Society for Clinical Microbiology and Infection

Diseases (ESCMID). 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin. Microbiol. Infect.* **2**: 2-11.

SUSSMUTH, S.D.; MUSCHOLL-SILBERHORN, A.; WIRTH, R.; SUSA, M.; MARRE, R. & ROZDINSKI, E. 2000. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* with human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infect Immun.* **68**: 4900-4906.

SUKONTASING, S.; TANASUPAWAT, S.; MOONMANGMEE, S.; LEE, J. & SUZUKI, K. 2007. *Enterococcus caelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 2151-2154.

SUTCLIFFE, J.; TAIT-KAMRADT, A. & WONDRACK, L. 1996. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by efflux system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 1817-1824.

SVEC, P.; DEVRIESE, L.A.; SEDLACEK, I.; BAELE, M.; VANCANNEYT, M.; HAESBROUCK, F.; SWINGS, J. & DOSKAR, J. 2001. *Enterococcus haemoperoxidus* sp. Nov. And *Enterococcus moraviensis* sp. Nov., isolated from water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**: 1567-1574.

SVEC, J.M.; VANCANNEYT, M.; KOORT, J.; NASER, S.M.; HOSTE, B.; VIHAVAINEN, E.; VANDAMME, P.; SWING, J. & BJÖRKROTH, J. 2005. *Enterococcus devriesei* sp. nov., associated with animal sources. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **55**: 2479-2484.

SVEC, J.M.; VANCANNEYT, M.; SEDLÁČEK, I.; NASER, S.M.; SNAUWAERT, C.; LEFEBVRE, K.; HOSTE, B. & SWING, J. 2006. *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **56**: 577-581.

SWENSON, J.M.; FERRARO, M.J.; SHAM, D.F.; CLARCK, N.C.; CULVER, D.H.; TENOVER, F.C. & THE NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY

STANDARD WORKING GROUP ON ENTEROCOCCI. 1995. Multilaboratory evaluation of screening methods for detection of high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 3008-3018.

TAIT-KAMRADT, A.; CLANCY, J.; CRONAN, M.; DIB-HSJJ, F.; WONDRACK, L.; YUAN, W. & SUTCLIFFE, J. 1997. *mefE* is necessary for erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 2251-2255.

TANASUPAWAT, S.; SUKONTASING, S. & LEE, J.S. 2008. *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 1630-1634.

TANKOVIC, J.; MAHJOUBI, F.; COURVALIN, P.; DUVAL, J. & LECLERCQ, R. 1996. Development of fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis* and role of mutations in the DNA gyrase *gyrA* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2558-2561.

TEIXEIRA, L.M.; FACKLAM, R.R.; STEIGERWALT, A.G.; PIGOTT, N.E.; MERQUIOR, V.L.C. & BRENNER, D.J. 1995. Correlation between phenotypic characteristics and DNA relatedness within *Enterococcus faecium* strains. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 1520-1523.

TEIXEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G.S.; MERQUIOR, V.L.C.; STEIGERWALT, A.G.; BRENNER, D. J. & FACKLAM, R.R. 1997a. Phenotypic and genotypic characterization of *Vagococcus fluvialis*, including strains isolated from human sources. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2778-2781.

TEIXEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G.S.; MERQUIOR, V.L.C.; STEIGERWALT, A.G.; TEIXEIRA, M. G.M.; BRENNER, D.J. & FACKLAM, R.R. 1997b. Recent approaches on the taxonomy of the enterococci and some related microorganisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* **418**: 387-391.

TEIXEIRA, L.M.; PAULA, G.R.; MONDINO, S.S.B.; MENDONÇA, C.R.; CARVALHO, M.G.S.; D'AZEVEDO, P.A.; STERN, C.S.; STUCKERT, A.P., CASTRO, A.C. &

FACKLAM, R.R. 2000. Phenotypic and genotypic characterization of enterococci isolated from human clinical sources during, 1985 to 1998, in Brazil. Abstracts of the 1<sup>st</sup> International ASM Conference on Enterococci: pathogenesis, biology, and antibiotic resistance. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p.27.

TEIXEIRA, L. M.; D'AZEVEDO, P.; DIAS, C. G.; SUKIENNIK, T.; HENTGES, J. D.; GONÇALVES, A. L.; MERQUIOR, V. L. C. & CARVALHO, M. G. S. 2001. Genetic relationship of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strains carrying the *vanA* gene isolated in Porto Alegre City, Brazil. Apresentado no "Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy".

TEIXEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G.S.; ESPINOLA, M.M.B.; STEIGERWALT, A.G.; DOUGLAS, M. P.; BRENNER, D.J.& FACKLAM, R.R. 2001. *Enterococcus porcinus* sp. nov. and *Enterococcus ratti* sp. nov.: novel species associated with enteric disorders in animals. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**: 1737-1743

TEIXEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. & FACKLAM RR. 2007. *Enterococcus*. In: Murray P, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*, 9<sup>th</sup> ed., American Society for Microbiology, Washington, DC. p 430-442

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GEORING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H. & SWAMINATHAN, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. **33**: 2233-2239.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. AND MOLECULAR TYPING WORKING GROUP OF THE SOCIETY FOR HEALTHCARE EPIDEMIOLOGY OF AMERICA. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. **18**: 426-439.

TITZE-DE-ALMEIDA, R.; ROLLO FILHO, M.; SILVEIRA, C.A.N.; RODRIGUES, I.P.; EUDES FILHO, J.; NASCIMENTO, R.S.; FERREIRA II, R.F.; MORAES, L.M.P.;

BOELENS, H.; VAN BELKUM, A. & FELIPE, M.S.S. 2004. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of enterococci recovered from Brazilian intensive care units. *Braz. J. Infect. Dis.* **8**: 197-205.

TITZE-DE-ALMEIDA, R.; VAN BELKUM, A.; FELIPE, M.S.S.; ZANELLA, R.C. TOP, J. & WILLEMS, R.J. 2006. Multilocus sequence typing of hospital-associated *Enterococcus faecium* from Brazil reveals their unique evolutionary history. *Microb. Drug Resist.* **12**: 121.

TOMAYKO, J.F. & MURRAY, B.E. 1995. Analysis of *Enterococcus faecalis* isolates from intercontinental sources by multilocus enzyme electrophoresis and pulsed-field gel electrophoresis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:2903-2907.

TOMITA, H.; PIERSON, C.; LIM, S.K.; CLEWELL, D.B. & IKE, Y. 2002. Possible connection between a widely disseminated conjugative gentamicin resistance (pMG1-like) plasmid and the emergence of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 3326:3333.

TOP, J.; SCHOULS, L.M.; BONTEN, M.J. & WILLEMS RJ. 2004. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4503-4511.

TOP, J.; BANGA, N.M.; WILLEMS, R.J.; BONTEN, M.J. & HAYDEN, M.K. 2008. Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis and pulsed-field gel electrophoresis in a setting of polyclonal endemicity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**: 363-369.

TOP, J.; WILLEMS, R.; van der VELDEN, S.; ASBROEK, M. & BONTEN, M. 2008. Emergence of Clonal Complex 17 *Enterococcus faecium* in The Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 214-219.



TRALLERO, E.P.; URBIETA, M.; MONTES, M.; AYESTARAN, I. & MARINOM JM. 1998. Emergence of *Streptococcus pyogenes* strains resistant to erythromycin in Gipuzkoa, Spain. Eur J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **17**: 25-31.

TRESSOLDI, A.T.; CARDOSO, L.G.; CASTILHO, G.V.; DANTAS, S.R.; vonNOWAKONSKI, A.; PEREIRA, R.M. & TRABASSO, P. 2006. Low prevalence of vancomycin resistant enterococci colonization in intensive care patients in a Brazilian teaching hospital. Braz. J. Infect. Dis. **10**: 239-241.

TRZCINSKI, K.; COOPER, B.S.; HRYNIEWICZ, W. & DOWSON, C.G. 2000. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother.; **45**: 763-770.

TYRRELL, G.J.; TURNBULL, L.; TEIXEIRA L,M.; LEFEBVRE J., CARVALHO, M.G. & FACKLAM RR, LOVGREN M. 2002. *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *Enterococcus pallens* sp. nov. isolated from human clinical specimens. J. Clin. Microbiol. **4**: 1140-1145

UMGELTER, A.; PRINZ, C.; GAA, J. & HUBER, W. 2007. Ascending pneumonia complicating endoscopic therapy of a pancreatic abscess. Endoscopy **39**: 267.

VAKULENKO, S.B.; DONABEDIAN, S.M.; VOSKRESENSKY, A.M.; ZERVOS, M.J.; LERNER, S.A. & CHOW, J. W. 2003. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. Antimicrob. Agents Chemother. **47**: 1423-26.

VAN BELKUM, A.; VAN LEEUWEN, W.; KLUYTMANS, J. & VERBRUGH, H. 1995. Molecular nosocomial epidemiology: high speed typing of microbial pathogens by arbitrary primed polymerase chain reaction assays. Infect. Control Hosp. Epidemiol. **16**: 658-666.

VANCANNEYT, M.; VALDERATO, F.; LOYGREN, M.; TYRRELL, G.J.; BOKERMANN, S.; ALMEIDA, S.C.G.; DESCHEEMAER, P.; GOOSSENS, H.; POT, B.; VANDAMME A.; SWINGS, J.; HAESBROUCK, F. & DEVRIESE, L.A. 2001. *Enterococcus villorum* sp.

nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhea in piglets. *Int. J. Systematic Evol. Microbiol.* **51**: 393-400.

VILELA, M.A.; SOUZA, S.L.; PALAZZO, I.C.; FERREIRA, J.C.; MORAIS, M.A.; DARINI, A.L. & MORAIS, M.M. 2006. Identification and molecular characterization of *vanA*-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Northeast of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **101**: 715-719.

WADE, J.J. 1997. *Enterococcus faecium* in hospitals. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**: 113-119.

WEAVER, K.E.; RICE, L.B. & CHURCHWARD, G. 2002. Plasmid and transposons. *In*: Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Courvalin, P., Dunny, G.M., Murray, B.E. & Rice, L.B. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. ASM Press, Washington DC. p 219-263

WEISBLUM, B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 577-585.

WERNER, G.; KLARE, I.; HEIER, H.; HINZ, K.H.; BOHME, G.; WENDT, M. & WITTE, W. 2000. Quinupristin/dalfopristin-resistant enterococci of the *satA* (*vatD*) and *satG* (*vatE*) genotypes from different ecological origins in Germany. *Microb. Drug Res.* **6**: 37-47.

WERNER, G.; GFÖRER, S.; FLEIGE, C.; WITTE, W & KLARE, I. 2008. Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from a German intensive care unit patient. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**: 1182-1183.

WILLEY, B.M.; MCGEER, A.J.; OSTROWSKI, M.A.; KREISWIRTH, B.N. & LOW, D.E. 1994. The use of molecular typing techniques in the epidemiologic investigation of resistant enterococci. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **15**: 548-556.

WILLEMS, R.J.; TOP, J.; van SANTEN, M.; ROBINSON, D.A.; COQUE, T.M.; BAQUERO, F.; GRUNDMANN, H. & BONTEN, M.J. 2005. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg. Infect. Dis* **11**: 821-828.

WICKMAN, P.A.; BLACK, J.A.; MOLAND, S.; THOMSON, K.S. & HANSON, N.D. 2006. *In vitro* development of resistance to DX-619 and other quinolones in enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**: 1268-1273.

YAZGI, H.; ERTEK, M.; EROL, S. & AYYILDIZ, A. 2002. A comparison of high-level amonoglycoside resistance in vancomycin-sensitive and vancomycin-resistant *Enterococcus* species. *J. Int. Medical Research* **30**: 529-534.

ZANELLA, R.C.; VALDETARO, F.; LOVGREN, M.; TYRREL, G.J.; BOKERMANN, S.; ALMEIDA, S.C.G.; VIEIRA, V.S.D. & BRANDILEONE, M.C.C. 1999. First confirmed case of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with *vanA* phenotype from Brazil: isolation from a meningitis case in São Paulo. *Microb. Drug Res.* **2**: 159-162.

ZANELLA, R.C.; BRANDILEONE, M.C.; BOKERMANN, S.; ALMEIDA, S.C.; VALDETARO, F.; VITÓRIO, F.; MOREIRA MDE, F.; VILLINS, M.; SALOMÃO, R. & PIGNATARI, A.C. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of VanA *Enterococcus* isolated during the first nosocomial outbreak in Brazil. *Microb. Drug Resist.* **9**: 283-291.

ZARRILLI, R.; TRIPOLDI, M.F.; DI POPOLO, A.; FORTUNATO, R.; BAGATTINI, M.; FLORIO, A. TRIASSI, M.; UTILI, R. 2005. Molecular epidemiology of high-level amonoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**: 827-835.

ZERVOS, M.J., KAUFFMAN, C.A., THERASSE, P.M., BERGMAN, A.G.T., MIKESSELL, SCHABERG, D.R. 1987. Nosocomial infection by gentamicin-resistant *Streptococcus faecalis* : an epidemiologic study. *Ann. Intern. Med.* **106**: 687-69.

ZHANEL, G.G.; DeCORBY, M.; LAING, N.; WESHNOWESKI, B.; VASHIHT, R.; TAILOR, F.; NOCHOL, K.A.; WIERZBOWSKI, A.; BAUDRY, P.J.; KARLOWSKY, J.A.; LAGACÉ-WIENS, P.; WALKTY, A.; McCracken, M.; MULVEY, M.R.; JOHNSON, J.; CANADIAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE ALLIANCE (CARA) & HOBAN, D.J. 2008. Antimicrobial-resistant pathogens in intensive care units in Canada: results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) study, 2005-2006. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 1430-1437.

ZHENG, B.; TOMITA, H.; XIAO, Y.H.; WANG, S.; LI, Y. & IKE, Y. 2007. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Mainland China. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 2813-2818.

ZIRAKZADEH, A. & PATEL, R. 2006. Vancomycin-resistant enterococci: colonization, infection, detection, and treatment. *Mayo Clin. Proc.* **81**: 529-536.

ZSCHECK, K.K., & MURRAY, B.E. 1993. Genes involved in the regulation of  $\beta$ -lactamase production in enterococci and staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**: 1966-1970.





# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)