

**ANDREY GUIMARÃES SACRAMENTO**

**Tipagem molecular de cepas de *Enterococcus* spp  
resistentes à vancomicina, isoladas em hospitais da  
cidade de São Paulo, no período de 1999 a 2008**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração:** Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosemeire Cobo Zanella

**SÃO PAULO**

**2010**

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Sacramento, Andrey Guimarães

Tipagem molecular de cepas de *Enterococcus* spp resistentes à vancomicina, isoladas em hospitais da cidade de São Paulo, no período de 1999 a 2008 / Andrey Guimarães Sacramento -- São Paulo, 2010.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Rosemeire Cobo Zanella

1. Técnica de tipagem bacteriana 2. Enterococos 3. Resistentes à vancomicina 4. Eletroforese em gel de campo pulsado 5. Infecção hospitalar

SES/CCD/CD-239/10

***Trabalho realizado no Núcleo de Meningites, Pneumonias e Infecções Pneumocócicas no Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo/SP da Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo.***

***Apoio Financeiro:  
Instituto Adolfo Lutz, Projeto CCD-BM10/96  
Bolsa Mestrado CAPES***

## **AGRADECIMENTOS**

### ***Em especial, à Emanuela Avelar Silva Costa***

Mulher... Companheira... Amiga... Namorada... Esposa... Extraordinária. Queria te dizer que grande parte do Homem que sou, devo a você. Que bom que nos encontramos, nos descobrimos e nos fazemos tão felizes! Você é um anjo que apareceu em minha vida. *Me* fez confiar em mim mesmo, *me* incentivou e *me* fez acreditar que tenho potencial. Manu, te adoro muito!

### ***À minha família***

Ao meu pai Raul e minha mãe Iraci por me darem o dom da vida e saberem que apesar da distância, eu sei que posso contar com vocês para quaisquer adversidades. Ao meu irmão Igor, que também apesar da distância, sei que está sempre ao meu lado e que no futuro poderemos estar ainda mais unidos. Obrigado por tudo! Sei que são as únicas pessoas que me amam de verdade, e este sentimento é fundamental para que eu continue seguindo nesta vida competitiva e cheia de obstáculos.

### ***À orientadora***

Rose, agradeço por ter confiado em mim e me dado a oportunidade de fazer este ótimo trabalho que será fundamental para a minha carreira profissional. Posso te afirmar com toda certeza que, nestes últimos dois anos e meio de estudos, a cumplicidade e o respeito se fizeram presentes constantemente. Dignamente, você soube conduzir este brilhante trabalho, me dando segurança para que eu pudesse concluí-lo com êxito. Muito obrigado!

## ***Ao meu amigo***

*Doctor* Artemir! Obrigado pelos conselhos científicos! Você foi uma das pessoas que me incentivaram a fazer Mestrado e que me incentiva a continuar trilhando na busca de uma *meteórica* carreira científica! Rs rs... Foi muito bom te conhecer e saber que o tenho como amigo.

Agradeço a todos os profissionais do Centro de Bacteriologia, principalmente ao grupo do Núcleo de Meningites, Pneumonias e Infecções Pneumocócicas do Instituto Adolfo Lutz que foi muito importante na minha formação profissional. Em especial, à Maria Cristina Brandileone que soube de forma justa e coerente solucionar um incidente ocorrido em meio ao meu trabalho. Obrigado pela confiança em mim depositada.

Às professoras Dr<sup>a</sup> Elsa Mamizuka, Dr<sup>a</sup> Anna Sara Levin, Dr<sup>a</sup> Doroti Garcia e Dr<sup>a</sup> Marinês Martino pelas excelentes sugestões dadas a este trabalho.

À equipe do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa concedida.

***Deste trabalho fica a certeza de que dei apenas um passo na longa caminhada que ainda tenho a percorrer...***

**Sacramento, A G - Tipagem molecular de cepas de *Enterococcus* spp resistentes à vancomicina, isoladas em hospitais da cidade de São Paulo, no período de 1999 a 2008**

**RESUMO**

Em São Paulo, o primeiro relato de isolamento de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) foi em 1997, e desde então, esta bactéria tem sido reportada em todo o Brasil como responsável por surto de infecção hospitalar. O presente estudo propôs investigar a similaridade genética de amostras de VRE com o intuito de analisar a disseminação dos tipos e subtipos genéticos circulantes em 26 hospitais da cidade de São Paulo e região ao longo de 10 anos. Foram analisadas 239 cepas de VRE isoladas de materiais clínicos como: urina (n=107), sangue (n=81) e líquidos cavitários (n=51). A tipagem molecular das cepas de VRE foi realizada pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Os perfis eletroforéticos foram analisados segundo os critérios de Tenover e pelo percentual de similaridade genética obtido através do programa Bionumerics. Os resultados da análise molecular das cepas de *E. faecium* resistente à vancomicina (VRE-EFM) mostraram maior diversidade genética com nove tipos, enquanto os *E. faecalis* resistente à vancomicina (VRE-EF) apresentaram três tipos. A análise do dendrograma mostrou que os subtipos mais frequentes dos VRE-EF (A1 e A8) e dos VRE-EFM (P1 e P6) apresentaram uma similaridade genética de 83% e 96%, respectivamente. Entre os hospitais avaliados foi observada uma maior disseminação de VRE-EF (85%), embora a presença das duas espécies simultaneamente tenha ocorrido em 50% dos hospitais. Este estudo representou um importante monitoramento de cepas de VRE na cidade de São Paulo, no qual se teve a oportunidade de caracterizar cepas oriundas de vários hospitais, tanto da rede pública como privada e com isso observar a disseminação intra e inter-hospitalar.

**Palavras-Chave:** Tipagem molecular; *Enterococcus* spp resistentes à vancomicina; eletroforese em gel de campo pulsado; infecção hospitalar.

**Sacramento, A G - Molecular typing of strains of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp isolated in hospitals in the São Paulo city during the years 1999 to 2008**

**ABSTRACT**

In Sao Paulo, the first report of isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) was in 1997 and since then, this bacteria has been reported in Brazil as responsible for an outbreak of hospital infection. The present study was to investigate the genetic similarity of VRE in order to analyze the spread of genetic types and subtypes circulating in 26 hospitals in the São Paulo city and region during 10 years. We analyzed 239 strains of VRE isolated from clinical specimens such as urine (n=107), blood (n=81) and liquid cavity (n=51). Molecular typing of strains of VRE was performed by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Electrophoretic patterns were analyzed according to Tenover criteria and the percentage of genetic similarity obtained through the program Bionumerics. The results of molecular analysis of strains of vancomycin-resistant *E. faecium* (VRE-EFM) showed greater genetic diversity with nine types, whereas vancomycin-resistant *E. faecalis* (VRE-EF) showed three types. The dendrogram analysis showed that the most common subtypes of VRE-EF (A1 and A8) and VRE-EFM (P1 and P6) showed a genetic similarity of 83% and 96% respectively. Among the hospitals evaluated showed the greatest spread of VRE-EF (85%), although the presence of both species occurred in 50% of hospitals. This study represents an important tracking of strains of VRE in Sao Paulo, where it has had an opportunity to characterize strains from different hospitals, both public and private and thus observe the spread intra and inter-hospital.

**Keywords:** molecular typing, vancomycin-resistant *Enterococcus*; electrophoresis pulsed field gel electrophoresis, hospital infection.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<b>CCD</b>	Coordenadoria de Controle de Doenças
<b>CCIH</b>	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> - Centro de Controle e Prevenção de Doenças
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>D-ala-D-ala</b>	D-alanina-D-alanina
<b>D-ala-D-lac</b>	D-alanina-D-lactato
<b>D-ala-D-ser</b>	D-alanina-D-serina
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i> - Centro de Administração de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos
<b>HLAR</b>	<i>High-Level Aminoglycoside Resistance</i> - Alto Nível de Resistência aos Aminoglicosídeos
<b>HLGR</b>	<i>High-Level Gentamicin-Resistant</i> - Alto Nível de Resistência à Gentamicina
<b>HLSR</b>	<i>High-Level Streptomycin-Resistant</i> - Alto Nível de Resistência à Estreptomicina
<b>IAL</b>	Instituto Adolfo Lutz
<b>MLST</b>	<i>Multi Locus Sequence Typing</i> - Tipagem por Sequenciamento de Multilocus
<b>MRSA</b>	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i> – <i>S. aureus</i> Resistentes à Meticilina
<b>NAG</b>	N-acetilglicosamina

<b>NAM</b>	Ácido N-acetilmurâmico
<b>NNISS</b>	<i>National Nosocomial Infection Surveillance System</i>
<b>ORF</b>	<i>Open Read Frame</i>
<b>PBPs</b>	<i>Penicillin-Binding Proteins</i> - Proteínas ligadoras de Penicilinas
<b>PCIH</b>	Programa de Controle de Infecção Hospitalar
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da polimerase
<b>PFGE</b>	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> - Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
<b>PYR</b>	Pirrolidonil Arilamidase
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônias
<b>UPGMA</b>	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
<b>UTI</b>	Unidade de Terapia Intensiva
<b>VRE</b>	<i>Vancomycin-Resistant Enterococcus</i> - Enterococos Resistentes à Vancomicina
<b>VRE-EF</b>	<i>Vancomycin-Resistant E. faecalis</i> - <i>E. faecalis</i> Resistente à Vancomicina
<b>VRE-EFM</b>	<i>Vancomycin-Resistant E. faecium</i> - <i>E. faecium</i> Resistente à Vancomicina
<b>VRSA</b>	<i>Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus</i> - <i>S. aureus</i> Resistentes à Vancomicina
<b>VSE</b>	<i>Vancomycin-Susceptible Enterococcus</i> - Enterococos Sensíveis à Vancomicina

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Níveis e fenótipos de resistência aos glicopeptídeos em enterococos .....	24
<b>Tabela 2:</b> Número de cepas de VRE recebidas por hospital e por ano pelo IAL segundo os critérios de seleção e número de cepas selecionadas para a tipagem molecular por PFGE .....	39
<b>Tabela 3:</b> Percentual de resistência das 239 cepas de VRE selecionadas para tipagem molecular por PFGE, isoladas no período de 1999 a 2008 .....	53
<b>Tabela 4:</b> Distribuição anual dos tipos e subtipos de <i>E. faecalis</i> caracterizados por PFGE, no período de 1999-2008 .....	57
<b>Tabela 5:</b> Distribuição anual dos tipos e subtipos de <i>E. faecium</i> caracterizados por PFGE, no período de 1999-2008 .....	62
<b>Tabela 6:</b> Distribuição dos subtipos das 143 cepas de <i>E. faecalis</i> entre os 26 hospitais que enviaram cepas de VRE para o IAL no período de 1999-2008 .....	66
<b>Tabela 7:</b> Distribuição dos tipos e subtipos das 96 cepas de <i>E. faecium</i> entre os 26 hospitais que enviaram cepas de VRE para o IAL no período de 1999 a 2008 .....	67

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> <i>Enterococcus</i> spp em tecido pulmonar .....	17
<b>Figura 2:</b> NAG e NAM unidos como no peptideoglicano .....	20
<b>Figura 3:</b> Síntese do peptideoglicano e mecanismo de ação do glicopeptídeo. Ligação do antibiótico ao C-terminal D-ala-D-ala do precursor do peptideoglicano que impede as reações de transglicosilação e transpeptidação .....	21
<b>Figura 4:</b> Mecanismo de ação e resistência à vancomicina .....	25
<b>Figura 5:</b> Mapa de Tn 1546 .....	26
<b>Figura 6:</b> Distribuição anual do número de cepas das espécies de <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> encaminhadas à rotina diagnóstica do IAL no período de 1999 a 2008 .....	49
<b>Figura 7:</b> Distribuição das 239 cepas de VRE selecionadas para o estudo por ano e por espécie, <i>E. faecalis</i> (n=143) e <i>E. faecium</i> (n=96) .....	50
<b>Figura 8:</b> Distribuição das 239 cepas de VRE selecionadas para a tipagem por PFGE de acordo com o espécime clínico .....	51
<b>Figura 9:</b> Distribuição geográfica dos 26 hospitais que encaminharam as 239 cepas de VRE ao IAL, selecionadas para a caracterização por PFGE, de 1999-2008 .....	52
<b>Figura 10:</b> Perfis eletroforéticos de amostras de <i>E. faecalis</i> digeridas com a enzima de restrição SmaI obtidos por PFGE .....	55

<b>Figura 11:</b> Distribuição das 143 cepas de <i>E. faecalis</i> segundo os tipos e subtipos genéticos caracterizados pelo PFGE .....	56
<b>Figura 12:</b> Dendrograma com o resultado da análise de similaridade de bandas dos tipos e subtipos genéticos caracterizados entre cepas de <i>E. faecalis</i> resistentes à vancomicina .....	59
<b>Figura 13:</b> Perfis eletroforéticos de amostras de <i>E. faecium</i> digeridas com a enzima de restrição <i>Sma</i> I obtidos por PFGE .....	60
<b>Figura 14:</b> Distribuição das 96 cepas de <i>E. faecium</i> segundo os tipos e subtipos genéticos caracterizados pelo PFGE .....	61
<b>Figura 15:</b> Dendrograma com o resultado da análise de similaridade de bandas dos tipos e subtipos genéticos caracterizados entre cepas de <i>E. faecium</i> resistentes à vancomicina .....	64
<b>Figura 16:</b> Distribuição geográfica dos subtipos de maior frequência, A8 para cepas de <i>E. faecalis</i> e P1 para <i>E. faecium</i> , entre os hospitais que encaminharam cepas de VRE para o IAL no período de 1999-2008 .....	69

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1. Gênero <i>Enterococcus</i> .....	16
1.2. Resistência microbiana .....	18
1.3. Resistência aos Glicopeptídeos .....	19
1.4. Aquisição de VRE em hospitais .....	28
1.5. Transmissão de VRE e controle de infecção hospitalar .....	29
1.6. Tratamento das infecções por VRE .....	29
1.7. Enterococos resistentes à vancomicina (VRE) no mundo .....	33
1.8. Enterococos resistentes à vancomicina no Brasil .....	34
1.9. Vigilância laboratorial do VRE .....	35
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	37
2.1. Objetivo geral .....	37
2.2. Objetivos específicos .....	37
<b>3. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	38
3.1. Casuística .....	38
3.2. Aspectos éticos .....	39
3.3. Métodos .....	40

3.3.1. Identificação bioquímica .....	40
3.3.2. Identificação genética das espécies <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> .....	41
3.3.3. Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos .....	42
3.3.3.1. Teste presuntivo para resistência à vancomicina .....	42
3.3.3.2. Teste para determinação do alto nível de resistência (HLR) aos aminoglicosídeos .....	43
3.3.3.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	43
3.3.4. Detecção dos genes de resistência à vancomicina (vanA, vanB, vanC-1 e vanC-2/3) .....	44
3.3.5. Tipagem molecular por PFGE .....	45
3.3.5.1. Condições de crescimento bacteriano e lise celular ..	45
3.3.5.2. Digestão do DNA bacteriano .....	46
3.3.5.3. Preparo do gel de eletroforese .....	47
3.3.6. Análise do perfil genético .....	47
3.3.6.1. Critério de Tenover .....	47
3.3.6.2. Porcentagem de similaridade genética .....	48
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
4.1. Amostras de VRE .....	49

4.2. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos .....	52
4.3. Tipagem molecular por PFGE das cepas de VRE .....	54
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>84</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>106</b>

## 1. INTRODUÇÃO

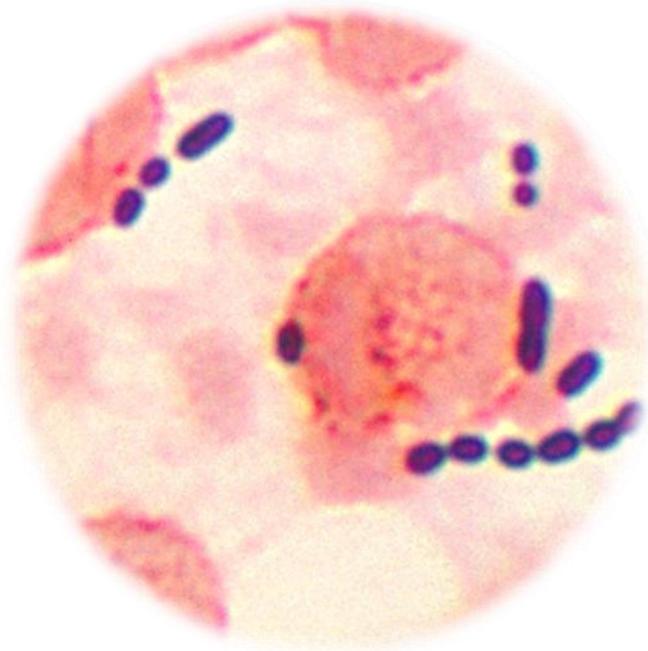
### 1.1. Gênero *Enterococcus*

A nomenclatura “enterococos” é derivada da palavra francesa “entérocoque”, proposta para designar a origem intestinal destas bactérias. No início da década de 1930, os enterococos eram classificados como *Streptococcus* do grupo D através do esquema sorológico criado por Lancefield. As espécies mais comuns eram *Streptococcus faecalis* seguida por *Streptococcus faecium* (Murray, 1990; Murray, 2000). Em 1980, estudos de hibridização DNA-DNA e DNA-rRNA, mostraram diferenças entre as cepas de enterococos e estreptococos. Então, em 1984, os enterococos deixaram de pertencer ao gênero *Streptococcus* e foram designados como *Enterococcus* (Schleifer e Kilpper-Balz, 1984).

Enterococos são bactérias que fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal e genitourinário de humanos e de outros animais. Estão amplamente distribuídos na natureza podendo ser encontrados no solo, nos alimentos e na água. Embora esta bactéria tenha sido considerada inócua por muitos anos, recentemente, tem apresentado um aumento da resistência a vários antibióticos e vem sendo associada com uma série de doenças como endocardites, bacteremia, infecções de feridas, osteomielite, infecção dentária e infecção urinária. A infecção urinária é a mais comum das infecções enterocócicas humana, ocorrendo principalmente em pacientes hospitalizados, seguida pela infecção intra-abdominal, pélvica, bacteremia, endocardite e infecção neonatal (Moellering Jr et al., 1970; Murray, 1990; Moellering Jr, 1992; Merquior et al., 1997; Murray, 2000).

Enterococos são cocos Gram-positivos ovalados, que podem se apresentar em dupla ou em cadeias curtas (**Figura 1**). São catalase negativa podendo apresentar uma pseudocatalase (Moellering Jr et al.,1970; Murray,

1990). São bactérias resistentes, capazes de crescer em 6,5% de NaCl, e em temperaturas entre 10°C e 45°C e pH 9,6. São capazes de hidrolizar esculina em presença de 40% de sais biliares e produzir pirrolidonil arilamidase (PYR) (Huycke et al., 1998). Esta bactéria pode sobreviver em superfícies inanimadas por semanas, o que permite a sua adaptação em diversos ambientes, contribuindo para a sua transmissão nosocomial (Bonten et al., 1996; Neely e Maley, 2000).



**Figura 1:** *Enterococcus* spp em tecido pulmonar.

**Fonte:** Adaptado de Academic dictionaries and encyclopedias (1984).

Estão descritas no gênero *Enterococcus* cerca de 30 espécies, entretanto, as espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* são as mais frequentemente isoladas dos casos de infecção humana, sendo o *E. faecalis* em 80% a 90% e o *E. faecium* em 5 a 10% das infecções (Murray et al., 2007). No mundo, estas duas espécies representam um dos principais patógenos associados com infecção nosocomial e nos Estados Unidos é a

terceira principal causa de bacteremia (Thouverez e Talon, 2004; Chou et al., 2008; Werner et al., 2008). Existem outras espécies de menor importância clínica que são *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus*, *E. malodoratus* e *E. mundtii*, as outras espécies são raramente isoladas de amostras biológicas de seres humanos.

## **1.2. Resistência microbiana**

Enterococos possuem poucos fatores de virulência, porém é importante ressaltar que esta bactéria está sendo a causa de sérios problemas de pacientes hospitalizados, devido à capacidade de resistir à ação de muitos antimicrobianos. Esta bactéria tende a ser mais resistente à terapia antimicrobiana que outros microrganismos e, além disso, apresenta uma habilidade de adquirir e transferir novos determinantes de resistência (Murray, 1990; Moellering Jr, 1992).

Para os enterococos a resistência pode ser intrínseca e adquirida. O termo resistência intrínseca é usado para indicar a resistência que é usual à espécie, presente em quase todas as amostras de determinado organismo. Os genes responsáveis por esta resistência estão presentes normalmente no cromossomo e tipicamente não são transferíveis. Dentre as várias resistências intrínsecas encontradas nos enterococos, incluem-se a resistência às cefalosporinas, aztreonam, clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol e às penicilinas semi-sintéticas (oxacilina, carbenicilina, nafcilina e ticarcilina), portanto, essas drogas não são utilizadas no tratamento das infecções enterocócicas (Pallares et al., 1993; Rice, 2001).

Excepcionalmente, a resistência intrínseca aos aminoglicosídeos que é detectada para baixas concentrações, permite a sua utilização quando associados aos  $\beta$ -lactâmicos (penicilina G, ampicilina, ureidopenicilinas) ou à vancomicina como opção terapêutica das infecções enterocócicas mais graves (Tavares, 2000; Rice, 2001).

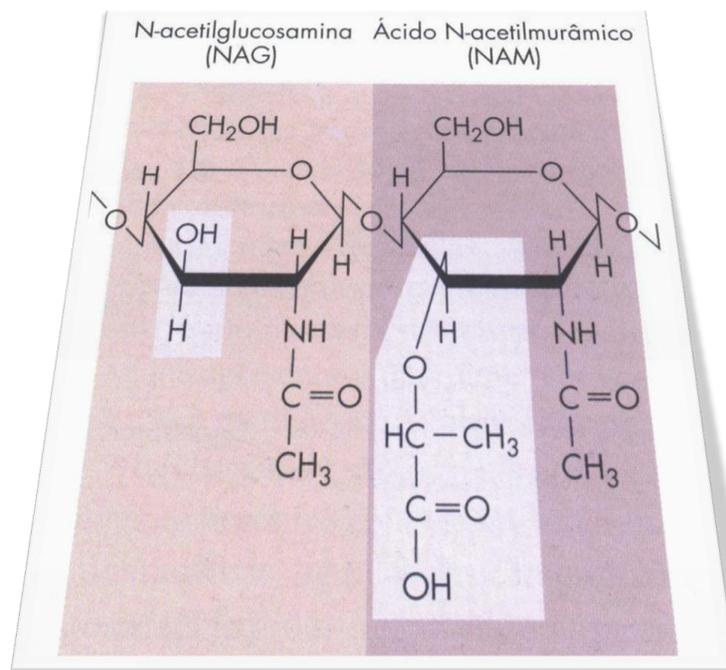
A resistência adquirida pode ocorrer por mutação cromossômica alterando o alvo da ação de alguns antimicrobianos ou pela aquisição de uma nova sequência de DNA por transformação, transdução ou conjugação. Nos enterococos essa transferência genética geralmente ocorre por meio dos plasmídeos e transposons contendo genes de resistência (Rice, 2001). Plasmídeos são fragmentos de DNA auto-replicantes, circulares, extracromossômicos e podem transportar genes para atividades como resistência aos antimicrobianos. Transposons são pequenos segmentos de DNA que podem se mover de uma região de uma molécula de DNA cromossômica para outra. Transposons com genes de resistência aos antimicrobianos são de interesse médico, porque podem se disseminar para microrganismos de espécie ou gênero diferente, sendo considerados poderosos mediadores da evolução nos microrganismos (Tortora et al., 2005).

Em geral, são exemplos de resistência adquirida, a resistência ao cloranfenicol, eritromicina, às altas concentrações de clindamicina e aminoglicosídeos, tetraciclina, fluorquinolonas, penicilinas e aos glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) (Rice, 2001). Os fenótipos considerados clinicamente mais significativos entre os enterococos são aqueles associados à resistência às altas concentrações de aminoglicosídeos, glicopeptídeos e penicilinas (ampicilina, penicilina G e ureidopenicilinas).

### **1.3. Resistência aos glicopeptídeos**

O mecanismo de ação dos antibióticos da classe dos glicopeptídeos resulta na inibição da parede celular bacteriana que é composta de uma rede macromolecular denominada peptidoglicano, que se apresenta isolada ou em combinação com outras substâncias. O peptidoglicano consiste em um dissacarídeo repetitivo unido por polipeptídeos para formar uma rede que circunda e protege toda a célula. A porção dissacarídica é composta de monossarídeos denominados N-acetilglicosamina (NAG) e ácido N-

acetilmurâmico (NAM), que estão relacionados à glicose (Tortora et al., 2005) (Figura 2).

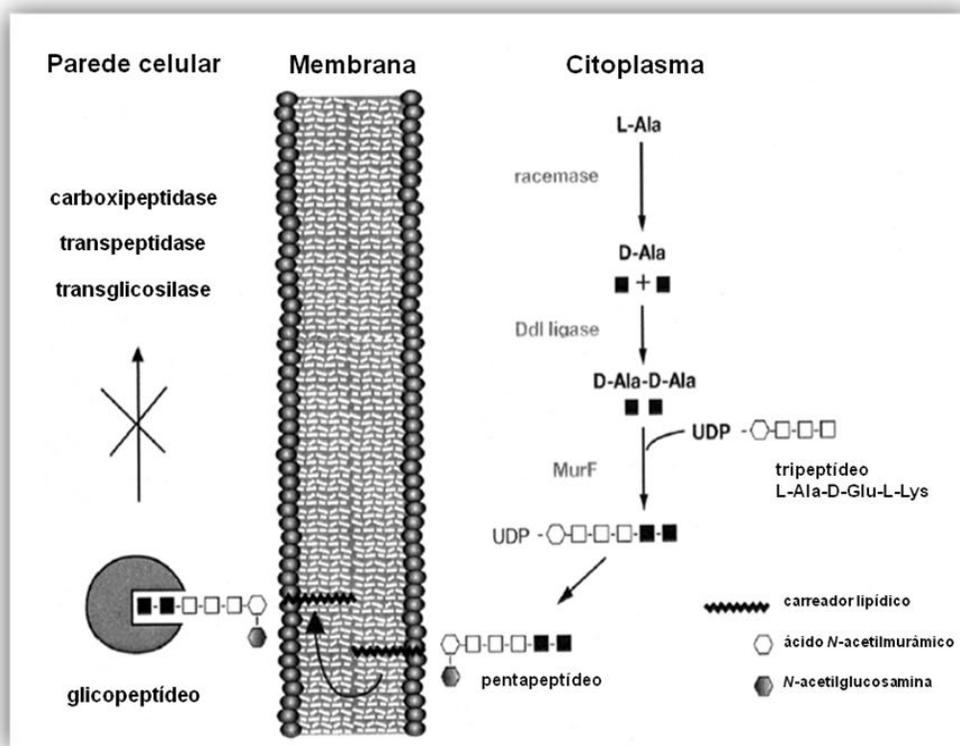


**Figura 2:** NAG e NAM unidos como no peptídeoglicano.

**Legenda:** As áreas em púrpura clara mostram as diferenças entre as duas moléculas. A ligação entre elas é denominada uma ligação β-1, 4.

**Fonte:** Adaptado de Tortora et al. (2005)

Os glicopeptídeos interferem na síntese da parede celular das bactérias Gram-positivas pela interação com o grupamento terminal D-alanina-D-alanina (D-ala-D-ala), das cadeias laterais do pentapeptídeos precursores do peptídeoglicano. A formação de um complexo entre o antibiótico e o precursor da cadeia de peptídeoglicano bloqueia a ação das enzimas envolvidas nas reações de transglicosilação e transpeptidação na síntese da parede celular da bactéria (Reynolds, 1989; Courvalin, 2006) (Figura 3).



**Figura 3:** Síntese do peptidoglicano e mecanismo de ação do glicopeptídeo. Ligação do antibiótico ao C-terminal D-ala-D-ala do precursor do peptidoglicano que impede as reações de transglicosilação e transpeptidação.  
**Fonte:** Adaptado de Courvalin (2006).

A vancomicina assim denominada a partir da palavra em inglês *vanquish*, que significa destruir, faz parte de um pequeno grupo de antibióticos glicopeptídicos. É um antimicrobiano bactericida que foi isolado pelo grupo de Eli Lilly em 1956, a partir da fermentação do fungo *Amycolatopsis orientalis* encontrado em amostras de solo coletado no interior das selvas de Bornéu (Levine, 2006). Foi primeiramente produzida no final de 1950 para o tratamento de infecções estafilocócicas, porém o seu uso foi moderado no final da década de 1970 quando os *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) tornaram-se prevalentes e também no final da década de 80, quando começou a surgir o VRE. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) publicou

orientações para o uso apropriado de vancomicina em hospitais com uma resposta direta à preocupação com o desenvolvimento de resistência do enterococo à vancomicina, e de outros microrganismos, incluindo estafilococos. A vancomicina é um antimicrobiano de escolha para o tratamento de infecções graves por *Enterococcus* spp, MRSA, *Staphylococcus* spp coagulase-negativa, meningites causadas por *Streptococcus pneumoniae* com suscetibilidade reduzida aos  $\beta$ -lactâmicos ou suspeita de infecções por bactérias Gram-positivas em pacientes que são alérgicos aos  $\beta$ -lactâmicos (Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, 1995; Chavers et al., 2003).

O aumento do uso de vancomicina empírica para o tratamento de infecções por MRSA tem paralelamente ocasionado o aparecimento de VRE, já que a resistência à vancomicina é uma consequência inevitável da pressão seletiva devido à exposição ao antibiótico, processo resultante de uma resistência induzida. Por outro lado, o aumento da disseminação de VRE é responsável pelo surgimento de casos de *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus* (VRSA), que estar relacionado com a transmissão plasmidial do gene *vanA* de cepas de VRE para estas bactérias (Noble et al., 1992; Weigel et al., 2003; Chavers et al., 2003; Silva Filho et al., 2008).

Atualmente foram descritos seis fenótipos envolvidos na geração da resistência aos glicopeptídeos (Van A, B, C, D, E e G) (Courvalin, 2006). Porém, os fenótipos VanA e VanB são os mais importantes devido a possibilidade de transferência genética por conjugação que pode ocorrer via plasmídeo e transposons (Woodford, 1998).

A detecção fenotípica da resistência dos enterococos aos glicopeptídeos é realizada, rotineiramente, através do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, o qual permite detectar amostras com níveis variados de resistência.

Enterococos com fenótipo VanA apresentam resistência adquirida para alta concentração de vancomicina e de teicoplanina, apresentando valores de concentração inibitória mínima (CIM)  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$  e 16 a 512  $\mu\text{g/mL}$ ,

respectivamente. Enterococos com fenótipo VanB apresentam resistência adquirida para concentração variável de resistência à vancomicina (CIM 4 a 1000 µg/mL) e suscetibilidade à teicoplanina. Cepas com o fenótipo VanC apresentam resistência a baixa concentração de vancomicina (CIM 2 a 32 µg/mL) e suscetibilidade à teicoplanina, esta propriedade é intrínseca e intransferível para duas espécies: *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*, representados por dois genes *vanC-1* e *vanC-2/3*, respectivamente. Bactérias com o fenótipo VanD apresentam resistência moderada e constitutiva para vancomicina (CIM 64 a 128 µg/mL) e teicoplanina (CIM 4 a 64 µg/mL). O fenótipo VanE é induzido e não transferível, com resistência para baixa concentração de vancomicina (CIM 8 a 32 µg/mL) e suscetibilidade à teicoplanina (CIM = 0,5 µg/mL) e o fenótipo VanG apresenta resistência à vancomicina para concentração moderada (CIM = 16 µg/mL) e suscetibilidade à teicoplanina (Courvalin, 2006) (**Tabela 1**).

**Tabela 1:** Níveis e fenótipos de resistência aos glicopeptídeos em enterococos.

Características	Nível de resistência e fenótipos					
	Alto Van A	Variável Van B	Moderado Van D	Baixo		Baixo Van C1 e C2/3
				Van G	Van E	
Vancomicina <sup>a</sup>	≥ 64	4-1000	64-128	16	8-32	2-32
Teicoplanina <sup>a</sup>	16-512	0,5-1	4-64	0,5	0,5	0,5-1
Transferível	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
Elementos móveis	<i>Tn1546</i>	<i>Tn1547</i> ou <i>Tn1549</i>	...	...	...	...
Determinante	Adquirida	Adquirida	Intrínseca	Adquirida	Adquirida	Intrínseca
Localização	Plasmídeo	Plasmídeo	Cromossomo	Cromossomo	Cromossomo	Cromossomo
Alvo modificado	D-Ala-D- Lac <sup>b</sup>	D-Ala-D- Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser <sup>c</sup>	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D- Ser

<sup>a</sup> CIM, µg/mL

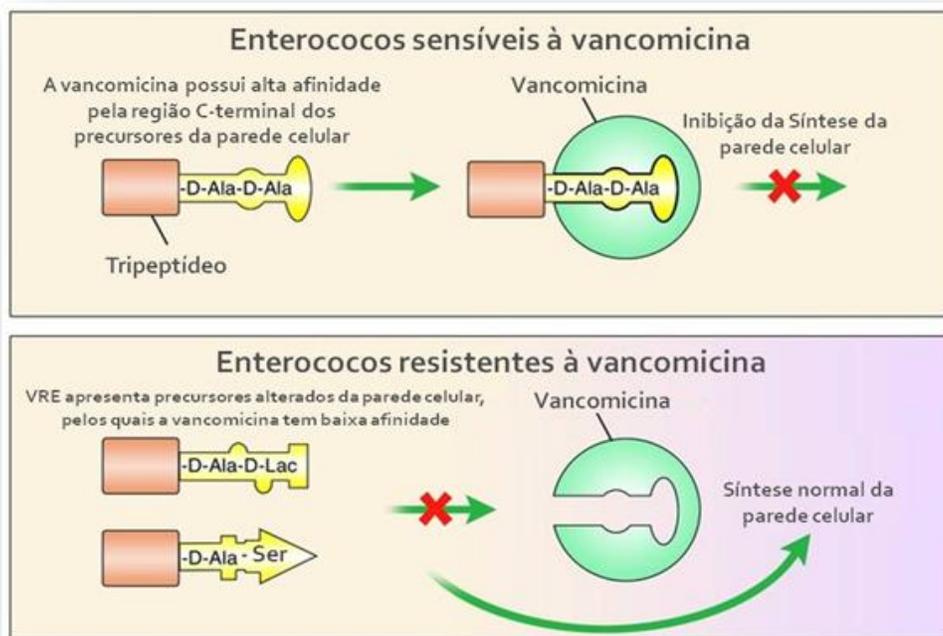
<sup>b</sup> D-Ala-D-Lac: D-alanina-D-lactato

<sup>c</sup> D-Ala-D-Ser: D-alanina-D-serina

**Fonte:** Adaptado de Courvalin (2006).

Atualmente, várias técnicas de genotipagem têm sido utilizadas na detecção de genes de resistência dos enterococos aos glicopeptídeos (*vanA*, *B*, *C*, *D*, *E* e *G*). Uma das técnicas de biologia molecular utilizada para essa finalidade é a reação de polimerase em cadeia (PCR, do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”) que é realizada para a identificação das espécies de enterococos e para a detecção de genes de resistência aos glicopeptídeos (Caiaffa Filho et al., 2003; Moretti et al., 2004; Courvalin, 2006).

O mecanismo bioquímico de resistência à vancomicina ocorre pela produção de precursores de peptideoglicano anormais na parede celular que possuem os pentapeptídeos com terminação em D-Ala-D-Lac nos fenótipos VanA, VanB e VanD ou D-Ala-D-Ser nos fenótipos VanC, VanE e VanG em lugar de D-Ala-D-Ala, cujos glicopeptídeos possuem baixa afinidade (Arthur et al., 1996; Depardieu et al., 2007) (**Tabela 1 e Figura 4**).



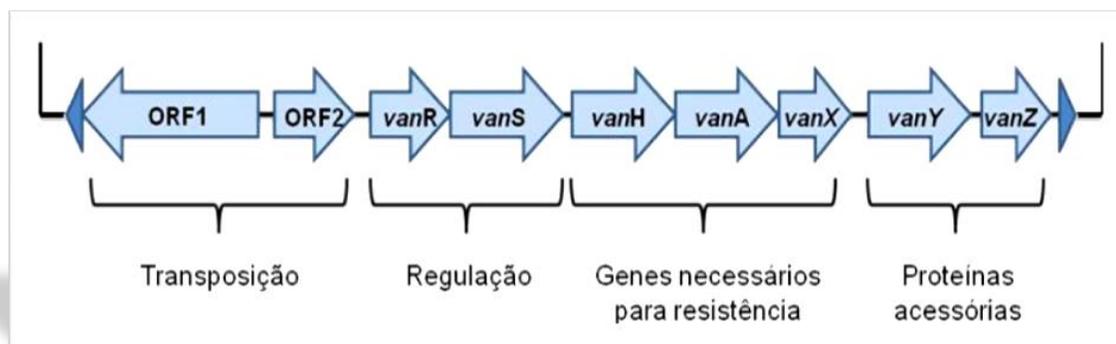
**Figura 4:** Mecanismo de ação e resistência à vancomicina.

**Fonte:** Adaptado de Murray (2000).

No Brasil, o genótipo *vanA* é o mais frequentemente encontrado e o seu mecanismo de resistência é consequência do estudo de um grupo de genes, encontrados em um transposon da família Tn3 com 10.851 pares de bases, chamado de Tn 1546. Este transposon se instala no plasmídeo pIP816 que pode estar inserido ou não ao cromossomo bacteriano. Esse plasmídeo conjugativo é a principal forma de transferência da resistência aos glicopeptídeos entre os microrganismos (Leclercq et al., 1988; Arthur e Couvarlin, 1993; Woodford et al., 1995; Woodford, 1998; Palazzo et al., 2006).

O transposon Tn1546 codifica nove polipeptídeos que podem ser distribuídos em quatro grupos funcionais: 1) duas “open read frame” (ORF1 e ORF2) que tem a função de transposição e codificam a produção de duas enzimas, transposase e resolvase; 2) *vanR* e *vanS* são genes de regulação da resistência à vancomicina; 3) *vanH*, *vanA* e *vanX* são genes de resistência aos

glicopeptídeos; 4) *vanY* e *vanZ* são genes envolvidos na produção de proteínas acessórias como na síntese do peptídeoglicano, mas não são necessárias para conferir resistência aos glicopeptídeos (Arthur et al., 1992; Arthur e Couvarlin, 1993) (**Figura 5**).



**Figura 5:** Mapa de Tn 1546.

**Fonte:** Adaptado de Arthur e Courvalin (1993).

O genótipo *vanB* está localizado no transposon Tn 1547, um elemento de transferência genética estreitamente relacionado com o transposon Tn 1546 que contém o gene *vanA*. Os enterococos que possuem o genótipo *vanA* geralmente expressam o fenótipo VanA, os que possuem genótipo *vanB* expressam o fenótipo VanB e assim ocorre para todos os outros genótipos e fenótipos dos enterococos. Entretanto, algumas discrepâncias estão sendo encontradas em algumas cepas de VRE, que podem apresentar o fenótipo VanB e quando testadas geneticamente, estas possuem o gene *vanA* ou seja, enterococos com fenótipo VanB e genótipo *vanA*.

Durante o monitoramento de VRE em um hospital localizado na cidade de São Paulo, foram detectadas duas cepas de *E. faecalis* resistentes à vancomicina e sensíveis à teicoplanina, consistente com o fenótipo VanB. No entanto, ambas foram confirmadas como pertencentes ao genótipo *vanA* utilizando a técnica de PCR com primers específicos para os genes *vanA* e *vanB*. Este estudo, foi o primeiro relato de isolamento de enterococo com

genótipo *vanA* e fenótipo VanB em amostra clínica no Brasil (Zanella et al., 2006).

Cepa de VRE apresentando esta característica discrepante entre fenótipo e genótipo já havia sido relatada por Joong-Sik et al. em 2004, quando realizaram estudos em um Hospital Universitário na Coréia do Norte. Em outro estudo realizado em Taiwan com 39 cepas de VRE isoladas de carcaças de frango e quatro cepas de VRE isoladas de humanos, encontraram também incongruência entre o fenótipo e o genótipo (Lauderdale et al., 2002). Estudos preliminares da caracterização dos elementos de resistência destas cepas, sugere que mutações no gene regulador *vanS* e/ou *vanZ* podem resultar em uma perda da resistência a teicoplanina, entretanto, estas cepas carregam o gene *vanA* (Arthur et al., 1995; van den Braak et al., 1998; Hashimoto et al., 2000).

Assim como a discrepância entre fenótipos e genótipos pode ser encontrada, existem cepas de enterococos que apresentam mais de um gene de resistência. Por exemplo, são os enterococos que apresentam o genótipo *vanA* e *vanC-1*, sendo que este último gene possui propriedade intrínseca e intransferível para a espécie *E. gallinarum*.

A resistência aos glicopeptídeos mediada pelo gene *vanA* na espécie de *E. gallinarum* tem sido descrita em diferentes regiões do Brasil. O primeiro relato do genótipo *vanA* e *vanC-1* no Brasil foi feito em 2002, em Porto Alegre, a partir de uma cultura de vigilância.(Camargo et al., 2004). Um outro estudo de vigilância realizado no Rio de Janeiro relatou o isolamento de sete cepas de *E. gallinarum* com gene *vanA* (Neves et al., 2009) e em 2008, foi relatado o isolamento de uma cepa de *E. gallinarum* com genótipo *vanA* de um paciente pós-cirúrgico que desenvolveu uma infecção generalizada e fatal. Situações estas, que reforçam a importância dos métodos fenotípicos e genotípicos para caracterização das cepas de VRE (Merquior et al., 2008).

#### **1.4. Aquisição de VRE em hospitais**

VRE é uma bactéria que geralmente acomete pacientes gravemente debilitados e imunocomprometidos em unidades de terapia intensiva (UTI), unidades de transplantes e onco-hematológicas e está associada à infecção hospitalar (Timmers et al., 2002; Patel, 2003; Goossens et al., 2003; Kawalec et al., 2007).

Os principais fatores de risco para aquisição de VRE em ambiente hospitalar podem ser: a) o uso de antibióticos, os quais as bactérias são resistentes (cefalosporinas e aminoglicosídeos) ou a utilização de antibióticos de amplo espectro que favorecem a seleção microbiana; b) o longo tempo de internação dos pacientes; c) a proximidade dos pacientes VRE positivo com os outros pacientes; d) o não cumprimento dos cuidados de biossegurança (lavagem correta das mãos, utilização de luvas, esterilização adequada de materiais hospitalares); e) o uso de múltiplas vias de acesso vascular, cateter urinário e outros materiais invasivos; f) indivíduos debilitados com quadros graves de doença, pacientes transplantados e imunocomprometidos e a combinação de um ou mais fatores (George e Uttley, 1979; Boyce, 1997; Eliopoulos, 1997; Chlebicki e Kurup, 2008).

Diversos estudos relatam que a diminuição da competição com a microbiota intestinal favorece a seleção de VRE e o aumento da concentração deste patógeno nas fezes dos pacientes colonizados são fatores que facilitam a transmissão de VRE (Donskey et al., 2000; Chlebicki e Kurup, 2008).

A colonização por VRE tem sido associada com a utilização de muitas classes de antibióticos incluindo os glicopeptídeos, cefalosporina de segunda e terceira geração e outros antibióticos contra bactérias anaeróbias (Donskey et al., 2000; Chlebicki e Kurup, 2008).

### **1.5. Transmissão de VRE e controle de infecção hospitalar**

Estudos têm mostrado que a transmissão de VRE pode ocorrer pelo contato direto com os pacientes colonizados ou infectados, por meio do contato indireto com as mãos e roupas dos profissionais de saúde ou por equipamentos hospitalares contaminados, tais como, estetoscópios, torniquetes e termômetros. As superfícies de móveis, chão e maçanetas também podem conter VRE e podem ser responsáveis pela sua transmissão, principalmente devido à capacidade desta bactéria de sobreviver em superfície seca por sete dias a quatro meses (Bonten et al., 1996; Wendt et al., 1998; DeLisle e Perl, 2003; Muto et al., 2003).

Outro fator importante na dinâmica da transmissão do VRE é a exposição aos antimicrobianos, que pode exercer uma pressão seletiva e favorecer a seleção de bactérias resistentes (Tacconelli e Cataldo, 2008).

Programas de controle de infecção hospitalar incluem a ação de vigilância, isolamento de pacientes colonizados e infectados, práticas apropriadas de controle de patógenos, incluindo a melhora na higiene das mãos, o uso de precauções de contato até que os pacientes apresentem cultura de vigilância negativa, melhora na limpeza do ambiente, orientações dos profissionais de saúde quanto ao controle de microrganismos resistentes e administração apropriada de antimicrobianos. Essas medidas podem reduzir não somente as taxas de VRE, mas também de outros microrganismos resistentes (Chlebicki e Kurup, 2008). Para que os programas de controle de infecções tenham o máximo benefício é necessário que apliquem estratégia global que almejem todos os microrganismos resistentes e não apenas um microrganismo ou um agente antimicrobiano (Safdar e Maki, 2002).

### **1.6. Tratamento das infecções por VRE**

Enterococos são microrganismos presentes no trato gastrointestinal,

onde geralmente são inofensivos neste sítio. Porém, se tiverem acesso a outros locais do corpo, como a bexiga, a medula espinhal, pulmão, ferimentos e sangue, podem causar infecções do trato urinário, meningite, pneumonia, abscessos, bacteremia e endocardite, respectivamente. Em geral, não causam doenças em seu habitat natural em uma pessoa saudável, mas podem causar em um ambiente diferente, por isso são denominados patógenos oportunistas (Tortora et al., 2005).

A escolha do tratamento e a definição entre uma colonização ou infecção nos pacientes são dificuldades encontradas pelo clínico frente a estes patógenos oportunistas.

A cultura de urina positiva para VRE representa na maioria das vezes, colonização ou bacteriúria assintomática, portanto a terapia com antibiótico geralmente não é recomendada (Wong et al., 2000). Infecções de feridas podem também ser resolvidas sem terapia específica (Quale et al., 1996). A terapia antimicrobiana é claramente indicada para endocardites, meningites e bacteremia causada por VRE, embora seja importante o desenvolvimento de novas terapias para diminuir ou conter a colonização do trato gastrointestinal que representa o principal reservatório e transmissão de VRE (Kauffman, 2003; Moellering Jr, 2005; Zirakzadeh e Patel, 2006).

Embora nenhum agente antimicrobiano atualmente disponível possa erradicar a colonização por VRE, existem várias opções de tratamento para a infecção por esta bactéria. A maioria dos isolados de *E. faecium* resistente a vancomicina são resistentes à penicilina e ampicilina, no entanto, em casos incomuns em que tais agentes são ativos, eles podem ser opções úteis para a terapêutica. O teste de suscetibilidade antimicrobiana é recomendado para verificar a atividade de qualquer agente antimicrobiano que está sendo usado para tratamento de VRE (Zirakzadeh e Patel, 2006).

Dentre as várias opções para o tratamento da infecção por VRE, no final de 1999, a quinupristina-dalfopristina foi a primeira combinação antimicrobiana aprovada, mas o seu uso foi abandonado devido aos frequentes

efeitos colaterais, o estreito espectro e sua atividade ser limitada à espécie *E. faecium* (Linden et al., 2001; Paterson, 2006). Quinupristina-dalfopristina é uma estreptogramina, que age no ribossomo 50S da bactéria, inibindo assim a síntese de proteínas. Apesar de incomum, a resistência pode se desenvolver através da modificação do sítio alvo de ligação, inativação enzimática e efluxo (Winston et al., 2000; Linden et al., 2001).

Linezolida tornou-se disponível em 2000 e foi a primeira de uma nova classe de agentes antimicrobianos denominada de oxazolidinona. Pode ser administrado por via oral ou intravenosa e, ao contrário da quinupristina-dalfopristina, tem atividade contra as duas espécies *E. faecium* e *E. faecalis*, além dos *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*. Atualmente, a linezolida é o único agente oral aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de infecções causadas por VRE. Linezolida inibe a síntese de proteínas ribossomais, mas em um local diferente de outros agentes que alvejam o ribossomo (cloranfenicol, macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas, aminoglicosídeos, tetraciclina). Consequentemente, os mecanismos existentes de resistência a estes agentes não conferem resistência cruzada a linezolida (Zirakzadeh e Patel, 2006). A maioria dos especialistas recomenda a linezolida como uma droga de escolha na terapia de infecções graves causadas por VRE (Zirakzadeh e Patel, 2006; Linden, 2007). Entretanto, esta droga de custo elevado pode causar supressão da medula espinhal em casos de uso prolongado e a síndrome de serotonina quando usada em combinação com outros medicamentos (Huang e Gortney, 2006).

Daptomicina é um lipopeptídeo cíclico, produto da fermentação de *Streptomyces roseosporus*. Este antimicrobiano tornou-se disponível em 2003 e sua ação contra as bactérias Gram-positivas se dá pela interrupção de vários aspectos da função da membrana bacteriana (Rand e Houck, 2004). Embora a daptomicina tenha atividade *in vitro* contra cepas de VRE, dados publicados mostraram que este antimicrobiano não deve ser usado para tratar pneumonia porque os ensaios clínicos demonstraram uma elevada taxa de insucesso neste

sítio (Jeu e Fung, 2004). Além disso, a resistência à daptomicina começou a emergir (Long et al., 2005; Munoz-Price et al., 2005; Lewis et al., 2005).

Tigeciclina é um agente antimicrobiano do grupo das glicilciclinas com amplo espectro que se tornou disponível em 2005. Possui atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas aeróbias e anaeróbias. Similar à daptomicina, este composto tem atividade *in vitro* contra VRE (Rubinstein e Vaughan, 2005).

Muitos isolados VRE são sensíveis à nitrofurantoína, que tem sido usada para tratar a infecção do trato urinário, mas não possui atividade útil em outras infecções por VRE (Zirakzadeh e Patel, 2006).

Outras opções para o tratamento da infecção por VRE podem incluir mannopeptimicinas e dalbavancina. Mannopeptimicinas é uma nova classe de glicopeptídeos e são antimicrobianos semi-sintéticos isolados de *Streptomyces hygroscopicus*. Semelhante a vancomicina, impede a transglicosilação da parede celular de peptídeoglicano (Rice et al., 2004; Ruzin et al., 2004). Outro glicopeptídeo semi-sintético é a dalbavancina que é ativo contra enterococos com fenótipo VanB, no entanto, tem pouca atividade contra os enterococos com fenótipo VanA (Streit et al., 2005).

As associações representadas por streptograminas (quinupristina-dalfopristina), pela oxazolidinona (linezolida), e por antimicrobianos recentemente licenciados, daptomicina e tigeciclina, juntamente com os glicopeptídeos, fluoroquinolonas e outros compostos experimentais, apresentam uma resposta eficaz ao tratamento (Manfredi e Calza, 2008).

Os antimicrobianos necessitam de um mecanismo inovador de ação contra patógenos multirresistentes, com efetivas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, atividades sinérgicas com os antimicrobianos e, de fácil administração, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Manfredi e Calza, 2008).

### 1.7. Enterococos resistentes à vancomicina (VRE) no mundo

A resistência aos antimicrobianos da classe dos glicopeptídeos, vancomicina e teicoplanina, foi primeiramente reportada na Europa em 1986 (Leclercq et al., 1988) e nos Estados Unidos em 1987 (Uttley et al., 1988). Desde então, o VRE tem sido isolado em todo o mundo com aumento da sua prevalência (Low et al., 2001).

Nos Estados Unidos, de acordo com o “National Nosocomial Infection Surveillance System” (NNISS), a porcentagem de VRE aumentou de 0,4 para 25% em isolados de pacientes em UTI em um período de 10 anos (Patel, 2003). No sentido inverso, infecções com VRE são relativamente incomuns nos hospitais europeus, que estão presentes especialmente entre a microbiota intestinal de animais de fazenda e humanos saudáveis. Esta grande reserva está relacionada ao uso da avoparcina, um antibiótico do grupo dos glicopeptídeos utilizado como um promotor de crescimento animal. Em países europeus, tem sido detectado VRE em fezes de animais de fazenda e em alimentos derivados desses animais, tais como produtos de carne crua. Após a avoparcina ser banida em 1997, a frequência do reservatório de VRE diminuiu significativamente (Endtz et al., 1997; Klare et al., 1999; Patel, 2003; Stampone et al., 2005; Borgmann et al., 2007).

Segundo o NNISS, durante o ano de 1999 os VRE representavam 24,7% de todas as infecções enterocócicas identificadas na UTI em hospitais americanos (Shepard e Gilmore, 2002). De um modo geral, esta bactéria é responsável por 17% das infecções urinárias e 7% das bacteremias (Boyle et al., 1993; Privitera et al., 1995). A presença de portadores de VRE foi reportada pelo NNISS a partir de 1993, em pacientes de UTI, com risco de infecção progressiva (Huycke et al., 1998).

Surtos hospitalares causados por cepas de VRE nos Estados Unidos e na Europa estão frequentemente associados com a espécie *E. faecium*, que apresenta um perfil de multirresistência aos antimicrobianos muito mais

preocupantes do que o perfil encontrado na espécie *E. faecalis*. No Brasil, o *E. faecalis* foi, inicialmente, à espécie mais frequentemente associada aos casos isolados de infecção por VRE (Low et al., 2001).

### 1.8. Enterococos resistentes à vancomicina no Brasil

No Brasil, o primeiro relato de isolamento de VRE foi em 1996 em Curitiba, no estado do Paraná. A cepa foi isolada de um caso de aplasia de medula e a espécie isolada foi o *E. faecium* com fenótipo VanD (Costa et al., 1998; Costa et al., 2000). Em junho de 1997, em São Paulo, no Hospital Santa Marcelina foi isolada a primeira cepa de *E. faecium* com fenótipo VanA, de um paciente com sorologia positiva para HIV e com quadro clínico de meningite (Zanella et al., 1999). A partir de maio de 1998, neste hospital, novas cepas de VRE passaram a ser isoladas de casos de infecções, fato que levou a um estudo de colonização para identificação de pacientes portadores de VRE no trato gastrointestinal para a caracterização do primeiro surto (Zanella, 2001).

O primeiro relato de VRE com o gene *vanA* no nordeste do Brasil foi em Pernambuco. As cepas foram isoladas em 2004 no Hospital Universitário Osvaldo Cruz localizado na cidade de Recife (Vilela et al., 2006).

Em São Paulo, um estudo relatou a caracterização molecular de cepas *E. faecium* com o objetivo de avaliar a disseminação de VRE em seis centros médicos. O resultado encontrado foi uma disseminação policlonal das cepas em quatro diferentes áreas do hospital (Cereda et al., 2002). Em outro estudo de caracterização molecular realizado pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo de maio a julho de 1999, no qual foram caracterizadas 10 cepas de *E. faecalis* resistente aos glicopeptídeos, verificou-se que todas as cepas eram originadas de um mesmo clone, sugerindo uma disseminação nosocomial (Moretti et al., 2004). Ainda neste estudo, a ocorrência da disseminação inter-hospitalar foi confirmada. Moretti et al. (2004) verificaram que cepas de *E. faecalis* resistente aos glicopeptídeos, fenótipo

VanA, isoladas de pacientes internados de dois hospitais localizados em cidades do estado de São Paulo, distantes entre si em 100 Km, eram estreitamente relacionadas.

Desse modo, a tipagem molecular demonstra expressiva importância para o estudo epidemiológico deste patógeno que se torna cada vez mais emergente em todo o país.

Poucos são os relatos de estudos analisando a epidemiologia das culturas clínicas positivas para VRE no Brasil, o que reforça a importância de se fazer estudos de vigilância para a contenção deste patógeno. Estudos mostram que a incidência de pacientes colonizados em um hospital é 10 vezes maior que de paciente infectados, contribuindo para a transmissão a outros pacientes (Montecalvo et al., 1995; Furtado et al., 2005).

VRE são importantes causas de infecção hospitalar em vários países com limitada ou nenhuma opção terapêutica para tratamento das infecções graves (Woodford et al., 1998; Cetinkaya et al., 2000).

### **1.9. Vigilância laboratorial do VRE**

A vigilância laboratorial ativa é uma parte importante para um programa abrangente de controle de VRE (Byers et al., 2001; Siddiqui et al., 2002). Para cada paciente infectado com VRE existem muitos outros que são assintomáticos (Montecalvo et al., 1995). Eles podem permanecer colonizados por um período de até seis meses servindo como reservatório para transmissão de VRE para outros pacientes (Brennen et al., 1998). Apenas a cultura de vigilância pode identificar estes portadores assintomáticos permitindo tomar, inicialmente, precauções apropriadas para prevenir a disseminação de VRE. As culturas de vigilância também mostraram ter um bom custo/benefício (Muto et al., 2002).

Vários métodos de investigação microbiológica têm sido desenvolvidos para a detecção de VRE usando amostras de fezes, swab anal ou perianal. O

índice de isolamento de VRE de amostras de fezes é geralmente maior do que o de swab retal (D'Agata et al., 2002). A detecção pode ser melhorada pela inoculação de amostras de fezes ou swab retal em meio enriquecido, chamado caldo Enterococcosel contendo vancomicina e aztreonam (Landman et al., 1996; Taylor et al., 1999). Algumas técnicas moleculares podem encurtar o tempo de pesquisa, mas a especificidade e valor preditivo positivo geralmente são baixos (Koh et al., 2007; Young et al., 2007). Porém, é importante ressaltar que os métodos fenotípicos e genotípicos se complementam na identificação do VRE.

A técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE, do inglês "*Pulsed Field Gel Electrophoresis*") é muito utilizada na tipagem de amostras de VRE. Esta é considerada "padrão ouro" para estudos epidemiológicos, permitindo identificar a similaridade genética entre as cepas e monitorar uma possível disseminação clonal ou policlonal das bactérias nos ambientes hospitalares.

PFGE é uma técnica na qual as moléculas de DNA são digeridas por enzimas de restrição e o fragmento obtido pela restrição é usado para discriminar as cepas bacterianas. Os métodos de tipagem molecular têm aumentado a habilidade em diferenciar os isolados bacterianos e fornecer dados epidemiológicos importantes, especialmente em relação a surtos causados por bactérias que apresentam resistência aos antimicrobianos. Com a introdução de métodos discriminatórios, como o PFGE, tem sido possível demonstrar que o enterococo pode ser adquirido por contato direto ou indireto entre pacientes, além da transmissão inter e intra-hospitalar (Bedendo e Pignatari, 2000).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Investigar a similaridade genética de cepas de *Enterococcus* spp resistente à vancomicina (VRE), isoladas de pacientes internados em hospitais da rede pública e privada do município de São Paulo, no período de 1999 a 2008.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Determinar a frequência das espécies de VRE estudadas no período de 1999 a 2008.
- Avaliar o perfil de suscetibilidade das cepas de VRE estudadas no mesmo período.
- Analisar a disseminação de tipos e subtipos genéticos das cepas de VRE pela técnica de PFGE.

### 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

#### 3.1. Casuística

No período de 1999 a 2008, um total de 1.513 cepas de VRE com genótipo VanA isolada de pacientes internados em hospitais da rede pública e privada do estado de São Paulo, foram enviadas ao Núcleo de Meningites, Pneumonias e Infecções Pneumocócicas do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) para serem confirmadas quanto a identificação da espécie, suscetibilidade antimicrobiana e PCR para pesquisa de gene de resistência (*vanA*, *vanB* e *vanC*<sub>1-2/3</sub>). No IAL, as cepas de Enterococos são mantidas liofilizadas (High Vacuum Freeze Dryer Super Modulyo, Edwards, Sussex, Inglaterra) em leite desnatado a 10% e catalogadas em programa de banco de dados Epi-Info (versão 6.04b) incluindo os dados demográficos.

Deste total temos que 1.015 cepas (67%) foram identificadas como *E. faecalis* e 498 (33%) como *E. faecium*, sendo que 839 (55%) cepas foram isoladas de materiais clínicos de pacientes com suspeita de infecção e 674 (45%) de materiais clínicos de suposta colonização. Os materiais clínicos invasivos foram referidos para: sangue, urina e líquidos cavitários. Este último compreende líquido pleural, líquido cefalorraquidiano, líquido ascítico, líquido sinovial, abscesso, secreção e lavado broncoalveolar. Os materiais clínicos isolados de pacientes supostamente colonizados foram atribuídos para: swab retal, ferida cirúrgica, secreção traqueal e cateter.

Das 1.513 cepas de VRE, um total de 507 cepas, foi selecionado levando-se em consideração três critérios: i) material clínico invasivo, ii) hospitais da cidade de São Paulo e a região de Taboão da Serra (n=26) e iii) exclusão de duplicatas de mesma espécie e mesmo material clínico. Destas, 239 cepas foram escolhidas de forma randômica para a tipagem molecular por PFGE, levando-se em consideração o número total de cepas enviadas por hospital a cada ano, como mostra a **Tabela 2**.

**Tabela 2:** Número de cepas de VRE recebidas por hospital e por ano pelo IAL segundo os critérios de seleção e número de cepas selecionadas para a tipagem molecular por PFGE.

Hospital	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	N	n (%)
1	43	14	6	19	12	35	40	8	79	54	310	67 (22)
2	2										2	2 (100)
3	1										1	1 (100)
4		2	1			1					4	4 (100)
5		3						2	2		7	6 (86)
6			1								1	1 (100)
7			1				1		4	6	12	12 (100)
8		2	2	2							6	5 (83)
9				6		1					7	7 (100)
10				1					1		2	2 (100)
11				5	2	6	3	6	2	1	25	18 (72)
12		1				8	6	1			16	16 (100)
13		1	1				1			3	6	6 (100)
14			1								1	1 (100)
15			1								1	1 (100)
16			1	6							7	4 (57)
17						1		2			3	2 (67)
18						2		3	3	2	10	9 (90)
19					1	1	2		8	6	18	17 (94)
20				2	5	4	4	3	7	5	30	28 (93)
21				1							1	1 (100)
22							2	1		3	6	5 (83)
23							2				2	2 (100)
24								3		1	4	4 (100)
25								17			17	10 (59)
26									4	4	8	8 (100)
<b>Total</b>	<b>46</b>	<b>23</b>	<b>15</b>	<b>42</b>	<b>20</b>	<b>59</b>	<b>61</b>	<b>46</b>	<b>110</b>	<b>85</b>	<b>507</b>	<b>239 (47)</b>

N: nº total de cepas encaminhadas ao IAL  
n: nº de cepas selecionadas para o estudo

### 3.2. Aspectos éticos

O desenvolvimento deste trabalho observou as recomendações da Resolução no196/96 - Conselho Nacional de Saúde para Pesquisa Científica em Seres Humanos. Neste trabalho foram estudadas cepas de *Enterococcus*

spp resistentes à vancomicina para a tipagem molecular, isoladas de pacientes no período de 1999 a 2008, que foram enviadas ao Instituto Adolfo Lutz para identificação e determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Estas cepas estão mantidas liofilizadas no banco de cepas do Núcleo de Meningites, Pneumonias e Infecções Pneumocócicas, Centro de Bacteriologia do IAL, somente com o número de registro/ ano/ material clínico/ nome do hospital, sem mais informações que permitam identificar os pacientes, de forma a garantir a privacidade e o anonimato dos mesmos.

### **3.3. Métodos**

#### **3.3.1. Identificação bioquímica**

A identificação das amostras em gênero e espécie segue as provas bioquímicas padronizados internacionalmente por Facklam e Teixeira (2003).

Primeiramente, as amostras foram confirmadas pelo reconhecimento da morfologia de colônia em placa de ágar sangue (base ágar sangue, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA), acrescida de 5% de sangue desfibrinado de carneiro, pela morfologia celular através da coloração de Gram e pela prova enzimática de presença da catalase.

Posteriormente, provas presuntivas para identificação do gênero foram realizadas, como capacidade de crescimento em meio de cultura líquido acrescido de 6,5% de NaCl, capacidade de crescimento na presença da bile e hidrolisar a esculina e a hidrólise enzimática da L-pyrrolidonyl-beta-naphtylamide (Teste PYR- Probac, São Paulo, Brasil).

A fermentação dos carboidratos manitol, sorbitol, sorbose, arabinose e rafinose (Sigma, Chemical Co., St. Louis, USA) foi avaliada em meio de cultura líquido, tendo como base o caldo de infusão de coração (Heart Infusion Broth - HIB, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA), esterilizado por autoclavação a 121°C por 15 minutos. Ao caldo acrescentou-se o carboidrato e o indicador

azul de bromocresol para uma concentração final de 1%.

Para o teste da hidrólise da arginina, o meio utilizado foi o caldo descarboxilase de Moeller (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) acrescido de 1% de (L)-arginina (Sigma, CO. - ST. Louis, EUA). O meio esterilizado por autoclavação foi distribuído em tubos e uma camada de um centímetro de óleo mineral estéril foi adicionada ao meio.

O teste da hidrólise do piruvato foi realizado em caldo piruvato 1% (Gross et al., 1975), para o teste de motilidade utilizou-se o meio Motilidade (Difco) e a produção de pigmento foi observada após crescimento em ágar sangue por 18 horas de incubação a 37 °C.

### **3.3.2. Identificação genética das espécies *E. faecalis* e *E. faecium***

Para confirmação das espécies, foi utilizada a técnica da PCR para amplificação dos genes *ddl* que codificam as ligases D-alanina, espécie-específicas para *E. faecalis* e *E. faecium*. (Dutka-Malen et al. 1995).

Para cada 25 µl de reação foram utilizados: tampão da PCR 10X [TRIS-HCl 20 mM, pH8,4; KCl 50 mM (Gibco, BRL)], na concentração final de 1X; 3mM de solução de MgCl<sub>2</sub> (Gibco, BRL); desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) 100 mM (Gibco, BRL), na concentração final de 200 µM; iniciadores *ddl E. faecalis* E1 e E2 e *ddl E. faecium* F1 e F2, conforme sequência publicada por Dutka-Malen et al. (1995), na concentração final de 50 ng cada. Adicionou-se a enzima Taq DNA Polimerase (Gibco, BRL), na concentração final de 1U para cada reação e água destilada, esterilizada, para um volume final de 25 µl. Duas a quatro colônias isoladas, a partir de uma cultura pura em ágar sangue, foram adicionadas em cada tubo de reação (Free e Sham, 1996).

As amostras, os controles positivos *E. faecalis* ATCC 29212 e *E. faecium* 228 e negativo (tubo contendo somente a mistura de reagentes sem DNA bacteriano), foram incubados no termociclador (Mastercycler Personal Eppendorf) e submetidos aos seguintes ciclos (Dutka-Malen et al, 1995):

- 1 ciclo a 94 °C /2 min.
- 30 ciclos a 94 °C /1 min., 54 °C /1 min., 72 °C / 1 min.
- 1 ciclo a 72 °C / 10 min.

Após o término da reação, o produto de amplificação foi mantido a 4 °C, para posterior análise pela eletroforese em gel de agarose (Sigma) a 1,5% em TBE 1X. A corrida eletroforética foi de 90 minutos a 100 volts. Foi utilizado como marcador de peso molecular para os fragmentos de DNA, 100 pb DNA Ladder (Gibco BRL). A coloração do gel foi realizada com brometo de etídeo a 0,5 µg/ml por 30 minutos, seguido de descoloração e fotografado pelo sistema de fotodocumentação do equipamento Gel Doc EQ (Bio-Rad).

### **3.3.3. Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos**

#### **3.3.3.1. Teste presuntivo para resistência à vancomicina**

Todas as cepas foram testadas presuntivamente quanto à suscetibilidade à vancomicina pelo método de difusão em ágar, conforme técnica descrita pelo manual CLSI (1999). Com o auxílio de uma micropipeta automática (Finnpipette, Labsystems, Helsinki, Finlândia) o volume de 10 µl de uma suspensão bacteriana com 10<sup>8</sup> UFC/ml, preparada com o auxílio da escala 0,5 de McFaland foi semeado em uma placa de ágar BHI (Brain Heart Infusion – Difco) contendo 6 µg/ml do referido antibiótico. Após incubação da placa por 24 h a 37 °C em aerobiose procedeu-se a leitura. O crescimento de mais do que uma colônia foi considerado teste presuntivo positivo para resistência à vancomicina. Para controle de qualidade foram utilizadas cepas padrão *E. faecalis* ATCC 29212 e 51299.

### **3.3.3.2. Teste para determinação do alto nível de resistência (HLR) aos aminoglicosídeos**

Para este teste, aproveitou-se a mesma suspensão bacteriana preparada no ítem anterior e o mesmo volume de 10 µl foi semeado em duas placas de ágar BHI contendo 500 µg/ml de gentamicina ou 2.000 µg/ml de estreptomicina, conforme técnica descrita pelo manual do CLSI (1999). A incubação e leitura das placas foram feitas nas mesmas condições que a do teste presuntivo, com exceção da placa com gentamicina, que quando o resultado foi negativo, esta foi incubada por mais 24 h.

Para aferição das concentrações dos antibióticos nas placas de ágar BHI, utilizaram-se as cepas de *E. faecalis* padrão ATCC 29212 e ATCC 51299, como controle de suscetibilidade e resistência, respectivamente.

### **3.3.3.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)**

Para os ensaios de determinação da CIM, utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo, conforme recomendações do CLSI (1999). As cepas foram avaliadas frente a 12 antimicrobianos: vancomicina (VAN), teicoplanina (TEI), gentamicina (GEN), estreptomicina (EST), ampicilina (AMP), ciprofloxacina (CIP), tetraciclina (TET), clorofenicol (CLO), rifampicina (RIF), eritromicina (ERI), linezolidina (LNZ) e quinupristina / dalfopristina (QD)

Os sais dos antimicrobianos foram adquiridos comercialmente (Sigma) e estocados em dessecadores a vácuo, a - 20 °C. As soluções concentradas dos antimicrobianos foram feitas em água destilada esterilizada ou em outro solvente adequado ao antimicrobiano, levando-se em consideração a potência de cada antimicrobiano fornecida pelo produtor.

Como meio de cultura, utilizou-se o caldo Mueller-Hinton II (MHII) ajustado com cátions (BBL, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, EUA). Neste caldo, prepararam-se as diluições de uso dos

antimicrobianos seguidas de diluições seriadas de 1:2. Após a dispensa de 50 µl das diferentes diluições dos antimicrobianos nas placas de microdiluição estéreis com 96 poços (Corning), estas foram mantidas a - 20 °C devidamente lacradas e acondicionadas até a realização dos testes de determinação da CIM.

Para a determinação da CIM, o inóculo bacteriano foi preparado em solução fisiológica esterilizada, a partir de um crescimento de 18 h em placas de ágar sangue. Com auxílio de um “swab” e de um espectrofotômetro (CELM E210D) ( $A_{625nm} = 0,8-1,3$ ), preparou-se uma suspensão bacteriana ajustada para uma concentração de  $10^8$  UFC/ml. Desta suspensão, preparou-se o inóculo em caldo MHII para uma concentração final de  $10^6$  UFC/ml. Um volume de 50 µl foi adicionado por poço das placas de microdiluição e foram incubadas a 37 °C por 24 h em condições de aerobiose.

Controle de concentração dos inóculos bacterianos foi realizado em duas de cada oito cepas testadas por placa de microdiluição, através de semeaduras quantitativas em placas de ágar sangue.

A cepa de *E. faecalis* padrão ATCC 29212 foi utilizada como controle de qualidade do teste para todos os antimicrobianos. O controle de pureza do inóculo bacteriano foi observado pela coluna, na qual se tinha somente meio de cultura sem antimicrobiano e com inóculo bacteriano; o controle de esterilidade do meio de cultura foi realizado observando-se a coluna, na qual continha somente o meio de cultura sem inóculo bacteriano.

A leitura da CIM foi a menor concentração de antibiótico na qual não se observou visualmente o crescimento bacteriano. Os critérios de suscetibilidade e resistência adotados para cada antimicrobiano foram os recomendados pelo CLSI (1999).

#### **3.3.4. Detecção dos genes de resistência à vancomicina (*vanA*, *vanB*, *vanC-1* e *vanC-2/3*)**

Para confirmação dos genes de resistência *vanA*, *vanB*, *vanC-1* e

*vanC-2/3* foram utilizados as mesmas sequências de nucleotídeos publicados por Zanella et al. (2003).

O preparo das amostras para a reação da PCR foi o mesmo utilizado no item 3.3.2 Cepas de *E. faecium* - *vanA* 228, *E. faecalis* - *vanB* ATCC 51299, *E. gallinarum* NCTC 12359 e *E. casseliflavus* NCTC 1261 foram utilizadas como controles positivos e a cepa *E. faecalis* ATCC 29212 como controle negativo. As amostras e os controles foram incubados no termociclador e submetidos aos seguintes ciclos, conforme publicação de Woodford et al. (1995b):

- 1 ciclo a 94 °C /5 min.,
- 30 ciclos a 94 °C /25 seg., 54 °C /40 seg., 72 °C /40 seg.,
- 1 ciclo a 72 °C /5 min.

### **3.3.5. Tipagem molecular por PFGE**

A caracterização genética das cepas de VRE foi realizada pela metodologia de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). O protocolo modificado utilizado para esta caracterização tem como base o mesmo utilizado por Zanella et al. (2003).

#### **3.3.5.1. Condições de crescimento bacteriano e lise celular**

As amostras de VRE foram cultivadas em ágar Brain Heart Infusion (BHI) a 37°C por 18-24h. Uma colônia do crescimento bacteriano foi semeada em 5mL de caldo Toddy Hewitt (Difco) e incubada a 37°C por 18h. Um volume de 1,5mL do crescimento foi centrifugado por 2 minutos a 12.000 rpm a 11°C. O sedimento foi lavado com 500 µl de tampão PIV {TRIS 10mM (Sigma), NaCl 1M (Sigma), pH 8,0} e centrifugado, descartando o sobrenadante para obter o sedimento. A partir desse sedimento foi preparada uma suspensão bacteriana em 200µL de PIV. Um volume de 150µL desta suspensão foi diluído em 150µL

de agarose de baixo ponto de fusão (Sigma) a 1,5%, a qual foi equilibrada a temperatura de 40°C em banho-maria. Com auxílio de uma micropipeta automática, gotas de 20µL foram dispensadas sobre uma placa de vidro recoberta com parafilme e coberta com uma lâmina de microscopia. Após solidificação a -20°C por 5 minutos, discos de agarose contendo as células bacterianas foram formados.

Após este período os discos foram removidos cuidadosamente para um tubo estéril e cônico, utilizando uma alça descartável, contendo 1mL de tampão EC {Tris 6mM, NaCl 1M, EDTA 100mM, Desoxicolato de Sódio 0,2%, N-laurilsarcosina (Sigma), pH 8}. Adicionou-se ao tampão EC, RNase para uma concentração final de 50µg/mL e Lisozima para uma concentração final de 100 µg/mL e os discos foram incubados a 37°C por 4-6 horas. Após este período de incubação retirou-se o tampão EC e adicionou-se 1mL da solução ES {EDTA, N-laurilsarcosina, pH 9,0} acrescida de Proteinase K para uma concentração final de 1mg/mL (Invitrogen Tech-Line, USA) e os discos foram incubados a 50°C por 18-24h. Após este período, os discos foram lavados três vezes por 30 minutos (cada), com tampão TE {TRIS 10mM , pH 7,5, EDTA 1Mm, pH 8,0} e mantidos em solução tampão TE sob refrigeração.

### **3.3.5.2. Digestão do DNA bacteriano**

Os discos de agarose contendo DNA bacteriano foram equilibrados com 50 µL de tampão de enzima de restrição (TRIS 6mM, pH 8, KCl 20mM, MgCl<sub>2</sub> 6mM) por no mínimo 30 minutos a temperatura ambiente. Após a retirada deste tampão, adicionou-se 45µL do mesmo tampão acrescido de 2-mercaptoetanol a 6mM, 10µl /ml de BSA e enzima de restrição *Sma*I (BIONEER) na concentração final de 0,6U/µL. Esta reação foi mantida a 25°C por 4-18h para a digestão do DNA.

### 3.3.5.3. Preparo do gel de eletroforese

A separação dos fragmentos de DNA foi realizada pela eletroforese em gel de agarose para PFGE (Sigma) a 1% em tampão TBE 0,5X {TRIS 0,89M, ácido bórico 0,89M; EDTA 0,25M}. O padrão de peso molecular Lambda S340 (New England, Biolabs) foi utilizado para comparação das bandas. A corrida eletroforética foi realizada no sistema CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA) e nas seguintes condições: tensão de 200 volts, temperatura de 11°C, tempo inicial de 5s, tempo final de 35s, tempo de corrida de 24h.

Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo 1% por 30 minutos, seguido de descoloração e fotografado pelo sistema de fotodocumentação do equipamento Gel Doc EQ (Bio-Rad).

### 3.3.6. Análise do perfil genético

#### 3.3.6.1. Critério de Tenover

Os perfis eletroforéticos foram analisados visualmente comparando-se os fragmentos de DNA, de cada perfil eletroforético das cepas estudadas, considerando-se o número e o tamanho aparente dos fragmentos. Os critérios utilizados para definição dos perfis genéticos foram estabelecidos por Tenover et al. (1995). Definiram-se cada padrão ou tipo genético em PFGE quando houvesse uma diferença maior que 50% dos fragmentos dos perfis eletroforéticos, denominando-os arbitrariamente com letra maiúscula, por exemplo: A, B, C, D, etc... De A - L foram atribuídos os perfis eletroforéticos de *E. faecalis* e da letra M - Z para os *E. faecium*. Definiram-se subtipos genéticos quando o número de diferenças nos perfis eletroforéticos, em cada padrão ou tipo genético, foi de um a seis fragmentos, denominados arbitrariamente com a letra maiúscula do padrão ou tipo genético seguida de número, por exemplo:

A1, A2, A3, etc...

### **3.3.6.2. Porcentagem de similaridade genética**

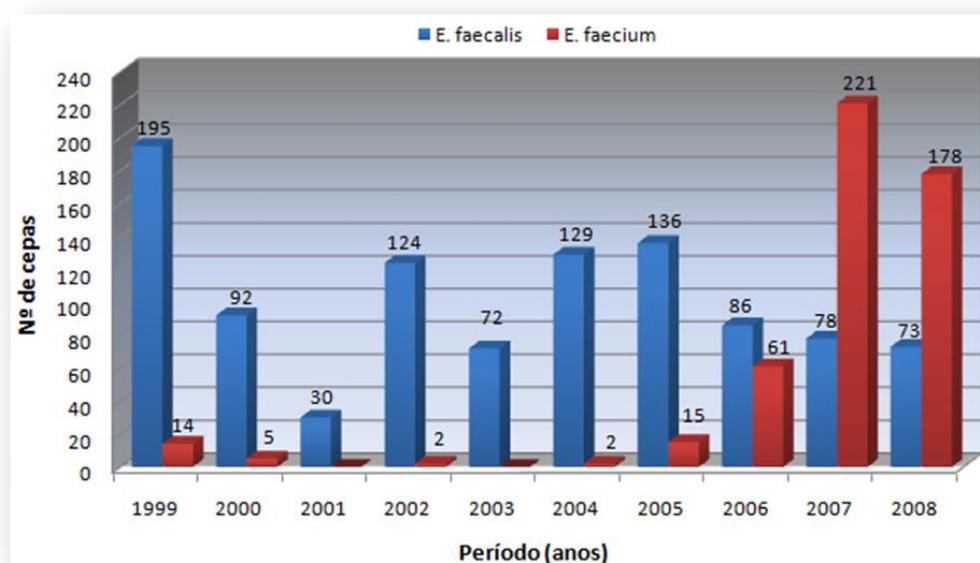
Uma análise dos perfis genéticos foi realizada também através do programa de computador BioNumerics (Version 5.0; Applied Maths NV, Keistraat 120, 9830 Sint-Martens-Latem, Belgium).

No caso de duas amostras bacterianas apresentarem exatamente o mesmo padrão de bandas, trata-se de uma única linhagem bacteriana. Se um padrão for semelhante, mas não idêntico ao outro padrão analisado, deve-se fazer uma estimativa do grau de parentesco entre os perfis. A avaliação da similaridade genética entre os perfis é feita através da construção de um dendrograma. O dendrograma fornece valores em porcentagens, onde a proximidade genética é estimada pela distância entre os perfis, percorrendo-se suas linhas verticais. O programa de computador BioNumerics, citado acima, produz este tipo de resultado. Para esta análise aplicou-se coeficiente de Dice e o método de pareamento das bandas (UPGMA) para gerar os dendrogramas de relações genéticas entre os perfis, comparando-os entre si. Foi utilizado uma tolerância 2% e uma otimização de 1% (Caniça et al., 2003).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Amostras de VRE

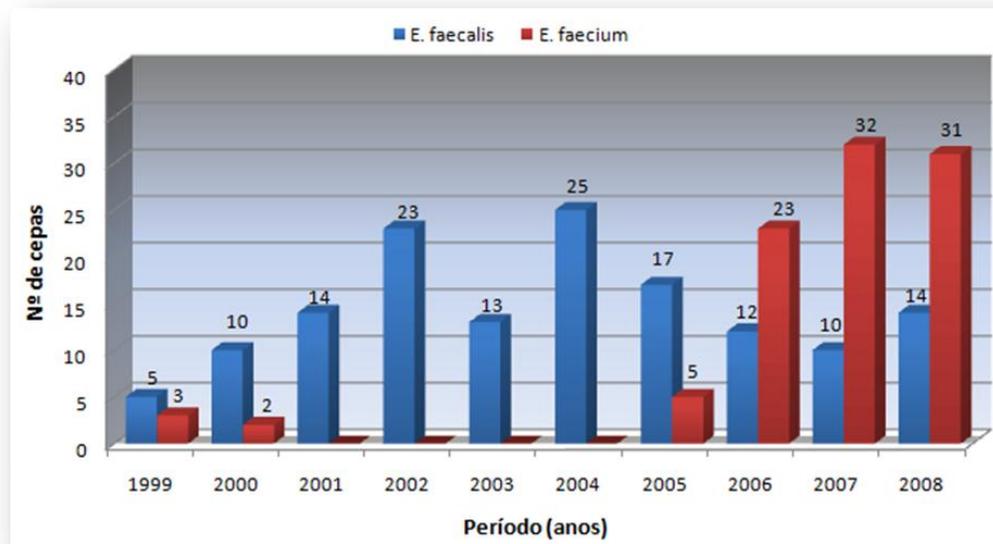
A **Figura 6** mostra a frequência anual das duas espécies entre as 1.513 cepas de VRE recebidas pelo IAL durante o período de 10 anos. A espécie *E. faecalis* apresentou uma maior frequência de isolamento até o ano de 2006 e a partir de 2007, esta predominância foi substituída pela espécie de *E. faecium*, independentemente, do sítio de isolamento.



**Figura 6:** Distribuição anual do número de cepas das espécies de *E. faecalis* e *E. faecium* encaminhadas à rotina diagnóstica do IAL no período de 1999 a 2008.

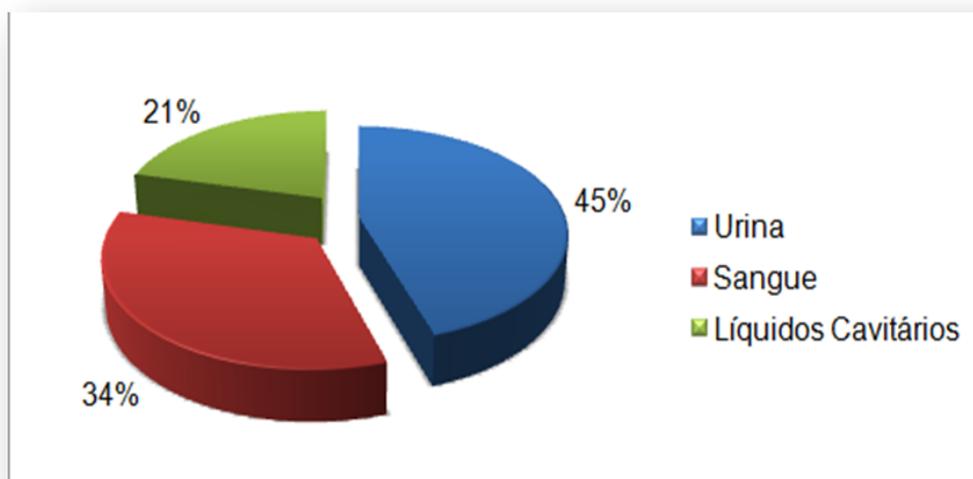
A **Figura 7** mostra a distribuição anual das 239 cepas selecionadas para este estudo, entre as quais se tem 143 (60%) cepas de *E. faecalis* e 96

(40%) de *E. faecium*. Para esta amostragem, a espécie *E. faecalis* apresentou uma maior frequência de isolamento até o ano de 2005 e a partir de 2006 o *E. faecium* tornou-se predominante até o final do período estudado.



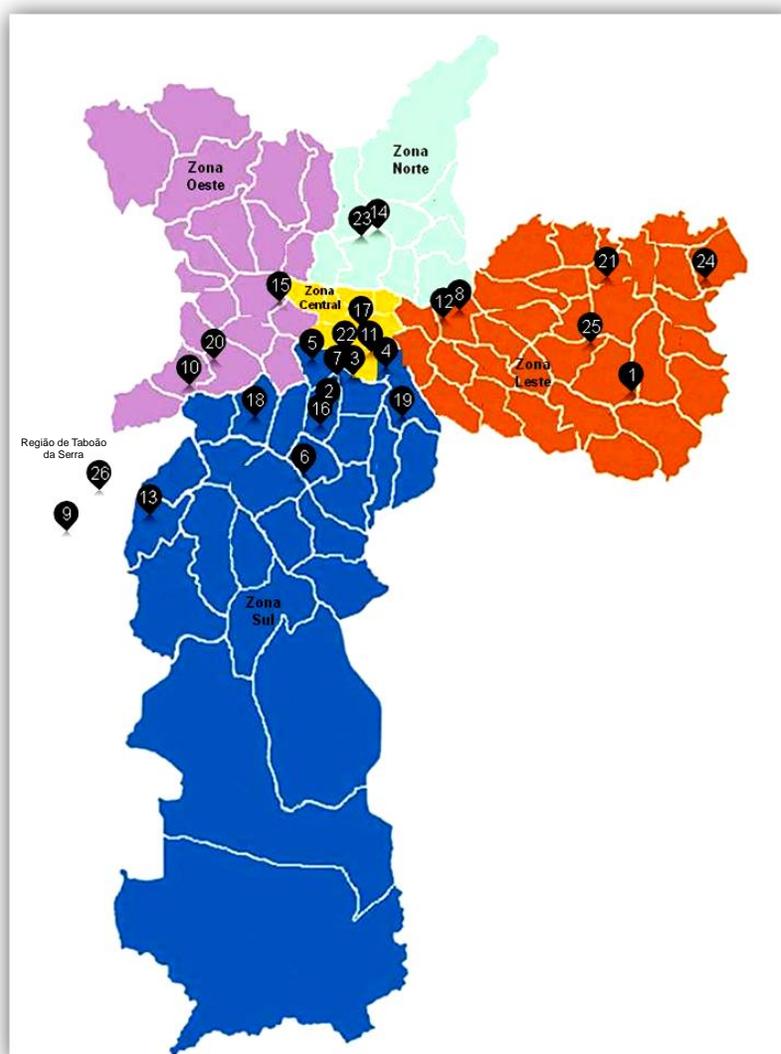
**Figura 7:** Distribuição das 239 cepas de VRE selecionadas para o estudo por ano e por espécie, *E. faecalis* (n=143) e *E. faecium* (n=96).

Entre estas 239 cepas de VRE, temos que 107 (45%) foram isoladas de urina, 81 (34%) de sangue e 51 (21%) de líquidos cavitários (**Figura 8**).



**Figura 8:** Distribuição das 239 cepas de VRE selecionadas para a tipagem por PFGE de acordo com o espécime clínico.

As 239 cepas de VRE estão distribuídas entre 26 hospitais que pertencem à rede pública e privada de São Paulo, sendo 24 hospitais localizados no município de São Paulo e dois localizados na região de Taboão da Serra/SP. Conforme a **Figura 9** observa-se que os hospitais estão distribuídos em todas as regiões do município de São Paulo e pode-se destacar que a maioria se localiza nas regiões sul, central e leste do município.



**Figura 9:** Distribuição geográfica dos 26 hospitais que encaminharam as 239 cepas de VRE ao IAL, selecionadas para a caracterização por PFGE, de 1999-2008.

#### 4.2. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos

A **Tabela 3** mostra o percentual de resistência das cepas de *E. faecalis* e *E. faecium*, aos antimicrobianos utilizados no monitoramento dos VREs. As duas espécies apresentaram um alto padrão de resistência, porém com algumas diferenças entre elas. As cepas de *E. faecalis* mostraram-se mais

resistentes a gentamicina e tetraciclina do que o *E. faecium*, apresentando resistência de 97% e 92% e *E. faecium* de 22% e 13%, respectivamente. Em contra partida, o *E. faecium* apresentou 85% de resistência para estreptomicina e 100% para ampicilina, enquanto o *E. faecalis* apresentou um menor percentual de resistência para estas drogas como 28% e 9%, respectivamente. Na análise dos antibióticos da classe dos glicopeptídeos, três cepas de *E. faecalis* apresentaram resistência a vancomicina e sensibilidade a teicoplanina.

**Tabela 3:** Percentual de resistência das 239 cepas de VRE selecionadas para tipagem molecular por PFGE, isoladas no período de 1999 a 2008.

Espécie	Percentual de Resistência										n
	HLGR	HLSR	VAN	TEI	AMP	CIP	TET	CLO	RIF	ERI	
<i>E. faecalis</i>	97%	28%	100%	98%	9%	100%	92%	99%	98%	98%	143
<i>E. faecium</i>	22%	85%	100%	100%	100%	97%	13%	69%	93%	96%	96

n: número total de amostras; HLGR: alto nível de resistência à gentamicina; HLSR: alto nível de resistência à estreptomicina; VAN: vancomicina; TEI: teicoplanina; AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina; TET: tetraciclina; CLO: clorofenicol; RIF: rifampicina; ERI: eritromicina.

As drogas linezolida e quinupristina / dalfopristina foram introduzidas na rotina diagnóstica do IAL a partir de 2002, e das 239 cepas analisadas, apenas 156 (65%) foram testadas para linezolida e 117 (49%) para quinupristina / dalfopristina. A linezolida teve uma eficácia de 99% entre as cepas, das quais apenas dois *E. faecium* apresentaram resistência. Ainda, foi verificada uma resistência de 44% dos enterococos em relação à droga quinupristina / dalfopristina, sendo que 100% das cepas da espécie *E. faecalis* foram resistentes enquanto 25% das cepas da espécie *E. faecium* apresentaram resistência para esta droga. O **Anexo 1** mostra o perfil de resistência das cepas analisadas para os antimicrobianos utilizados no monitoramento dos VREs.

### 4.3. Tipagem molecular por PFGE das cepas de VRE

A análise dos perfis moleculares obtidos pela técnica de PFGE realizada no presente estudo tomou como base a classificação feita por Zanella et al. (2003). Neste primeiro estudo a espécie *E. faecalis* foi classificada em 5 tipos moleculares (A1-8, B1 e B2, C, D, E) e *E. faecium* em 3 tipos (M1-14, N1-N2, O).

No atual estudo, as 143 cepas de *E. faecalis* foram tipadas pela técnica de PFGE e a análise do perfil eletroforético foi feita segundo os critérios estabelecidos por Tenover et al. (1995) conforme mostra a **Figura 10**. Esta análise identificou três tipos genéticos de *E. faecalis* denominados de A, B e D.

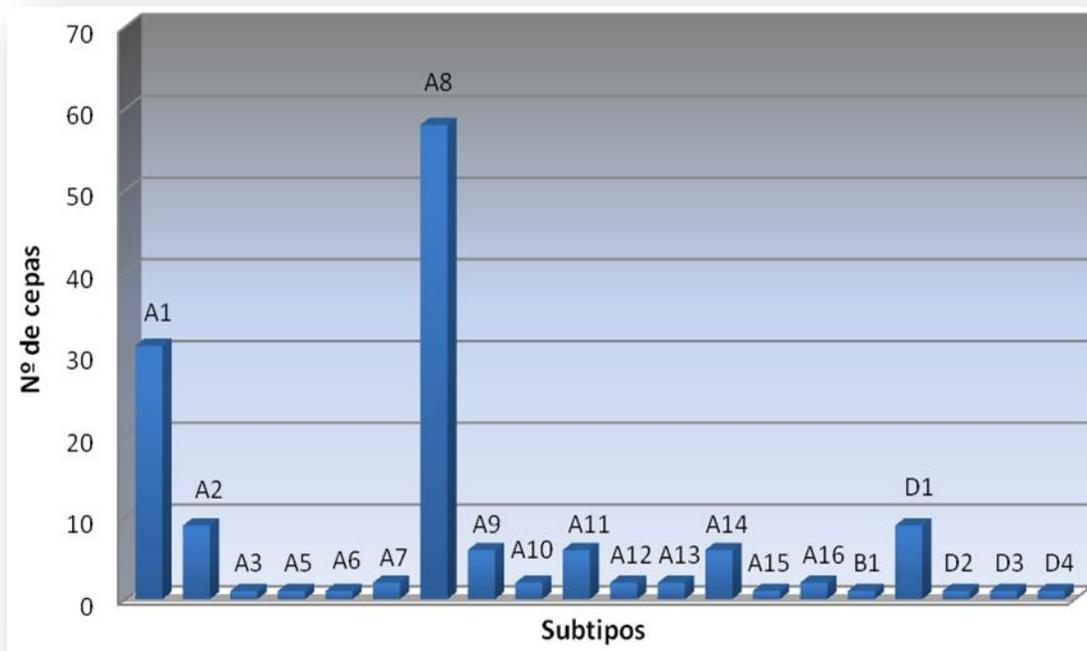
Na **Figura 11** pode-se observar a distribuição dos tipos e subtipos encontrados. O tipo genético A apresentou 15 subtipos (A1-3, A5-16), com o predomínio do subtipo A8 representado por 58 cepas (41%), seguido pelo subtipo A1 com 31 cepas (22%). O subtipo B1 foi representado por um único isolado e entre as cepas do tipo D foram reconhecidos quatro subtipos (D1-4).

Na **Tabela 4**, observa-se a distribuição dos tipos e subtipos caracterizados entre as cepas de *E. faecalis* com relação ao período estudado, de 1999 a 2008. Os três tipos genéticos A, B e D de *E. faecalis* estão representados por 130 (91%), uma (0,7%) e 12 (8,3%) cepas, respectivamente. Pode-se observar que o subtipo A8 está presente em todos os anos e o A1 só não foi encontrado em 2008, já os outros subtipos foram surgindo no decorrer do período avaliado.



**Figura 10:** Perfis eletroforéticos de amostras de *E. faecalis* digeridas com a enzima de restrição SmaI obtidos por PFGE.

**Legenda:** 1-3, 14-16 e 27-30: marcador de peso molecular padrão; 4: subtipo A1; 5: subtipo A2; 6: subtipo A3; 7: subtipo A5; 8: subtipo A6; 9: subtipo A7; 10: subtipo A8; 11: subtipo A9; 12: subtipo A10; 13: subtipo A11; 17: subtipo A12; 18: subtipo A13; 19: subtipo A14; 20: subtipos A15; 21: subtipos A16; 22: subtipo B1; 23: subtipo D1; 24: subtipo D2; 25: subtipo D3; 26: subtipo D4.

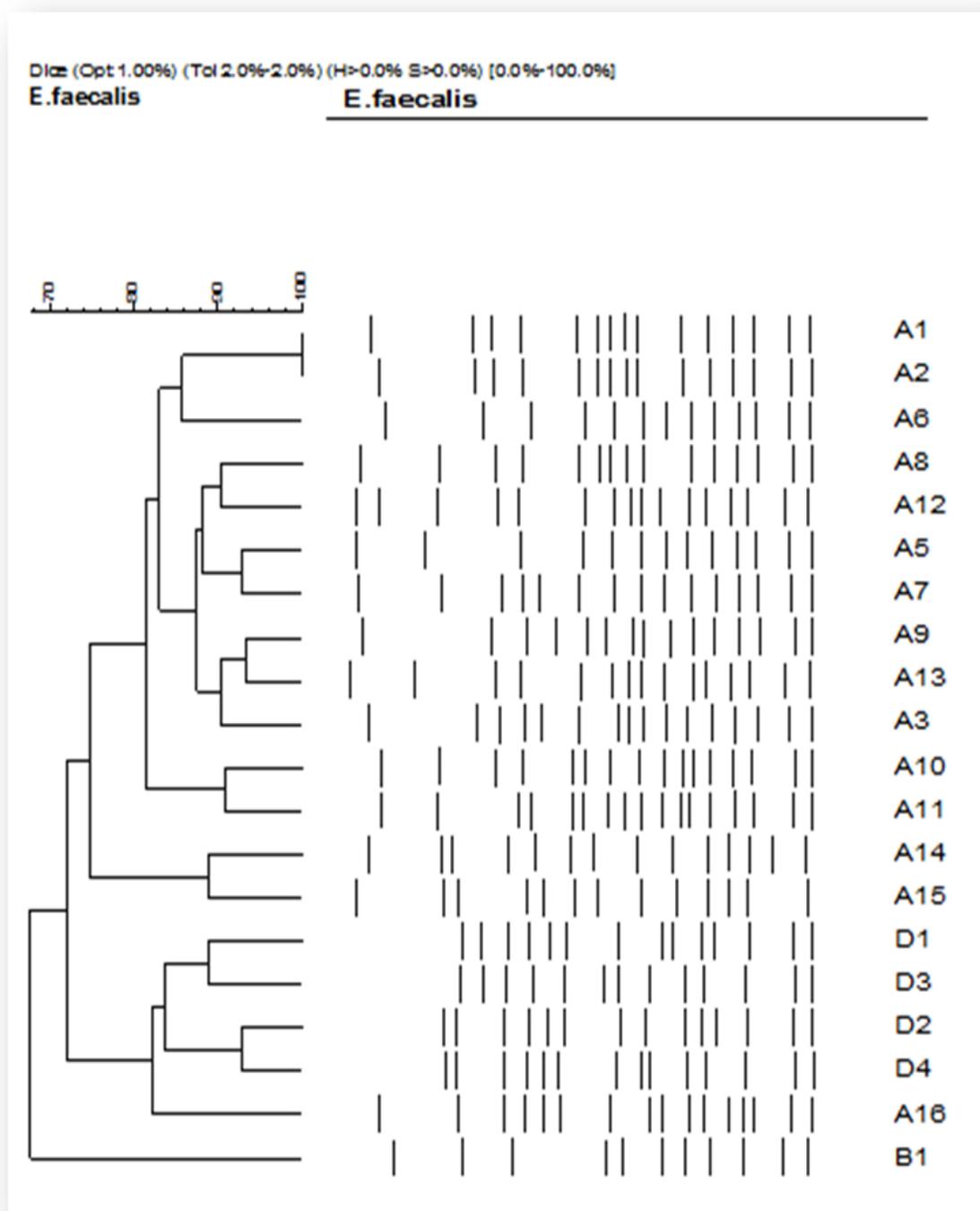


**Figura 11:** Distribuição das 143 cepas de *E. faecalis* segundo os tipos e subtipos genéticos caracterizados pelo PFGE.

**Tabela 4:** Distribuição anual dos tipos e subtipos de *E. faecalis* caracterizados por PFGE, no período de 1999-2008.

Subtipos	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	n (%)
A1	4	6	5	7	2	1	2	2	2		31 (22)
A2			1	3		2	1	1	1		9 (6)
A3							1				1 (0,75)
A5				1							1 (0,75)
A6						1					1 (0,75)
A7						1	1				2 (1,4)
A8	1	3	5	10	10	15	4	3	3	4	58 (41)
A9		1				1	1	3			6 (4)
A10			1			1					2 (1,4)
A11						1	3	2			6 (4)
A12			1				1				2 (1,4)
A13			1			1					2 (1,4)
A14							1			5	6 (4)
A15										1	1 (0,75)
A16							2				2 (1,4)
B1				1							1 (0,75)
D1				1	1	1			4	2	9 (6)
D2								1			1 (0,75)
D3										1	1 (0,75)
D4										1	1 (0,75)
<b>n (%)</b>	<b>5 (4)</b>	<b>10 (7)</b>	<b>14 (10)</b>	<b>23 (16)</b>	<b>13 (9)</b>	<b>25 (17)</b>	<b>17 (12)</b>	<b>12 (8)</b>	<b>10 (7)</b>	<b>14 (10)</b>	<b>143 (100)</b>

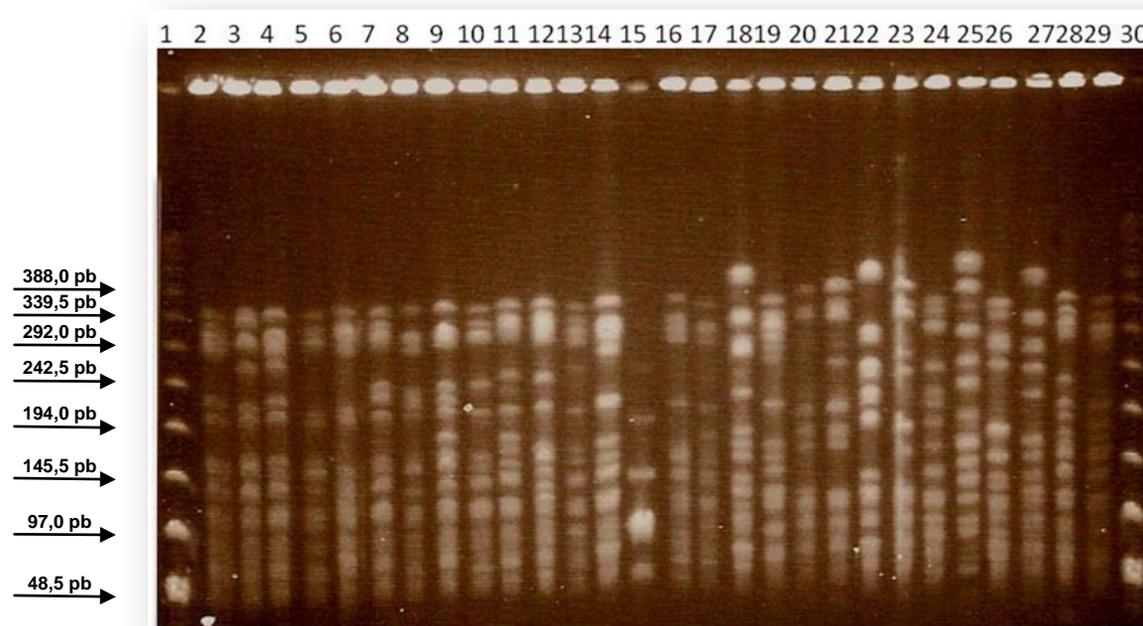
A **Figura 12** mostra um dendrograma construído a partir da análise de similaridade de bandas entre os tipos, A, B, D e subtipos correspondentes, identificados na espécie de *E. faecalis*, obtidas na tipagem molecular realizada pelo PFGE. Pela análise do dendrograma, pode-se observar que o tipo genético B apresentou 67% de similaridade com relação ao tipo A e o tipo D 72%. Entre os subtipos identificados no tipo A, foi encontrada uma similaridade genética que variou de 75 a 100% e entre esses se identificou um grupo com maior similaridade representado por 12 subtipos (A1, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12 e A13), apresentando de 82 a 100% de similaridade entre eles. Os dois subtipos mais frequentes, A1 e A8, apresentaram 83% de similaridade entre eles. Entretanto, o subtipo A16 classificado visualmente pelo critério de Tenover, quando analisado pelo programa Bionumerics, apresentou uma menor similaridade genética entre os subtipos do tipo A, que foi de 72%, e este subtipo se mostrou mais relacionado com as cepas do tipo D, apresentando 84% de similaridade entre elas.



**Figura 12:** Dendrograma com o resultado da análise de similaridade de bandas dos tipos e subtipos genéticos caracterizados entre cepas de *E. faecalis* resistentes à vancomicina.

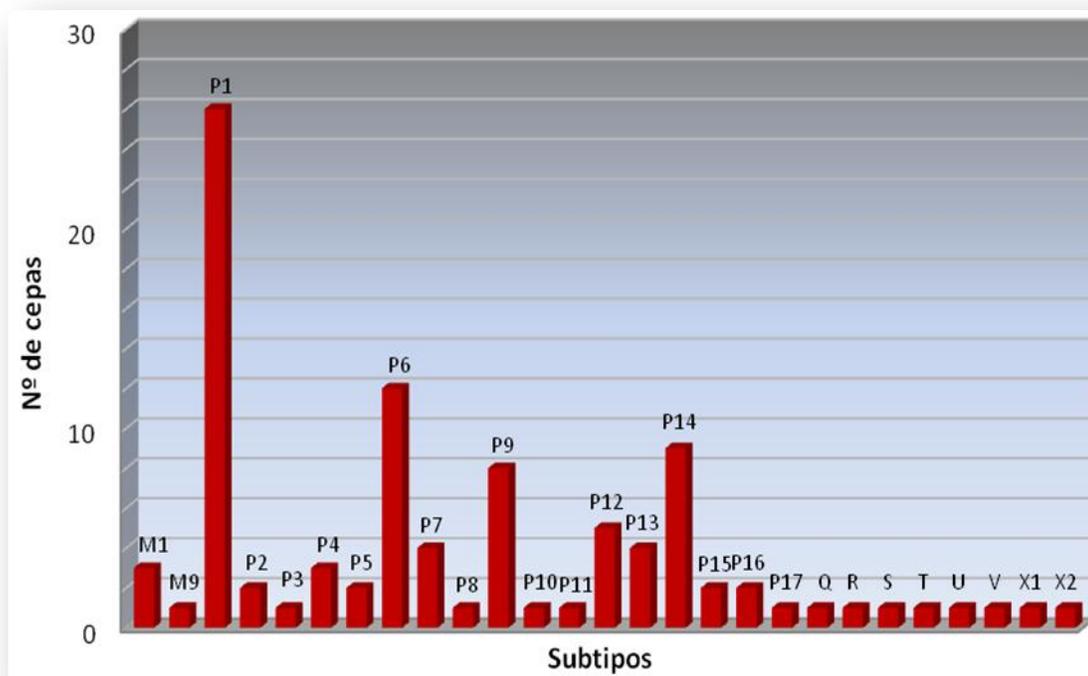
Conforme demonstrado na **Figura 13**, as 96 cepas de *E. faecium* foram classificadas em nove tipos genéticos denominados M, P, Q, R, S, T, U, V, X e seus subtipos correspondentes segundo os critérios de Tenover et al. (1995). A **Figura 14** mostra a distribuição dos tipos e subtipos caracterizados para a espécie de *E. faecium*. O tipo M é representado por quatro isolados divididos em dois subtipos (M1 e M9). O tipo P, com 84 cepas, foi classificado em 17 subtipos (P1-17) com o predomínio dos subtipos P1 representado por 26 cepas e P6 por 12 cepas. Os tipos Q, R, S, T, U e V são representados por uma cepa cada um e o tipo X foi classificado em dois subtipos (X1 e X2), com uma cepa cada um.

A **Tabela 5** mostra a distribuição dos tipos e subtipos genéticos caracterizados entre as cepas de *E. faecium* durante o período de 1999 a 2008. Entre os nove tipos classificados, o tipo P apresentou uma maior frequência, 87,5% (n=84 cepas). E os subtipos de *E. faecium* estão distribuídos na maioria nos últimos quatro anos, com predominância dos subtipos P1 e P6.



**Figura 13:** Perfis eletroforéticos de amostras de *E. faecium* digeridas com a enzima de restrição *SmaI* obtidos por PFGE.

**Legenda:** 1, 15 e 30: marcador de peso molecular padrão; 2: subtipo P1; 3: subtipo P2; 4: subtipo P3; 5: subtipo P4; 6: subtipo P5; 7: subtipo P6; 8: subtipo P7; 9: subtipo P8; 10: subtipo P9; 11: subtipo P10; 12: subtipo P11; 13: subtipo P12; 14: subtipo P13; 16: subtipos P14; 17: subtipos P15; 18: subtipo P16; 19: subtipo P17; 20: subtipo M9; 21: subtipo M1; 22: tipo Q; 23: tipo R; 24: tipo S; 25: tipo T; 26: tipo U; 27: tipo V; 28: subtipo X1; 29: subtipo X2.



**Figura 14:** Distribuição das 96 cepas de *E. faecium* segundo os tipos e subtipos genéticos caracterizados pelo PFGE.

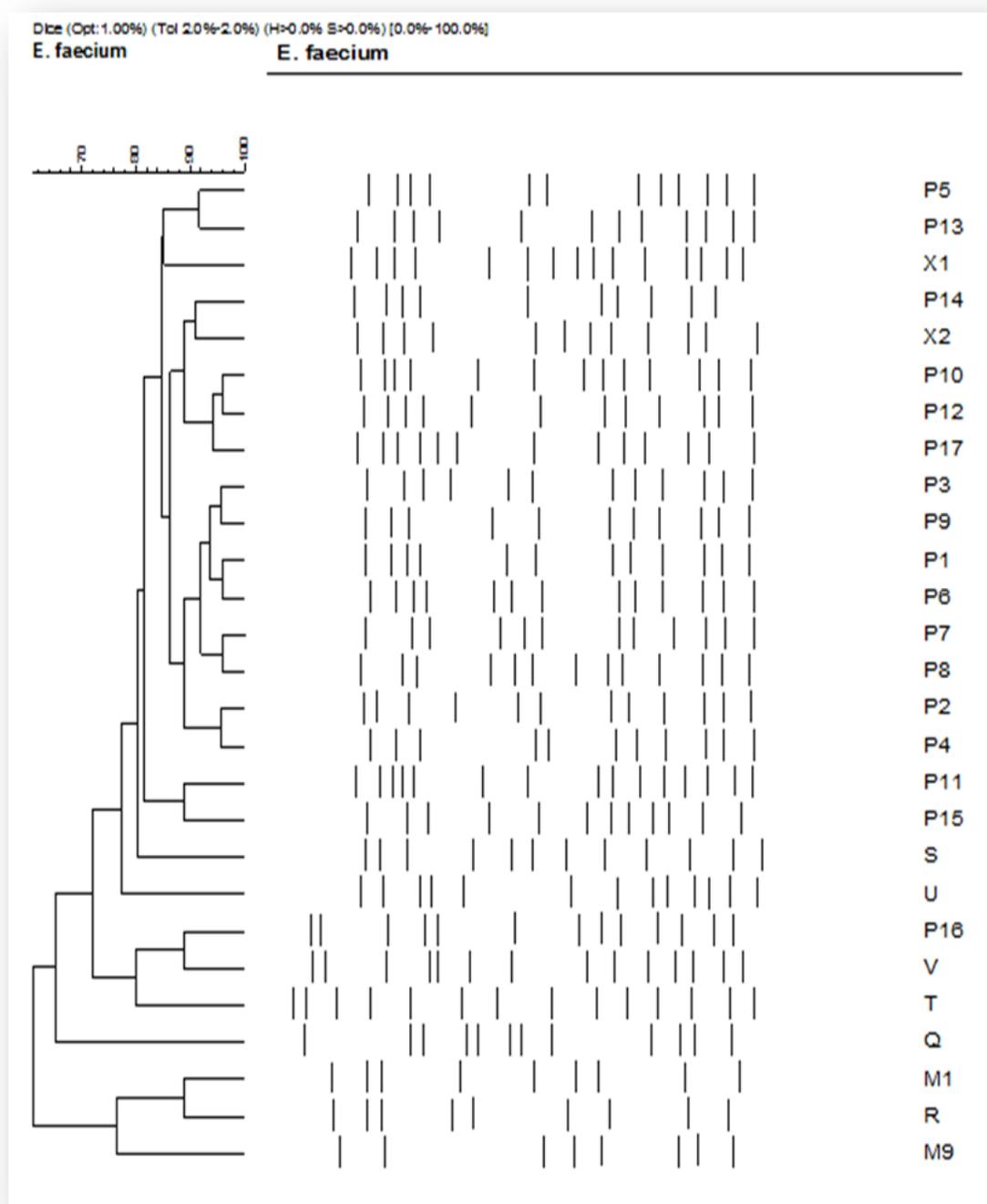
**Tabela 5:** Distribuição anual dos tipos e subtipos de *E. faecium* caracterizados por PFGE, no período de 1999-2008.

Subtipos	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	n (%)
M1	2						1				3 (3)
M9		1									1 (1)
P1							2	6	6	12	26 (28)
P2									1	1	2 (2)
P3									1		1 (1)
P4									3		3 (3)
P5								2			2 (2)
P6								5	5	2	12 (13)
P7							1		1	2	4 (4)
P8									1		1 (1)
P9							1	2	2	3	8 (8)
P10									1		1 (1)
P11									1		1 (1)
P12								2	1	2	5 (5)
P13								2	1	1	4 (4)
P14									4	5	9 (10)
P15									2		2 (2)
P16								1	1		2 (2)
P17								1			1 (1)
Q								1			1 (1)
R		1									1 (1)
S										1	1 (1)
T								1			1 (1)
U	1										1 (1)
V									1		1 (1)
X1										1	1 (1)
X2										1	1 (1)
<b>n (%)</b>	<b>3 (3,5)</b>	<b>2 (2,5)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5 (5)</b>	<b>23 (24)</b>	<b>32 (33)</b>	<b>31 (32)</b>	<b>96 (100)</b>

A **Figura 15** mostra um dendrograma construído a partir da análise de similaridade de bandas entre os tipos, M, P, Q, R, S, T, U, V e X e subtipos correspondentes, identificados na espécie de *E. faecium*, obtidas na tipagem molecular realizada pelo PFGE. Pela análise do dendrograma, o tipo Q apresentou 65% de similaridade entre o tipo P, assim como, o tipo R apresentou 61% de similaridade, o tipo S 79%, o tipo T e V 72%, o tipo U 77%. Entretanto, o tipo X caracterizado visualmente pelos critérios de Tenover, apresentou uma alta similaridade com o tipo P quando analisado pelo dendrograma, apresentando 85% de similaridade entre eles.

Entre os 17 subtipos identificados no tipo P, foi encontrada uma similaridade genética que variou de 80 a 96% para um grupo representado por 16 subtipos do P1 ao P15 e P17, ficando o P16 fora deste grande grupo e que apresentou alta similaridade genética com o tipo V.

Os dois subtipos de maior frequência, P1 e P6, apresentaram 96% de similaridade entre eles.



**Figura 15:** Dendrograma com o resultado da análise de similaridade de bandas dos tipos e subtipos genéticos caracterizados entre cepas de *E. faecium* resistentes à vancomicina.

Ao considerarmos a procedência das cepas de VRE encaminhadas ao IAL no período estudado, as **Tabelas 6 e 7** mostram a distribuição dos tipos e subtipos genéticos caracterizados entre as cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* entre os hospitais.

O tipo A de *E. faecalis* predominou em 21 (81%) dos 26 hospitais e os subtipos A1 e A8 foram os que tiveram maior ocorrência, sendo detectados em 11 hospitais cada um. Entretanto, o subtipo A8 apresentou o maior número de cepas representantes entre os hospitais, destacando-se o Hospital 1 que apresentou 20 (21%) cepas deste subtipo. O tipo D ocorreu em sete hospitais com 12 cepas caracterizadas (**Tabela 6**).

Considerando-se a espécie *E. faecium*, o tipo P foi o mais representativo e o subtipo P1 foi o mais prevalente, ocorrendo em 10 (38%) hospitais, com 26 isolados caracterizados, seguido do subtipo P6 com 12 cepas distribuídas em 7 (27%) dos 26 hospitais (**Tabela 7**).

**Tabela 6:** Distribuição dos subtipos das 143 cepas de *E. faecalis* entre os 26 hospitais que enviaram cepas de VRE para o IAL no período de 1999 a 2008.

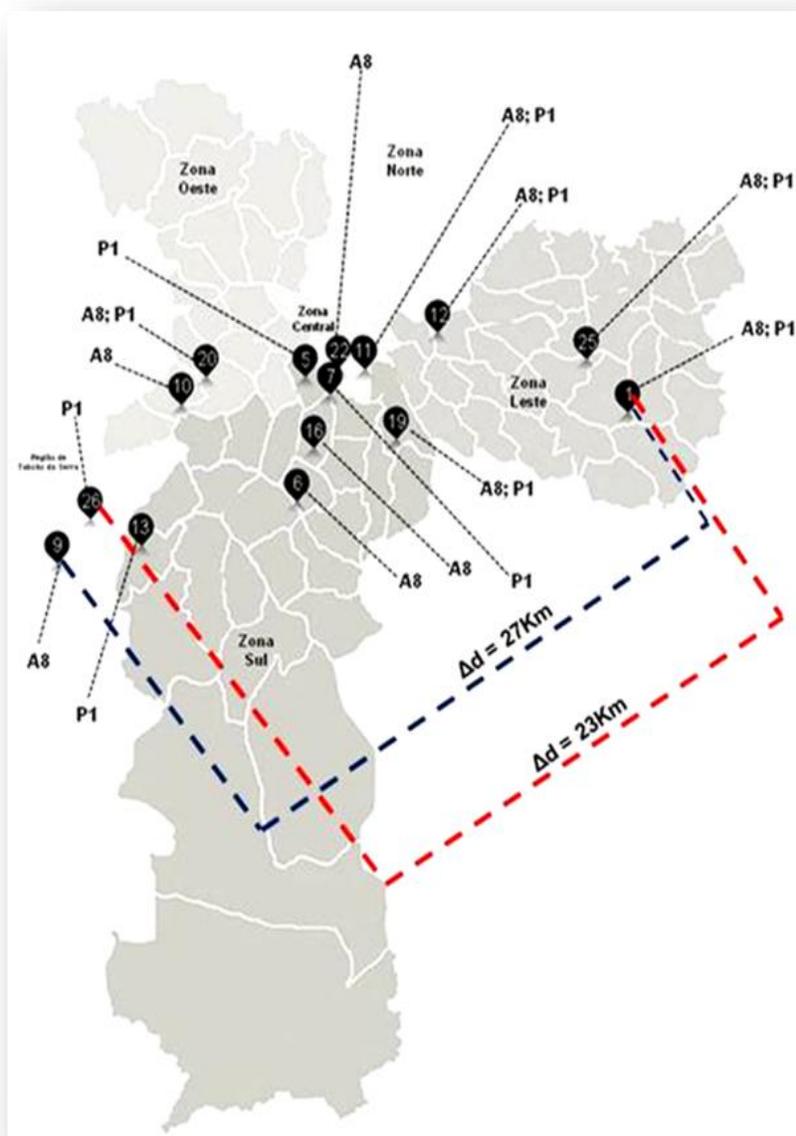
Hospitais	A1	A2	A3	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	B1	D1	D2	D3	D4	n (%)
1	9	4					20	1		3	1	1	4			1	1		1	1	47 (32)
2																					0
3																					0
4	2	1				1															4 (3)
5																					0
6							1														1 (0,8)
7	2																				2 (1,4)
8	3	1							1												5 (4)
9	2	1					4														7 (5)
10							1														1 (0,8)
11	7						6	2						1							16 (11)
12		2					5		1	1	1	1			2		1				14 (9)
13	2		1																		3 (2)
14	1																				1 (0,8)
15	1																				1 (0,8)
16				1			2										1				4 (3)
17								1													1 (0,8)
18	1				1																2 (1,4)
19							2			1							1				4 (3)
20							13						1				1				15 (10)
21	1																				1 (0,8)
22						1	2														3 (2)
23								1					1								2 (1,4)
24																					0
25							2	1		1								1			5 (4)
26																	4				4 (3)
T / %	31/22	9/6,2	1/0,7	1/0,7	1/0,7	2/1,4	58/41	6/4	2/1,4	6/4	2/1,4	2/1,4	6/4	1/0,7	2/1,4	1/0,7	9/6,2	1/0,7	1/0,7	1/0,7	143/100

**Tabela 7:** Distribuição dos tipos e subtipos das 96 cepas de *E. faecium* entre os 26 hospitais que enviaram cepas de VRE para o IAL no período de 1999 a 2008.

Hospital	M1	M9	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	Q	R	S	T	U	V	X1	X2	n (%)
1			5			1		4			2			2	2	3		1										20 (21)
2	2																											2 (2)
3																								1				1 (1)
4																												0
5		1	2												2							1						6 (6)
6																												0
7			2		1						1		1			4						1						10 (11)
8																												0
9																												0
10																									1			1 (1)
11			1														1											2 (2)
12			1								1																	2 (2)
13			1								2																	3 (3)
14																												0
15																												0
16																												0
17																							1					1 (1)
18							2	1	1		1	1							1									7 (7)
19			7	1				1	1	1	1						1											13 (14)
20	1		4	1		2		1	2					1												1		13 (14)
21																												0
22																2												2 (2)
23																												0
24								3						1														4 (4)
25			2					1									1		1									5 (5)
26			1					1						1												1		4 (4)
T / %	3/3	1/1	26/28	2/2	1/1	3/3	2/2	12/14	4/4	1/1	8/8	1/1	1/1	5/5	4/4	9/9	2/2	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	96/100

Na **Figura 16** observa-se a distribuição do subtipo A8, o mais frequente entre as cepas de *E. faecalis*, nos hospitais: 1, 6, 9, 10, 11, 12, 16, 19, 20, 22 e 25 e do subtipo P1, o mais frequente entre as cepas de *E. faecium* nos hospitais: 1, 5, 7, 11, 12, 13, 19, 20, 25 e 26. O maior deslocamento observado entre os hospitais que identificaram as cepas do subtipo A8 foi de 27Km (Hospital 1 e 9, localizados na zona leste do município de São Paulo e na região de Taboão da Serra, respectivamente). Para o subtipo P1, os Hospitais 1 e 26 que apresentaram este tipo genético e se localizavam mais distantes, 23Km de distância.

No **Anexo 1** pode-se visualizar as características individuais das 239 cepas, segundo sítio de isolamento, perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, tipo genético e distribuição por hospital.



**Figura 16:** Distribuição geográfica dos subtipos de maior frequência, A8 para cepas de *E. faecalis* e P1 para *E. faecium*, entre os hospitais que encaminharam cepas de VRE para o IAL no período de 1999-2008.

**Legenda:** Δd: deslocamento (Km).

## 5. DISCUSSÃO

Historicamente, os enterococos e aproximadamente outras 450 espécies de bactérias fazem parte da microbiota normal do trato gastrointestinal (Moore e Holdeman, 1974). Até os anos de 1970, os enterococos eram considerados bactérias de baixa relevância clínica. No entanto, após duas décadas, a importância crescente desta bactéria foi decorrente da identificação de cepas multirresistentes aos antimicrobianos e do aumento de sua incidência nas infecções hospitalares (Murray, 1990).

Nos últimos 15 anos, o VRE emergiu como um importante agente de infecção relacionado à assistência a saúde em diversas partes do mundo. No Brasil, o isolamento de VRE não havia sido relatado até 1996, quando na cidade de Curitiba, no Estado do Paraná, foi identificada a primeira cepa de *E. faecium* com fenótipo VanD4 resistente à vancomicina (Costa et al., 1998).

Em 1996, iniciou-se um estudo colaborativo entre o Hospital Santa Marcelina e o Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, de monitoramento das amostras de *Enterococcus* spp isoladas neste hospital. Em junho de 1997, foi identificada a primeira cepa de *E. faecium* resistente à vancomicina com fenótipo VanA, de uma paciente com sorologia positiva para HIV e com quadro clínico de meningite (Zanella et al., 1999). A partir de maio de 1998, novas cepas de VRE passaram a ser isoladas de casos de infecções deste hospital, fato que levou a um estudo de colonização para identificação de pacientes portadores de VRE no trato gastrointestinal para caracterização do 1º surto de VRE do Brasil. Neste surto, os enterococos foram classificados genotipicamente pela técnica de PFGE e esta classificação foi utilizada como base para o presente estudo.

Desde então, o Instituto Adolfo Lutz passou a receber amostras de VRE para caracterização fenotípica e genotípica. Em um período de 10 anos, foram recebidas 1.513 cepas de *Enterococcus* spp confirmadas quanto a presença do

gene *vanA* pelo PCR e fenótipo VanA por meio do teste de sensibilidade aos antimicrobianos. As cepas foram isoladas de pacientes assistidos em hospitais da rede pública e privada do Estado de São Paulo.

Estudos mostraram que a incidência de pacientes colonizados em um hospital é 10 vezes maior que a de infectados, contribuindo assim para a transmissão a outros pacientes (Montecalvo et al., 1995; Furtado et al., 2005).

Os pacientes infectados e/ ou colonizados por VRE são causas de grande preocupação em um ambiente hospitalar, devido ao pequeno número de tratamentos alternativos disponíveis e por estas infecções enterocócicas acometerem preferencialmente pacientes debilitados. Estas manifestações geralmente estão relacionadas à assistência em saúde, seja em hospitais ou em casas de repouso (Deshpande et al., 2007).

Entretanto, devido ao grande número de cepas recebidas neste período de 10 anos pelo IAL, para realização deste estudo foi selecionada uma amostragem de VRE isoladas de materiais clínicos invasivo de pacientes, com o objetivo de mapear os perfis genéticos das cepas circulantes entre os hospitais analisados. A tipagem molecular permitiu investigar a presença de uma ou mais linhagens bacterianas, confirmando uma disseminação intra e inter-hospitalar.

Na literatura mundial, de um modo geral, as infecções enterocócicas em humanos são frequentemente causadas por duas espécies: *E. faecalis* em 80% a 90% dos casos e *E. faecium* em 5 a 10% (Murray et al., 2007). O mesmo foi verificado em estudos brasileiros, como os realizados por Hörner et al. (2005) e por Bender et al. (2009), que analisaram hospitais localizados na região sul do Brasil, nos quais também se observou uma maior frequência da espécie *E. faecalis* sobre o *E. faecium*. No Hospital Universitário de Santa Maria no Rio Grande do Sul, de junho de 2003 a agosto de 2004, os percentuais achados para as duas espécies foram de 85% e 6%, respectivamente (Hörner et al., 2005). Em 2008, dois hospitais de Porto Alegre/RS identificaram 203 cepas de enterococos, sendo 93% de *E. faecalis* e 6% de *E. faecium* (Bender et al.,

2009). Em um estudo do programa SENTRY sobre a frequência de *Enterococcus* spp em 10 anos na América Latina, as duas espécies, *E. faecalis* e *E. faecium*, apresentaram percentuais de isolamento semelhantes, de 78,2% e 12,7%, respectivamente (Gales et al., 2008). Em outro estudo realizado por Mutnick et al. (2003) no programa SENTRY, durante os anos de 1997-2000 a proporção de isolamento entre as espécies de *E. faecalis* e *E. faecium* na América Latina foi de 17:1.

Entretanto, quando se refere às infecções enterocócicas causadas por VRE, esta proporção diminui, havendo uma substituição pelo *E. faecium*, que apresenta uma predominância entre as espécies isoladas. Em países da Europa e nos Estados Unidos, a principal espécie responsável pela aquisição de enterococos resistentes à vancomicina é o *E. faecium*, enquanto relatos por *E. faecalis* ainda são raros (Schouten et al., 2000; Willems et al., 2005; Werner et al., 2008).

Apesar da espécie *E. faecium* estar mais frequentemente associada às cepas de VRE isoladas nos diferentes surtos ocorridos nos Estados Unidos e Europa, no Brasil pode-se observar o predomínio de *E. faecalis*, de acordo com estudos realizados por Caiaffa Filho et al. e Zanella et al. em 2003.

Em uma análise total do período de 10 anos (1999-2008), das cepas de VRE caracterizadas neste estudo, pode-se verificar uma maior frequência de *E. faecalis* (67%) em relação ao *E. faecium* (33%). Entretanto, na análise da dinâmica desta frequência neste período, ano a ano, pode-se confirmar ainda, uma predominância de *E. faecalis* nos primeiros sete anos estudados. Porém, em 2006, conforme mostra a **Figura 6**, observa-se um aumento da frequência de *E. faecium* resistente à vancomicina (VRE-EFM) em relação ao *E. faecalis* resistente à vancomicina (VRE-EF) e a partir de 2007, ocorre uma inversão em que a predominância de VRE-EFM se destaca sobre o VRE-EF.

O aumento da frequência de VRE-EFM sobre VRE-EF foi também verificado em outros estudos desenvolvidos no Brasil. D'Azevedo et al. (2008) realizaram um estudo nas quatro maiores UTIs de São Paulo em fevereiro de

2006 e constataram que das 37 amostras positivas para VRE, 54,1% estavam relacionadas ao *E. faecium* e 45,9% para o *E. faecalis*. Gales et al. (2008) observaram um aumento no número de isolados de VRE-EFM nos anos de 2005 e 2006, durante o estudo de vigilância do programa SENTRY da América Latina que incluiu alguns hospitais de São Paulo. Portanto, estes dados fortalecem a hipótese de que o VRE-EFM pode estar emergindo no Brasil, principalmente em hospitais da cidade de São Paulo.

Desse modo, ao analisar os dados obtidos nos estudos acima citados e com os obtidos nesta atual investigação, observa-se que diferenças na prevalência das espécies de VRE podem ocorrer. É importante ressaltar que a microbiota intestinal de pacientes hospitalizados por longos períodos sofre modificação.

De acordo com a literatura, a urina é a principal fonte para o isolamento de enterococos, seguido pelo sangue (Moellering Jr, 1992; Shepard e Gilmore, 2002). Em um estudo realizado por Hörner et al. (2005), em um Hospital Universitário de Santa Maria no Rio Grande do Sul, observou-se que de 233 cepas de enterococos, 77 (33%) eram isoladas de urina e 18 (8%) de hemocultura. No entanto, em estudo realizado por D'Azevedo et al. (2004), os enterococos foram mais frequentemente isolados de urina (70,3%) e secreções em geral como de feridas, secreção abdominal, orofaringe e outras secreções e fluidos corpóreos, perfazendo assim um total de 20,7%.

Entre as 239 cepas de VRE isoladas de casos de infecção que foram selecionadas neste estudo para a análise do perfil molecular, a urina destacou-se como a principal fonte de isolamento (45%), seguida de sangue (34%) e de líquidos cavitários (21%). Estes dados também foram observados por Quiñones et al., 2005 em amostras clínicas de hospitais cubanos, onde foi verificado que 34% eram provenientes de urina e 19% do sangue. Entre os VRE avaliados pelo programa SENTRY (2007), provenientes dos Estados Unidos e Europa, 36,7% foram de VRE isolados a partir do trato urinário e 28% da corrente sanguínea (Deshpande et al., 2007). Os dados apresentados nestes estudos

corroboram com os achados desta investigação, uma vez que a maioria das infecções causadas por VRE foi urinária e sanguínea. Portanto, todos estes dados evidenciam o papel preponderante dos enterococos como patógeno urinário independente da resistência à vancomicina.

As cepas de VRE recebidas durante este período de 10 anos, foram confirmadas quanto ao genótipo de resistência à vancomicina pela técnica da PCR, sendo todas *vanA* e acompanhadas pelo fenótipo de resistência para vancomicina e teicoplanina. No entanto, durante este estudo, verificaram-se que três cepas de *E. faecalis* do tipo A isoladas do Hospital 1 apresentaram discrepância entre fenótipo e genótipo, ou seja, cepas com fenótipo VanB e genótipo *vanA* (**Anexo 1**). Neste período, Zanella et al. (2006) já havia relatado duas cepas de VRE-EF com este tipo de característica, o que enfatiza a importância do monitoramento das cepas de VRE isoladas no Brasil.

No Brasil até o presente momento, não foi descrito a ocorrência de cepas com o genótipo *vanB*, que vem sendo relatada na literatura internacional também como responsável por surtos hospitalares (McGregor e Young, 2000; Kawalec et al., 2001).

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi determinado pela técnica da concentração inibitória mínima (CIM) para 12 antimicrobianos, segundo critérios estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). A múltipla resistência dos enterococos aos antimicrobianos preocupa a classe médica, principalmente, porque esta bactéria está relacionada com a infecção hospitalar. A habilidade dos enterococos em adquirir novas características de resistência, como alta resistência aos aminoglicosídeos,  $\beta$ -lactâmicos e aos glicopeptídeos, reflete em dificuldades terapêuticas.

A resistência dos enterococos às penicilinas se deve a dois mecanismos diferentes: produção de enzimas  $\beta$ -lactamases e a alterações nas *Penicillin-binding proteins* (PBPs). A primeira cepa de *E. faecalis* produtora de  $\beta$ -lactamases foi isolada em 1981 nos Estados Unidos, sendo, posteriormente, isolada na Argentina e no Líbano (Murray, 1992). A resistência resultante da

produção desta enzima é rara, normalmente mediada por plasmídeo e podendo estar associada com alto nível de resistência à gentamicina (Murray, 1992; Aslangul et al., 2005).

A resistência adquirida aos  $\beta$ -lactâmicos ocorre na maioria das vezes por alterações das PBPs, conferindo um nível de resistência maior que o encontrado na resistência intrínseca, o que é comum entre os enterococos, especialmente em cepas de *E. faecium* (Fontana et al., 1990; Grayson et al., 1991).

Até o ano de 2006, segundo o CLSI, os resultados obtidos para a ampicilina ou penicilina poderiam ser usados para prever resistência às demais penicilinas. Todavia, em 2007, os critérios foram alterados, pois começaram se identificar amostras de enterococos com um fenótipo não usual, sensibilidade à ampicilina e resistência à penicilina, cujo mecanismo genotípico ainda precisa ser mais bem esclarecido. O primeiro estudo, descrito na literatura, que demonstrou a disseminação de amostras de *E. faecalis* com fenótipo de sensibilidade à ampicilina e resistência à penicilina no ambiente hospitalar, foi publicado em 2005, no qual pesquisadores da Grécia relataram que, 31,4% das cepas de *E. faecalis*, apresentavam resistência à penicilina e ao imipenem, mas sensíveis à ampicilina (Metzidie et al., 2005). Portanto a penicilina nestes casos não é boa para avaliar a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, diferentemente da ampicilina, que quando os enterococos apresentam-se resistentes a este antibiótico, também são resistentes a penicilina.

No IAL, a análise de sensibilidade dos enterococos aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos é dada por meio da ampicilina. Neste estudo, as cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* apresentaram um alto padrão de resistência aos antimicrobianos. A resistência a ampicilina para o *E. faecium* foi de 100%, enquanto que o *E. faecalis* apresentou 9%, resultados muito semelhantes aos encontrados por Zanella et al. (2003) que identificaram 100% e 14% de resistência, respectivamente.

Segundo Shepard et al. (2002) e Centinkaya et al. (2000), os *E. faecium*

são 4 a 16 vezes mais resistentes aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos que os *E. faecalis*. Desse modo, o *E. faecium* possui um padrão de resistência maior do que o *E. faecalis* e conseqüentemente, resulta em maior dificuldade no tratamento das infecções graves por esta espécie (Deshpande et al., 2007)

As cepas VRE-EFM, além de possuírem resistência a ampicilina, que é um importante marcador fenotípico, carregam genes de proteínas de superfície (*esp*) e hialuronidase (*hyl*) relacionados à virulência deste gênero e que são encontrados em surtos nosocomiais de várias partes do mundo (Deplano et al., 2007; Werner et al., 2008). Recentes estudos genéticos de VRE-EFM relacionados a infecções hospitalares no mundo mostram que fazem parte de uma mesma linhagem pertencente ao complexo clonal denominada CC17 (Arias et al., 2009). Supõe-se que este complexo clonal seja responsável pela mudança das infecções causadas por *E. faecalis* para *E. faecium*. Esta inversão representa uma forte preocupação, pois o *E. faecium* está mais habitualmente associado à resistência a vancomicina do que o *E. faecalis* (Rice, 2001).

Pelo fato do *E. faecium* apresentar uma maior resistência intrínseca e/ou adquirida a muitos agentes antimicrobianos, principalmente aos glicopeptídeos, um estudo realizado por Chou et al. (2008) com pacientes com bacteremia causada por VRE-EFM mostrou ter um grave prognóstico, principalmente em imunodeprimidos.

De modo inverso, 99% das cepas analisadas apresentaram sensibilidade a linezolida, indicando que esse antimicrobiano continua sendo uma opção terapêutica adequada no tratamento das infecções por VRE. Elevadas taxas de suscetibilidade a este antimicrobiano são semelhantes aos encontrados em outros países (Meka e Gold, 2004; Gales et al., 2008). Apesar de ter sido verificado apenas duas cepas de *E. faecium* resistente a linezolida neste estudo, já foram relatados outros casos na cidade de São Paulo, a primeira amostra relacionada à espécie *E. faecalis*, isolada em 2006 (Guimarães et al., 2007) e a segunda ao *E. faecium*, isolada em 2009 (Girardello et al., 2009).

A avaliação da atividade *in vitro* da quinupristina/dalfopristina neste estudo, verificou que os enterococos apresentaram 44% de resistência para esta droga, sendo que 100% das cepas da espécie *E. faecalis* foram resistentes enquanto, 25% de *E. faecium* foram resistentes. É importante ressaltar que o *E. faecalis* é intrinsecamente resistente a quinupristina/dalfopristina, entretanto este antibiótico tem sido usado com bons resultados para tratar infecções ocasionadas pelo *E. faecium*, principalmente como uma opção na substituição do uso de glicopeptídeos (Hallgren et al., 2001). No entanto, alguns estudos descrevem o surgimento de resistência crescente nesta espécie sendo que Mendes et al. (2002) e Jones et al. (1998), encontraram 30% e 51% dos *E. faecium* resistente a quinupristina/dalfopristina respectivamente.

Historicamente, relatos de enterococos com alto nível de resistência à estreptomicina foram primeiramente relatados em 1970 e a partir de então, o reconhecimento da resistência a este antibiótico favoreceu o uso da gentamicina na terapia combinada com a penicilina e a vancomicina, para casos de infecção grave (Moellering Jr et al., 1970). No entanto, no final da década de 1970, foi isolada na França a primeira cepa de *E. faecalis* com alto nível de resistência à gentamicina (Horodniceanu et al., 1979), e desde então, a resistência desta espécie a este antibiótico tornou-se prevalente.

Em relação à resistência aos aminoglicosídeos, o presente estudo mostrou que para o *E. faecalis* a resistência à gentamicina (97%) foi maior do que à estreptomicina (28%), enquanto que para o *E. faecium* foi encontrada uma maior resistência para a estreptomicina (85%) do que para a gentamicina (22%). Apesar do estudo de Zanella et al. (2003) ter observado um perfil de sensibilidade semelhante para o *E. faecalis* em relação aos antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos (99% para gentamicina e 22% para estreptomicina), o mesmo não foi verificado para o *E. faecium*, que apresentou 97% de resistência para a gentamicina e 10% para a estreptomicina.

No entanto, um estudo em cinco hospitais de Porto Alegre realizado por D'Azevedo et al. (2006) apresentou um menor percentual de resistência à

gentamicina e a estreptomicina: i) *E. faecalis*: 25,3% e 15,8%, respectivamente; ii) *E. faecium*: 38,4% para ambas as drogas. Entretanto, esta análise foi realizada com cepas de enterococos não VRE. Em outro estudo no norte da Índia com 51 cepas de enterococos isolados de crianças com diagnóstico de septicemia foi encontrado 68% dos isolados com alto nível de resistência a gentamicina (HLGR), 41% dos isolados alto nível de resistência a estreptomicina (HLSR) e mais de 95% foram sensíveis à vancomicina (Randhawa et al., 2004).

Para verificar diferenças significativas na resistência para alta concentração de aminoglicosídeos (HLAR) entre enterococos sensíveis à vancomicina (VSE) e resistentes à vancomicina (VRE), Yazgi et al. (2002) mostraram que a taxa HLAR para VRE foi duas vezes maior que no VSE, o que justifica o alto percentual de resistência para aminoglicosídeos obtido no presente estudo.

A importância da identificação de cepas resistentes aos elevados níveis de aminoglicosídeos, principalmente gentamicina e estreptomicina, está concentrado principalmente na limitação em alcançar resultados de sinergismo na associação com antibióticos que agem na parede celular ( $\beta$ -lactâmicos e glicopeptídeos). A falta deste efeito sinérgico, não ocorrerá ação bactericida dificultando muito o combate de infecções graves como endocardite e bacteremia (Shepard et al., 2002).

Entre as metodologias clássicas de tipagem fenotípica, a suscetibilidade aos antimicrobianos pela determinação da CIM, tem destaque no rastreamento de infecções por enterococos. Entretanto, métodos moleculares são necessários, pois permitem o conhecimento da genética das populações enterocócicas. Com este objetivo uma amostragem de cepas de VRE oriundas de 26 hospitais do município de São Paulo foi caracterizada pela técnica de PFGE. Através desta técnica, as cepas de VRE foram caracterizadas e os perfis genéticos foram discriminados nas duas espécies.

Neste estudo, entre as cepas de VRE-EF analisadas foram identificados

três dos cinco tipos moleculares caracterizados anteriormente por Zanella et al. (2003), sendo os tipos A, B e D. Entre cepas de VRE-EF novos subtipos foram identificados: A (A9-16) e D (D1-4). Os subtipos A4, B2 e os tipos C e E identificados no estudo anterior, não foram encontrados.

Este dado é interessante, visto que o estudo anterior envolveu cepas de um único hospital, onde se observou uma maior diversidade genética. Fato não verificado ao se estudar cepas de VRE-EF oriundas de diversos hospitais, mostrando certa clonalidade entre as cepas de *E. faecalis*.

Ao se comparar os tipos genéticos encontrados nos dois estudos, pode-se evidenciar que o tipo A se mantém predominante entre as cepas de VRE-EF, sendo representado por 91% das cepas estudadas. Entretanto, a análise da frequência dos subtipos encontrados, revelou um predomínio do subtipo A8 (41%) sobre o A1 (22%) neste novo período. Estes dois subtipos possuem uma alta similaridade genética (83%) evidenciada pela análise do dendrograma, indicando assim, a ocorrência da disseminação através de um ancestral comum.

O dendrograma gerado pelos tipos e subtipos de *E. faecalis* caracterizados neste estudo, além de ter possibilitado avaliar o percentual de similaridade genética dos perfis moleculares, se mostrou de acordo com a classificação estabelecida por Tenover et al. (1995). Os tipos A, B, D e seus subtipos correspondentes apresentaram-se geneticamente correlacionados pela análise do dendrograma, com exceção do subtipo A16 que foi excluído do tipo A. A similaridade genética entre os subtipos do tipo A variou de 75 a 100%.

Entre as cepas de *E. faecium* estudadas, apenas um tipo genético (M) caracterizado anteriormente foi identificado neste período e outros oito novos tipos foram caracterizados: P, Q, R, S, T, U, V e X. O fato da menor frequência de isolamento de VRE-EFM no período anterior justifica um menor número de tipos genéticos caracterizados. Entretanto, esta maior diversidade genética encontrada entre as cepas de VRE-EFM pode ser justificada por este estudo avaliar cepas isoladas de diferentes hospitais ou por esta espécie apresentar

uma característica policlonal.

Entretanto, dos nove tipos caracterizados entre as cepas de VRE-EFM, o tipo P se destaca por ter representado 87,5% das cepas estudadas e o subtipo P1 por ter apresentado a maior frequência (28%) dentre os 17 subtipos identificados.

Os perfis moleculares de *E. faecium* geraram um dendrograma mais heterogêneo devido a maior diversidade genética caracterizada entre estas cepas. No dendrograma observa-se duas divergências entre a classificação realizada segundo os critérios de Tenover e o programa Bionumerics: i) o tipo X, que visualmente foi classificado como um novo tipo e que, pelo programa de computador foi correlacionado aos subtipos do tipo P; ii) o subtipo P16 apresentou uma similaridade genética menor que 80% com relação ao tipo P, que apresentou 80 a 96% de similaridade entre os seus subtipos.

Um estudo epidemiológico de VRE foi realizado em um grande hospital terciário no norte da Itália e foram identificados 41 isolados de *E. faecium* e oito de *E. faecalis* no período de 1993-1996. Os padrões de PFGE obtidos de 29 isolados de *E. faecium* eram indistinguíveis ou estreitamente relacionados. Destes, 26 foram isoladas de pacientes no departamento de hematologia do hospital (Scagnelli et al., 2001).

Em outro estudo semelhante de tipagem molecular de enterococos, Stampone et al. (2005) classificaram a espécie *E. faecium* em 4 tipos (1-4). O tipo 1 foi encontrado em 28 isolados e abrangeu 14 diferentes subtipos (1.1-1.14) durante um período de três anos em 18 hospitais. Para o *E. faecalis* foi encontrada uma maior variabilidade genética em sete tipos diferentes (A a G). O tipo E, presente em dois isolados que tinham perfis idênticos, foram obtidos em diferentes hospitais.

Como se pode observar, cada investigação pode apresentar uma dinâmica de disseminação, autores discutem que a prevalência de uma cepa de VRE única sugere uma transmissão hospitalar dentro e entre as unidades hospitalares e que possivelmente ocorre através dos profissionais da saúde e

através do ambiente hospitalar (Handwerger et al., 1993; Korten E Murray, 1993). Por outro lado, a ocorrência de múltiplas cepas de VRE no hospital indica a presença de múltiplos reservatórios que podem ter como origem a importação da comunidade via cadeia alimentar, pela transferência dos elementos genéticos de resistência entre as diferentes cepas ou por meio de pacientes externos colonizados que foram admitidos no hospital (Bates et al. 1994; Gordts et al., 1995).

A disseminação clonal de VRE uma vez estabelecida em uma unidade de saúde é extremamente difícil de erradicar. Vários estudos têm utilizado a tipagem molecular para confirmar a transmissão clonal e assim, compreender o mecanismo de transmissão do patógeno envolvido em infecções nosocomiais (Hartstein et al., 1997; Foca et al., 2000). A combinação de vigilância epidemiológica com genotipagem tem solucionado pequenos casos de surto causados por um único clone de VRE e até o estágio final de endemidade policlonal (Bonten et al., 2001).

Atento a disseminação intra e inter-hospitalar, as tabelas 6 e 7 deste estudo foram elaboradas com o objetivo de se visualizar a distribuição dos tipos e subtipos entre os 26 hospitais que encaminharam cepas de VRE para o IAL. Entre as cepas de VRE-EF pôde-se observar que, somente o Hospital 1 apresentou os três tipos genéticos A, B e D durante o período estudado. Entretanto, o tipo A está circulando em 21 hospitais, o tipo D em 7, o tipo B somente em um dos hospitais, e que apenas em quatro hospitais não se identificou cepas de VRE-EF. Para as cepas de VRE-EFM pode-se observar que o tipo P foi identificado em 13 dos 26 hospitais, apenas cinco apresentaram mais que um tipo genético, e em nove hospitais não se identificou cepas de VRE-EFM. Contudo, foi verificada a presença tanto de cepas VRE-EF e VRE-EFM em 13 (50%) dos 26 hospitais estudados.

Semelhante a este estudo, Stampone et al. (2005) caracterizaram geneticamente pelo PFGE, VREs isolados de sangue. Neste estudo, do total de 39 VREs, 28 isolados de VRE-EFM apresentaram perfis idênticos ou

semelhantes, sendo isolados em 18 dos 19 laboratórios hospitalares analisados durante o período de três anos (2001 a 2003) localizados em diversas áreas da Itália.

Em um estudo realizado por Moretti et al. (2004) verificou que cepas de *E. faecalis* resistente aos glicopeptídeos, com fenótipo VanA e isoladas de pacientes internados em dois hospitais localizados em cidades do Estado de São Paulo, distantes entre si em 100 Km, eram estreitamente relacionadas e confirmaram a disseminação inter-hospitalar.

O maior deslocamento observado entre os hospitais que apresentaram os clones A8 foi de 27km (Hospital 1 e 9) e os que identificaram o subtipo P1, foi de 23Km (Hospital 1 e 26). Dessa forma, a análise dos subtipos genéticos juntamente com a extensão geográfica onde estes tipos foram identificados, sugere a ocorrência de infecções inter-hospitalares monoclonais e evidenciam a alta capacidade de disseminação dos enterococos como patógenos nosocomiais.

Como se observa, a capacidade de disseminação dos enterococos intra e entre os hospitais é grande. O controle da transmissão de VRE envolve uma série de medidas que vai desde a higiene apropriada das mãos, o uso de aventais e luvas, limpeza e desinfecção de superfícies ambientais, até a esterilização dos equipamentos hospitalares. Além dos objetos inanimados contaminados, os pacientes colonizados passam a ser reservatório para transmissão de VRE a outros pacientes. A exposição prolongada aos antimicrobianos exerce uma pressão seletiva favorecendo a seleção de bactérias resistentes, a capacidade de aquisição e transferência de genes de resistência dos enterococos e o longo tempo que os pacientes podem permanecer colonizados favorecem disseminação intra e inter-hospitalar de VRE. As ações de vigilância laboratorial por meio de técnicas de biologia molecular como a PCR e a PFGE são importantes instrumentos de análise epidemiológica destas bactérias. Porém, é importante ressaltar que outras técnicas como a análise de genes de virulência (*esp*, *hyl* e *acm*) e o *Multi Locus*

*Sequence Typing* (MLST) têm ampliado a visão sobre a da biodiversidade e evolução destas bactérias.

Este estudo representou um importante monitoramento de cepas de VRE na cidade de São Paulo, no qual se teve a oportunidade de caracterizar cepas oriundas de vários hospitais, tanto da rede pública como privada e com isso observar a disseminação intra e inter-hospitalar. Ressaltando, assim, a importância do monitoramento laboratorial de cepas de enterococo nos hospitais para uma ampla investigação de um problema diretamente relacionado com a saúde pública da população.

## **6. CONCLUSÕES**

- No final do período investigado, observou-se uma inversão da frequência entre as espécies, em que o *E. faecium* tornou-se predominante.
- O perfil de resistência para os antimicrobianos avaliados confirma a multirresistência entre as cepas de VRE.
- A análise molecular das cepas de VRE-EFM mostrou uma maior diversidade genética (nove tipos) em relação aos VRE-EF (três tipos) e os seus subtipos mais frequentes, P1 e A8, tiveram uma alta ocorrência nos hospitais analisados.
- Observou-se uma maior disseminação de VRE-EF em 85% dos hospitais avaliados no período.
- Verificou-se a presença de VRE-EF e VRE-EFM em 50% dos hospitais avaliados no período.

---

## 7. REFERÊNCIAS

Academic dictionaries and encyclopedias. 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 Sys Bacteriol. 1984; 34(1): 31-34. [acesso em 20 out. 2009]. Disponível em: <http://en.academic.ru/dic.nsf/enwiki/126794>

Arias CA, Panesso D, Singh KV, Rice LB, Murray BE. Cotransfer of Antibiotic Resistance Genes and a hylEfm-Containing Virulence Plasmid in *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53 (10): 4240-6.

Arthur M, Molinas C, Courvalin P. Sequence of the vanY gene required for production of a vancomycin-inducible D, D-carboxypeptidase in *Enterococcus faecium* BM4147. Gene. 1992; 120(1): 111-4.

Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in Enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 1563-71.

Arthur M, Depardieu F, Molinas C, Reynolds P, Courvalin P. The *vanZ* gene of *Tn1546* from *Enterococcus faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin. Gene. 1995; 154(1): 87-92.

Arthur M, Reynolds P, Courvalin P. Glycopeptide resistance in enterococci. Trends Microbiol. 1996; 4(10): 401-7.

Aslangul E, Ruimy R, Chau F, Garry L, Andremont A, Fantin B. Relationship between the Level of Acquired Resistance to Gentamicin and Synergism with Amoxicillin in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49 (10): 4144-8.

Bates J, Jordens JZ, Griffiths DT. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. *J Antimicrob Chemother.* 1994; 34: 507-14.

Bedendo J e Pignatari ACC. Typing of *Enterococcus faecium* by polymerase chain reaction and pulsed field gel electrophoresis. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33: 1269-74.

Bender EA, Freitas ALP, Reiter KC, Lutz L, Barth AL. Identification, antimicrobial resistant and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. Isolated in Porto Alegre, Brazil. *Braz J Microbiol.* 2009; 40: 697-700.

Bonafede M e Rice LB. Emerging antibiotic resistance. *J Lab Clin Med.* 1997; 130: 558-66.

Bonten MJ, Hayden MK, Nathan C, van Voorhis J, Matushek M, Slaughter S, et al. Epidemiology of colonization of patients and environment with vancomycin-resistant enterococci. *Lancet.* 1996; 348: 1615-9.

Bonten MJ, Willems R, Weinstein RA. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect Dis.* 2001; 1(5): 314-25.

Borgmann S, Schulte B, Wolz C, Gruber H, Werner G, Goerke C, Klare I, Beyser K, Heeg P, Autenrieth IB. Discrimination between epidemic and non-epidemic glycopeptide-resistant *E. faecium* in a post-outbreak situation. *J Hosp Infect.* 2007; 67(1): 49-55.

Boyce JM. Vancomycin resistant enterococci. *Infect Dis Clin North Amer.* 1997; 11: 367-84.

Boyle JF, Soumakis SA, Rendo A, Herrington JA, Gianakis DG, Thurberg BE, Painter BG. Epidemiologic analysis and genotypic characterization of a

nosocomial outbreak of vancomycin resistant enterococci. J Clin Microbiol. 1993; 31: 1280-5.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.616, de mai. 1998. Gabinete do Ministro, Brasília, 12 de mai. 1998. Programa de Controle de Infecção Hospitalar. [Regulamenta as ações de controle de infecção hospitalar no país, em substituição a Portaria MS 930/92].

Brennen C, Wagener MM, Muder RR. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a long-term care facility. J Am Geriatr Soc. 1998; 46: 157-60.

Byers KE, Anglim AM, Anneski CJ, Germanson TP, Gold HS, Durbin LJ, et al. A hospital epidemic of vancomycin-resistant *enterococcus*: risk factors and control. Infect Control Hosp Epidemiol. 2001; 22: 140-7.

Caniça M, Dias R, Vaz-Pato MV, Carvalho C. Two major Spanish clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Portuguese isolates of clinical origin. J Antimicrob Chemother. 2003; 1-6.

Caiaffa Filho HH, Almeida GD, Oliveira GA, Sarahyba L, Mamizka EM, Burattini MM. Molecular characterization of *Van* genes found in vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. Isolated from Hospital das Clínicas, FMUSP, São Paulo, Brasil. Braz J Infect. 2003; 7(3): 173-4.

Camargo IL, Barth AL, Pilger K, Seligman BG, Machado AR, Darini AL. *Enterococcus gallinarum* carrying the Van A gene cluster: first report in Brazil. Braz J Med Biol Res. 2004; 37(11):1669-71.

Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-Resistant Enterococci. Clin Microbiol Rev. 2000; 13(4): 686-707.

Cereda RF, Gales AC, Silbert S, Jones RN, Sader HS. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistance *Enterococcus faecium* in

Brazil. Infect Control Hosp Epidemiol. 2002; 23(1): 19-22.

Chavers LS, Moser SA, Benjamin WH, Banks SE, Steinhauer JR, Smith AM, et al. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. J Hosp Infect. 2003; 53: 159-71.

Chlebicki MP e Kurup A. Vancomycin-resistant *Enterococcus* - A review from a Singapore perspective. Ann Acad Med Singapore. 2008; 37: 861-9.

Chou YY, Lin TY, Lin JC, Wang NC, Peng MY, Chang FY. Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: comparison of clinical features and outcome between *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. J Microbiol Immunol Infect. 2008; 41: 124-9.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. CLSI document M100-S17. CLSI, Wayne, PA, 2007.

Costa LMD, Souza DC, Martins ITF, Zanella RC, Brandileone MCC, Bokermann S, Sader HS, Souza HAPHM. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brazil. Braz J Infect Dis. 1998; 2: 160-3.

Costa LMD, Reynolds PE, Souza HAPHM, Souza DC, Palepou MFI, Woodford N. Characterization of a divergent vand-type resistance element from the first glycopeptide-resistant strain of *Enterococcus faecium* isolated in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 3444-6.

Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. Clin Inf Dis. 2006; 42: S25-34.

D'Agata EM, Gautam S, Green WK, Tang YW. High rate of false-negative results of the rectal swab culture method in detection of gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci. Clin Infect Dis. 2002; 34: 167-72.

D'Azevedo PA, Kacman SB, Achmalfuss T, Rodrigues LF. Primeiro caso de *Enterococcus* resistentes à vancomicina isolado em Porto Alegre, RS. J Bras Patol. 2000; 36: 258.

D'Azevedo PA, Dias CAG, Lemos SK, Bittencourt JAF, Teixeira LM. Antimicrobial susceptibility among *Enterococcus* isolates from the city of Porto Alegre, RS, Brazil. Braz J Infect Dis. 2004; 35: 199-204.

D'Azevedo PA, Dias CAG, Teixeira LM. Genetic diversity and antimicrobial resistance of enterococcal isolates from Southern region of Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2006; 48(1): 11-6.

D'Azevedo PA, Furtado GHC, Medeiros EAS, Santiago KA, Silbert S, Pigntari ACC. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococci* strains eight years apart from its first isolation in São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2008; 50(4): 195-8.

DeLisle S e Perl TM. Vancomycin-resistant enterococci: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. Chest. 2003; 123: 504S-18S.

Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. Clin Microbiol Rev. 2007; 79-114.

Deplano A, Denis O, Nonhoff C, Rost F, Byl B, Jacobs F et al. Outbreak of hospital-adapted clonal complex-17 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain in a haematology unit: role of rapid typing for early control. J Antimicrob Chemother. 2007; 60: 849-54.

Deshpande LM, Fritsche TR, Moet GJ, Biedenbach DJ, Jones RN. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY

Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Microbiol Inf Dis*. 2007; 58: 163-70.

Donskey CJ, Chowdhry TK, Hecker MT, Høyen CK, Hanrahan JA, Hujer AM, et al. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N Engl J Med*. 2000; 343: 1925-32.

Dutka-Malen S, Molinas C, Arthur M, Courvalin P. The VAN A glycopeptide resistance protein is related to D-alanyl-D-alanine ligase cell wall biosynthesis enzymes. *Mol Gen Genet*. 1990; 224(3): 364-72.

Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 24-7.

Eliopoulos GM. Vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Resist*. 1997; 11: 851-65.

Endtz HP, van den Braak N, van Belkum A, Kluytmans JAJW, Koeleman JGM, Spanjaard L, et al. Fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients and those living in the community in The Netherlands. *J Clin Microbiol*. 1997; 35(12): 3026-31.

Facklam R e Teixeira LM. Enterococcus. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington, American Society for Microbiology, 2003.

Foca M, Jakob K, Whittier S, Latta PD, Factor S, Rubenstein D et al. Endemic *Pseudomonas aeruginosa* infection in a neonatal intensive care unit. *N Engl J Med*. 2000; 343: 695-700.

Fontana R, Canepari P, Lleò MM, Satta G. Mechanisms of resistance of enterococci to beta-lactam antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1990 9(2): 103-5,

Free L, Sahm DF. Detection of enterococcal vancomycin resistance by multiplex PCR. In: D. Pershing (ed.), PCR protocols for emerging infectious diseases. ASM Press, Washington, D.C. 1996; 150-5.

Furtado GHC, Martins ST, Coutinho AP, Soares GMM, Wey SB, Medeiros EAS. Incidência de *Enterococcus* resistente à vancomicina em hospital universitário no Brasil. Rev Saúde Públ. 2005; 39: 41-6.

Gales A, Sader H, Santiago K, Pgnatari A, Jones R. Frequency and antimicrobial susceptibility profile of vancomycin-resistant enterococci from Latin America: a report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2006). 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, Spain, 19-22 April 2008. Abstract number: P689.

George RC e Uttley AHC. Susceptibility of enterococci and epidemiology of enterococcal infection in the 1980. Epidem Inf. 1979; 103: 403-13.

Girardello R, Doi AM, Barbosa VLB, Abboud CS, Dal Forno CB, Gales AC. Molecular characterization of the linezolid-resistant *Enterococcus faecium*: first report in Brazil. 2009. Anais do 49th ICAAC, 12 a 15 de setembro. San Francisco, CA, EUA.

Goossens H, Jabes D, Rossi R, Lammens C, Privitera G, Courvalin P. European survey of vancomycin-resistant enterococci in at-risk hospital wards and in vitro susceptibility testing of ramoplanin against these isolates. J Antimicrob Chemother. 2003; 51: 5-12.

Gordts B, Van Landuyt H, Ieven M, Vandamme P, Goossens H. Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. J Clin Microbiol. 1995; 33: 2842-6.

Grayson ML, Eliopoulos GM, Wennersten CB, Ruoff KL, DeGirolami PC, Ferraro M-J, et al. Increasing resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics among clinical isolates of

*Enterococcus faecium*: a 22-year review at one institution. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35: 2180-4.

Gross KC, Houghton MP, Senterfit LB. Presumptive speciation of *Streptococcus bovis* and other group D streptococci from human sources by using arginine and pyruvate tests. *J Clin Microbiol.* 1975; 1(1): 54-60.

Guimarães T, Neto AA, Grimbaum RS, Campos EV, Silva MO, Malinovski J et al. *E. faecalis* resistente a linezolida isolados em unidade de queimados: relato dos primeiros casos no Brasil. In: XV Congresso Brasileiro de Infectologia 2007, Curitiba.

Hallgren A, Abednazari H, Ekdahl C, Hanberger H, Nilsson M, Samuelsson A, et al. Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci in intensive care units in Sweden evaluated by different MIC breakpoint systems. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48(1): 53-62.

Handwerger S, Raucher B, Altarac D, Monka J, Marchione S, Singh KV et al. Nosocomial outbreak due to *Enterococcus faecium* highly resistant to vancomycin, penicillin, and gentamicin. *Clin Infect Dis.* 1993; 16(6): 750-5.

Hashimoto Y, Tanimoto K, Ozawa Y, Murata T, Ike Y. Amino acid substitutions in the VanS sensor of the VanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus* strains result in high-level vancomycin resistance and low-level teicoplanin resistance. *FEMS Microbiol Lett.* 2000; 185(2): 247-54.

Hartstein AI, LeMonte AM, Iwamoto PK. DNA typing and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at two affiliated hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997; 18(1): 42-8.

Hörner R, Liscano MGH, Maraschin MM, Salla A, Meneghetti B, Frasson Dal Forno NL, et al. Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. *J Bras Patol Med Lab.* 2005;

41(6): 391-5.

Horodniceanu T, Bougueleret L, El-Solh N, Bieth G, Delbos F. High-level, plasmid-borne resistance to gentamicin in *Streptococcus faecalis* subsp. *zymogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979; 686-9.

Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance: recommendations of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *Am J Infect Control.* 1995; 23: 87-94.

Huang V e Gortney JS. Risk of serotonin syndrome with concomitant administration of linezolid and serotonin agonists. *Pharmacotherapy.* 2006; 26: 1784-93.

Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis.* 1998; 4: 239-49.

Jean SS, Fang CT, Wang HK, Hsueh PR, Chang SC, Luh KT. Invasive infections due to vancomycin-resistant enterococci in adult patients. *J Microbiol Immunol Infect.* 2001; 34: 281-6.

Jeu L e Fung HB. Daptomycin: a cyclic lipopeptide antimicrobial agent. *Clin Ther.* 2004; 26(11): 1728-57.

Jones RN, Hare RS, Sabatelli FJ. In vitro Gram-positive antimicrobial activity of evernimicin (SCH 27899), a novel oligosaccharide, compared with other antimicrobials: a multicentre international trial. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 47(1): 15-25.

Joong-Sik E, In-Sook H, Byung-Yoen H, Jae-Gab L, Yeon-Joo L, Hee-Jin C, et al. Emergence of vanA genotype vancomycin-resistant enterococci with low or

moderate levels of teicoplanin resistance in Korea. J Clin Microbiol. 2004; 42(4): 1785-6.

Kauffman CA. Therapeutic and preventative options for the management of vancomycin-resistant enterococcal infections. J Antimicrob Chemother. 2003; 51: 23-30.

Kawalec M, Gniadkowski M, Zaleska M, Ozorowski T, Konopka L, Hryniewicz W. Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the phenotype VanB in a Hospital in Warsaw, Poland: Probable transmission of the resistance determinants into an endemic vancomycin-susceptible strain. J Clin Microbiol. 2001; 39: 1781-7.

Kawalec M, Kedzierska J, Gajda A, Sadowy E, Wegrzyn J, Naser S et al. Hospital outbreak of vancomycin-resistant enterococci caused by a single clone of *Enterococcus raffinosus* and several clones of *Enterococcus faecium*. Clin Microbiol Infect. 2007; 13: 893-901.

Klare I, Badstubner D, Konstabel C, Bohme G, Claus H, Witte W. Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry. 1999; Microb Drug Resist. 5: 45-52.

Koh TH, Deepak RN, Se-Thoe SY, Lin RV, Koay ES. Experience with the Roche LightCycler VRE detection kit during a large outbreak of vanB2/B3 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. J Antimicrob Chemother. 2007; 60: 182-3.

Korten V e Murray BE. The nosocomial transmission of enterococci. Curr Opin Infect Dis. 1993; 6: 498-505.

Krogstad DJ e Parquette AR. Defective killing of enterococci: a common property of antimicrobial agents acting on the cell wall. Antimicrob Agents Chemother. 1980; 17(6): 965-8.

Landman D, Quale JM, Oydna E, Willey B, Ditore V, Zaman M, et al. Comparison of five selective media for identifying fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 751-2.

Lauderdale TL, McDonald L C, Shiao YR et al. Vancomycin-resistant enterococci from humans and retail chickens in Taiwan with unique VanB phenotype-*vanA* genotype incongruence. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 525–27.

Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med.* 1988; 319: 157-61.

Leclercq R, Dutka-Malen S, Brisson-Noël A, Molinas C, Derlot E, Arthur M, Duval J, Courvalin P. Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides. *Clin Infect Dis.* 1992; 15(3): 495-501.

Levine DP. Vancomycin: a history. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 5-12.

Lewis II JS, Owens A, Cadena J, Sabol K, Patterson JE, Jorgensen JH. Emergence of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy [published correction appears in *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2152]. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 1664-5.

Linden PK, Moellering Jr RC, Wood CA, Rehm SJ, Flaherty J, Bompert F, et al. Treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infections with quinupristin/dalfopristin. *Clin Infect Dis.* 2001; 33: 1816-23.

Linden PK. Optimizing therapy for vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Semin Resp Crit Care Med.* 2007; 28: 632-45.

Long JK, Choueiri TK, Hall GS, Avery RK, Sekeres MA. Daptomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a patient with acute myeloid leukemia. *Mayo Clin Proc.* 2005; 80: 1215-6.

Low DE, Keller N, Barth A, Jones RN. Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis.* 2001; 32: 133-45.

Mandell GL, Kaye D, Levison ME, Hook EW. Enterococcal endocarditis: an analysis of 38 patients observed at the New York Hospital-Cornell Medical Center. *Arch Intern Med.* 1970; 125(2): 258-64.

Manfredi R e Calza L. The recent evolution of therapeutic weapons against resistant Gram-positive microorganisms. *Rev Panam Infectol.* 2008; 10(2): 34-49.

Mato R, De Lencastre H, Roberts RB, Tomasz A. Multiplicity of genetic backgrounds among vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates recovered from an outbreak in a New York city hospital. *Microb Drug Resist.* 1996; 2: 309-17.

McDonald LC, Kuerhnert MJ, Tenover FC, Jarvis RW. Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: prevalence, sources and public health implications. *Emerg Infect Dis.* 1997; 3: 311-7.

McGregor KF, Young H-K. Identification and characterization of vanB2 glycopeptide resistance elements in enterococci isolated in Scotland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 2341-8.

Mendes C, Sinto SI, Hsiung A, Oplustil C, Teixeira L, Segura A et al. Atividade antimicrobiana in vitro de quinupristina/dalfopristina para cocos gram positivos isolados de cinco centros brasileiros: resultado do estudo de vigilância L-SMART. *J Bras Patol Med Lab.* 2002; 38(3): 191-7.

Meka VG, Gold HS. Antimicrobial resistance to linezolid. *Clin Infect Dis.* 2004; 39(7): 1010-5.

Merquior VLC, Netz DJ, Camello TC, Teixeira LM. Characterization of enterococci isolated from nosocomial and community infections in Brazil. *Exp Med Biol.* 1997; 418: 281-3.

Merquior VLC, Neves FPG, Ribeiro RL, Duarte RS, Marques EA, Teixeira LM. Bacteraemia associated with a vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* strain harbouring both the vanA and vanC1 genes. *J Med Microbiol.* 2008; 57: 244-5.

Metzidie E, Manolis EN, Pournaras S, Sofianou D, Tsakris A. Spread of an unusual penicillin- and imipenem-resistant but ampicillin-susceptible phenotype among *Enterococcus faecalis* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57(1): 158-60.

Moellering Jr RC, Wennersten C, Medreck T, Weinberg A. Prevalence of high-level resistance to aminoglycosides in clinical isolates of enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1970; 10: 335-40.

Moellering Jr RC. The enterococcus: a classic example of the impact of antimicrobial resistance on therapeutic options. *J Antimicrob Chemother.* 1991; 28: 1-12.

Moellering Jr RC. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin Infect Dis.* 1992; 14: 1173-8.

Moellering Jr RC. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc* species. In: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R, editor. *Principles and Practice of Infectious Diseases.* Elsevier. 2005: 2411-21.

Montecalvo MA, de Lencastre H, Carraher M, Gedris C, Chung M, VanHorn K, et al. Natural history of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1995; 16: 680-5.

Moore WEC e Holdeman LV. Human Fecal Flora: The normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Applied Microbiol.* 1974: 961-79.

Moretti ML, Bratfich OJ, Tocchi RB, Levi C, Levin AS, Duboc GM, Vormittag E, Blum-Menezes D. Clonal dissemination of Van A-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecalis* between hospitals of two cities located 100 km apart. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37(9): 1339-43.

Munoz-Price LS, Lolans K, Quinn JP. Emergence of resistance to daptomycin during treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* infection [letter]. *Clin Infect Dis.* 2005; 41: 565-66.

Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev.* 1990; 3: 46-65.

Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci. *Am J Med.* 1997; 101: 284-93.

Murray BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *New Engl J Med.* 2000; 342: 710-21.

Murray BE, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology.* 9 ed. Washington; Asm Press, 2007.

Mutnick AH, Biedenbach DJ, Jones RN. Geographic variations and trends in antimicrobial resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2000). *Diagn Microbiol Inf. Dis.* 2003; 46: 63-8.

Muto CA, Giannetta ET, Durbin LJ, Simonton BM, Farr BM. Cost-effectiveness of perirectal surveillance cultures for controlling vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2002; 23: 429-35.

Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, Boyce JM, et al. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant

strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. Infect Control Hosp Epidemiol. 2003; 24: 362-86.

Navarro F, Courvalin P. Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38(8): 1788-93.

Neely AN e Maley MP. Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastic. J Clin Microbiol. 2000; 38: 724-6.

Neves FPG, Ribeiro RL, Duarte RS, Teixeira LM, Merquior VLC. Emergence of the *vanA* genotype among *Enterococcus gallinarum* isolates colonising the intestinal tract of patients in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. Int J Antimicrob Agents. 2009; 33: 211-5.

Noble WC, Virani Z, Cree RG. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 1992; 93: 195-8.

Palazzo ICV, Camargo ILBC, Zanella RC, Darini ALC. Evaluation of clonality in enterococci isolated in Brazil carrying Tn1546 -like elements associated with *vanA* plasmids. FEMS Microbiol Lett. 2006; 258: 29-36.

Pallares R, Pujol M, Peña C. Cephalosporins as risk factor for nosocomial *Enterococcus faecalis* bacteremia. Arch Intern Med. 1993; 153(13): 1581-6.

Patel R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. J Antimicrob Chemother. 2003; 51: 13-21.

Paterson DL. Clinical experience with recently approved antibiotics. Curr Opin Pharmacol. 2006; 6: 486-90.

Privitera O, Agodi A, Puntorieri M, Primavera A, Santagati M, Privitera A, Mezzatesta ML, Giuffrida E, Stefani S. Molecular epidemiology of enterococci

with high-level resistance to aminoglycosides. *Microb Drug Resist.* 1997; 1: 293-7.

Quale J, Landman D, Atwood E, Kreiswirth B, Willey BM, Dittore V, et al. Experience with a hospital-wide outbreak of vancomycin-resistant enterococci. *Am J Infect Control.* 1996; 24: 372-9.

Quiñones D, Goñi P, Rubiolo MC, Duranc E, Gómez-Lus R. *Enterococci* spp. isolated from Cuba: species frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005; 51: 63-7.

Quintiliani R Jr, Evers S, Courvalin P. The vanB gene confers various levels of self-transferable resistance to vancomycin in enterococci. *J Infect Dis.* 1993; 167(5): 1220-3.

Rand KH, Houck H. Daptomycin synergy with rifampicin and ampicillin against vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 53: 530-2.

Randhawa VS, Kapoor L, Singh V, Mehta G. Aminoglycoside resistance in enterococci isolated from paediatric septicaemia in a tertiary care hospital in North India. *Indian J Med Res.* 2004; 119: 77-9.

Reynolds PE. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1989; 9: 43-50.

Rubinstein E, Vaughan D. Tigecycline: a novel glycylicycline. *Drugs.* 2005; 65: 1317-36.

Rice LB. Emergence of vancomycin-resistant enterococci. *Emerg Inf Dis.* 2001; 7(2): 183-7.

Rice LB, Lakticova V, Helfand MS, Hutton-Thomas R. In vitro antienterococcal activity explains associations between exposures to antimicrobial agents and risk of colonization by multiresistant enterococci. *J Infect Dis.* 2004; 190: 2162-6.

Ruzin A, Singh G, Severin A, Yang Y, Dushin RG, Sutherland AG et al. Mechanism of action of the mannopeptimycins, a novel class of glycopeptide antibiotics active against vancomycin-resistant gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 728-38.

Safdar N e Maki DG. The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus*, *enterococcus*, gram-negative bacilli, *Clostridium difficile*, and *Candida*. *Ann Intern Med.* 2002; 136: 834-44.

Scagnelli M, Pellizer G, Lalla F, D'Emilio A, Rassu M, Bragagnolo L et al. epidemiological analysis of vancomycin-resistant enterococci in a large tertiary-care hospital in Northern Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001; 20: 609-16.

Schleifer KH e Kilpper-Balz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* norn. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J System Bacteriol.* 1984; 34: 31-4.

Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JAA, Meis JFG, Voss A. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis.* 2000; 19: 816-22.

Shepard BD e Gilmore MS. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microb Inf.* 2002; 4(2): 215-24.

Siddiqui AH, Harris AD, Hebden J, Wilson PD, Morris JG Jr, Roghmann MC. The effect of active surveillance for vancomycin-resistant enterococci in high-risk units on vancomycin-resistant enterococci incidence hospital-wide. *Am J Infect Control.* 2002; 30: 40-3.

Silva Filho LVRF, Adde FV, Fongaro GF, Menezes LC, Junior AR, Rodrigues JC.

Emergência de *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina em paciente com fibrose cística e infecção crônica por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina após tratamento com vancomicina inalatória. Einstein. 2008; 6(3): 356-8.

Streit JM, Sader HS, Fritsche TR, Jones RN. Dalbavancin activity against selected populations of antimicrobial-resistant Gram-positive pathogens. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005; 53: 307-10.

Stampone L, Grosso MD, Boccia D, Pantosti A. Clonal spread of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain among bloodstream-infecting isolates in Italy. J Clin Microbiol. 2005; 1575-80.

Tacconelli E e Cataldo MA. Vancomycin-resistant enterococci (VRE): transmission and control. Int J Antimicrob Agents. 2008; 31: 99-106.

Tavares W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. Rev Soc Bras Med Trop. 2000; 33(3): 281-301.

Taylor ME, Oppenheim BA, Chadwick PR, Weston D, Palepou MF, Woodford N, et al. Detection of glycopeptide-resistant enterococci in routine diagnostic faeces specimens. J Hosp Inf. 1999; 43: 25-32.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995; 2233-9.

Thouverez M e Talon D. Microbiological and epidemiological studies of *Enterococcus faecium* resistant to amoxicillin in a university hospital in Eastern France. Clin Microbiol Inf. 2004; 10: 441-7.

Timmers GJ, van der Zwet WC, Simoons-Smit IM et al. Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a haematology unit: risk factor assessment and successful control of the epidemic. Br J Haematol. 2002; 116: 826-33.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. Lancet. 1988; 1: 57-8.

van den Bogaard AE, Jensen LB, Stobberingh EE. Vancomycin-resistant enterococci in turkeys and farmers. N Engl J Med. 1997; 337 (21): 1558-9.

Vilela MA, Souza SL, Palazzo ICV, Ferreira JC, Morais Jr MA, Darini ALC et al. Identification and molecular characterization of Van A-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Northeast of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 101(7): 716-9.

Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Susan E Flannagan. Genetic Analysis of a High-Level Vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. Science. 2003; 302: 1569-71.

Wendt C, Wiesenthal B, Dietz E, Ruden H. Survival of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococci on dry surfaces. J Clin Microbiol. 1998; 36: 3734-6.

Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. Eurosurveillance. 2008; 13(47): 1-11.

Willems RJL, Janetta T, Marga van Santen, Robinson DA, Coque TM, Baquero F et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from

- Distinct Nosocomial Genetic Complex. *Emerg Inf Dis*. 2005; 11(6): 821-8.
- Winston DJ, Emmanouilides C, Kroeber A, Hindler J, Bruckner DA, Territo MC et al. Quinupristin/Dalfopristin therapy for infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin Infect Dis*. 2000; 30: 790-7.
- Wong AH, Wenzel RP, Edmond MB. Epidemiology of bacteriuria caused by vancomycin-resistant enterococci – a retrospective study. *Am J Infect Control*. 2000; 28: 277-81.
- Woodford N, Johnson AP, Morrison D, E. Speller DC. Current perspectives on glycopeptide resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995a: 585-615.
- Woodford N, Jones BL, Baccus Z, Ludlam HA, Brown DFJ. Linkage of vancomycin and high-level gentamicin resistance genes on the same plasmid in a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother*. 1995b; 35: 179-84.
- Woodford N. Glycopeptide-resistant enterococci: a decade of experience. *J Med Microbiol*. 1998; 47: 849-62.
- Young HL, Ballard SA, Roffey P, Grayson ML. Direct detection of vanB2 using the Roche LightCycler vanA/B detection assay to indicate vancomycin-resistant enterococcal carriage – sensitive but not specific. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59: 809-10.
- Zanella RC, Valderato F, Lovgren M, Tyrrel GJ, Bokermann S, Almeida SCG, Vieira VS, Brandileone MCC. First confirmed case of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with Van A phenotype from Brazil: isolation from a meningitis case in São Paulo. *Microb Drug Resist*. 1999; 5: 159-61.
- Zanella RC. Caracterização Fenotípica e genotípica de *Enterococcus* spp resistentes aos glicopeptídeos isolados durante o primeiro surto hospitalar no

Brasil. [tese]. São Paulo (SP): Universidade Federal de São Paulo. 2001. 140p.

Zanella RC, Brandileone MC, Bokermann S, Almeida SC, Valdetaro F, Vitória F, et al. Phenotypic and genotypic characterization of VanA *Enterococcus* isolated during the first nosocomial outbreak in Brazil. *Microb Drug Resist*. 2003; 9(3): 283-91.

Zanella RC, Lima MJC, Tegani LS, Hitomi A, Brandileone MCC, Palazzo ICV, et al. Emergence of VanB phenotype-*vanA* genotype in vancomycin-resistant enterococci in Brazilian hospital. *Braz J Microbiol*. 2006; 37: 117-8.

Zirakzadeh A, Patel R. Vancomycin-resistant enterococci: colonization, infection, detection and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2006; 81: 529-36.

**Anexo 1:** Distribuição das 239 cepas de VRE de acordo com o hospital, espécie, material clínico, perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e tipo molecular caracterizados por PFGE do período de 1999-2008.

Hospitais	Espécie	Nº cepa	Material clínico	Percentual de resistência											PFGE		
				HLGR	HLSR	VAN	TEI	AMP	CIP	TET	CLO	RIF	ERI	LNZ	QD	Subtipos	
1	<i>E. faecalis</i>	82/99	LC	R	S	R	R	S	R	I	R	R	R	-	-	A1	
		238/99	Sg	R	S	R	R	S	I	R	R	R	R	-	-	A8	
		434/99	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A1
		506/99	LC	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A1
		840/99	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	I	-	-	A1
		50/00	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A1
		82/00	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A8
		196/00	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A8
		197/00	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A9
		106/01	LC	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	A8
		116/01	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A13
		192/01	LC	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	A8
		211/01	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A12
		217/01	LC	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A8
		243/02	LC	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	A8
		276/02	LC	R	S	R	R	S	R	R	I	R	R	R	S	R	A2
		306/02	LC	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	B1
		307/02	Sg	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	A1
		69/03	Sg	R	R	R	R	S	R	R	R	R	I	R	-	-	A8
		95/03	LC	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A8
100/03	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A8		
27/03	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A8		
30/03	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	I	R	-	-	A8		
25/04	Uri	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A8		

## Anexo 1 cont.

Hospitais	Espécie	Nº cepa	Material clínico	Percentual de resistência												PFGE
				HLGR	HLSR	VAN	TEI	AMP	CIP	TET	CLO	RIF	ERI	LNZ	QD	Subtipos
		26/04	Sg	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	-	-	A8
		77/04	Sg	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	-	-	A2
		152/04	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A8
		17/05	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	A11
		142/05	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	A11
		302/05	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	A8
		323/05	LC	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	A8
		176/06	LC	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	A8
		181/06	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	A2
		182/06	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	A11
		196/06	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	A1
		22/07	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	A8
		42/07	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	A1
		387/07	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	A1
		745/07	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	A2
		764/07	Sg	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	D2
		73/08	Uri	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	A14
		97/08	LC	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	D4
		101/08	LC	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	A14
		169/08	Uri	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	A14
		170/08	LC	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	A8
		186/08	Sg	S	S	R	R	S	R	-	R	R	R	S	R	D3
		236/08	LC	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	A14

## Anexo 1 cont.

Hospitais	Espécie	Nº cepa	Material clínico	Percentual de resistência												PFGE
				HLGR	HLSR	VAN	TEI	AMP	CIP	TET	CLO	RIF	ERI	LNZ	QD	Subtipos
	<i>E. faecium</i>	321/05	Uri	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	-	P1
		183/06	Sg	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	P9
		194/06	Uri	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P6
		210/06	Uri	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	P12
		212/06	Sg	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	P9
		28/07	Sg	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P13
		68/07	LC	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	P16
		204/07	Uri	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	P14
		381/07	LC	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P14
		509/07	Uri	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	P6
		511/07	LC	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	P4
		623/07	Uri	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	P6
		749/07	Uri	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	P14
		27/08	Sg	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P1
		34/08	Uri	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P6
		103/08	Uri	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	P1
		129/08	LC	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	I	P1
		210/08	Sg	R	R	R	R	R	R	-	S	R	R	S	I	P13
		211/08	Uri	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	I	P1
		217/08	Sg	S	R	R	R	R	R	-	I	R	R	S	I	P12
<b>2</b>	<i>E. faecium</i>	328/99	LC	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	-	-	M1
		329/99	Sg	R	S	R	R	R	S	S	-	R	R	-	-	M1
<b>3</b>	<i>E. faecium</i>	326/99	LC	R	R	R	R	R	I	R	-	R	R	-	-	U
<b>4</b>	<i>E. faecalis</i>	89/00	Uri	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	A1

## Anexo 1 cont.

Hospitais	Espécie	Nº cepa	Material clínico	Percentual de resistência												PFGE	
				HLGR	HLSR	VAN	TEI	AMP	CIP	TET	CLO	RIF	ERI	LNZ	QD	Subtipos	
		90/00	Uri	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	A1
		180/01	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A2
		216/04	LC	R	S	R	R	S	R	I	R	R	R	-	-	A7	
<b>5</b>	<i>E. faecium</i>	222/00	Uri	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	-	-	M9	
		286/00	LC	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	R	
		215/06	Uri	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	P13	
		170/06	LC	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	P13	
		233/07	LC	S	S	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P1	
		596/07	Sg	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	P1	
<b>6</b>	<i>E. faecalis</i>	158/01	LC	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A8	
<b>7</b>	<i>E. faecalis</i>	162/01	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A1	
		166/05	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	A1	
	<i>E. faecium</i>	283/07	Sg	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	P11	
		332/07	LC	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P9	
		369/07	Uri	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	P3	
		379/07	Sg	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	P14	
		81/08	Uri	S	R	R	R	R	-	S	I	R	R	S	S	S	
		87/08	LC	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	P14	
		107/08	Sg	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	P14	
		115/08	LC	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	P1	
		172/08	Sg	S	R	R	R	R	R	-	I	R	R	S	S	P14	
		188/08	Sg	S	R	R	R	R	R	-	S	R	R	S	S	P1	
<b>8</b>	<i>E. faecalis</i>	309/00	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A1	
		310/00	Uri	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A1	

## Anexo 1 cont.

Hospitais	Espécie	Nº cepa	Material clínico	Percentual de resistência												PFGE	
				HLGR	HLSR	VAN	TEI	AMP	CIP	TET	CLO	RIF	ERI	LNZ	QD	Subtipos	
		159/01	LC	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A1
		163/01	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A10
		139/02	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A2
<b>9</b>	<i>E. faecalis</i>	1/02	LC	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A1
		47/02	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A8
		49/02	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A8
		50/02	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	-	A1
		57/02	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A8
		158/02	Sg	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	-	A2
		33/04	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A8
<b>10</b>	<i>E. faecalis</i>	252/02	LC	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A8
	<i>E. faecium</i>	217/07	Uri	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S		V
<b>11</b>	<i>E. faecalis</i>	367/02	LC	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-		A1
		368/02	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-		A1
		369/02	LC	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-		A1
		370/02	LC	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-		A8
		371/02	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-		A8
		129/03	Uri	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	A1
		215/03	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A1
		156/04	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A8
		165/04	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A8
		259/04	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	A8
		15/05	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	-	A1
		86/06	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	A9

Anexo 1 cont.

Hospitais	Espécie	Nº cepa	Material clínico	Percentual de resistência												PFGE
				HLGR	HLSR	VAN	TEI	AMP	CIP	TET	CLO	RIF	ERI	LNZ	QD	Subtipos
		163/06	Uri	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	A9
		200/06	LC	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	A1
		603/07	Uri	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	A8
		201/08	LC	R	R	R	R	S	R	-	R	R	R	S	R	A15
	<i>E. faecium</i>	160/06	Uri	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	P1
		113/07	Sg	R	R	S	R	R	R	R	I	R	R	S	S	P15
<b>12</b>	<i>E. faecalis</i>	213/00	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A8
		18/04	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A11
		19/04	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A8
		60/04	Sg	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A8
		64/04	Uri	R	S	R	R	S	R	I	R	R	R	-	-	A8
		186/04	Uri	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	-	-	D1
		237/04	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A13
		245/04	Uri	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A10
		247/04	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A2
		9/05	LC	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	A16
		10/05	Uri	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	A16
		12/05	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	A8
		170/05	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	A2
		258/05	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	A12
	<i>E. faecium</i>	299/05	Uri	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	-	P9
		20/06	Uri	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	-	P1
<b>13</b>	<i>E. faecalis</i>	211/00	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A1
		23/01	LC	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A1

## Anexo 1 cont.

Hospitais	Espécie	Nº cepa	Material clínico	Percentual de resistência												PFGE
				HLGR	HLSR	VAN	TEI	AMP	CIP	TET	CLO	RIF	ERI	LNZ	QD	Subtipos
		185/05	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	A3
		57/08	Uri	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P1
		58/08	Uri	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P9
		59/08	LC	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P9
14	<i>E. faecalis</i>	95/01	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A1
15	<i>E. faecalis</i>	120/01	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A1
16	<i>E. faecalis</i>	97/01	LC	-	-	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A8
		124/02	Uri	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	-	-	D1
		218/02	Sg	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A8
		221/02	LC	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	A5
17	<i>E. faecalis</i>	136/04	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A9
	<i>E. faecium</i>	216/06	LC	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	T
18	<i>E. faecalis</i>	88/04	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A1
		99/04	LC	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	A6
	<i>E. faecium</i>	108/06	Sg	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	P17
		145/06	Sg	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	P5
		156/06	Sg	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	P5
		97/07	Sg	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	P10
		320/07	Sg	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P6
		89/08	Sg	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	P9
		274/08	Sg	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	-	S	P7
19	<i>E. faecalis</i>	195/03	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A8
		53/04	Uri	R	S	R	R	S	R	I	R	R	R	-	-	A8
		287/05	Uri	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	A11

## Anexo 1 cont.

Hospitais	Espécie	Nº cepa	Material clínico	Percentual de resistência												PFGE
				HLGR	HLSR	VAN	TEI	AMP	CIP	TET	CLO	RIF	ERI	LNZ	QD	Subtipos
		247/07	Uri	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	D1
	<i>E. faecium</i>	227/05	Uri	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	-	P1
		163/07	Uri	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	R	P1
		232/07	Uri	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	P2
		234/07	Sg	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	P15
		235/07	Sg	S	S	R	R	R	R	S	I	R	R	S	R	P9
		248/07	Uri	S	S	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P6
		576/07	Uri	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	P8
		16/08	Uri	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P1
		131/08	Uri	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P1
		132/08	Uri	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P1
		158/08	Uri	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	I	I	P1
		183/08	Uri	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	I	P1
		287/08	Uri	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	P7
<b>20</b>	<i>E. faecalis</i>	70/02	LC	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	A8
		176/02	Uri	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	A8
		139/03	Sg	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	A8
		140/03	Sg	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	A8
		155/03	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A8
		166/03	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A8
		219/03	LC	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	-	-	D1
		32/04	Uri	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	-	-	A8
		42/04	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A8
		43/04	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	A8

## Anexo 1 cont.

Hospitais	Espécie	Nº cepa	Material clínico	Percentual de resistência												PFGE
				HLGR	HLSR	VAN	TEI	AMP	CIP	TET	CLO	RIF	ERI	LNZ	QD	Subtipos
		52/04	Sg	R	S	R	R	S	R	I	R	R	R	-	-	A8
		733/07	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	A8
		60/08	LC	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	A8
		90/08	LC	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	A8
		275/08	LC	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	S	R	A14
	<i>E. faecium</i>	165/05	Uri	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	-	M1
		184/05	Uri	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	-	P7
		87/06	Uri	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P1
		119/06	Sg	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	P1
		177/06	Uri	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	P12
		75/07	Uri	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P1
		181/07	Uri	S	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S	S	P6
		288/07	LC	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	P7
		399/07	Sg	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P4
		401/07	Uri	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	I	P4
		464/07	Uri	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P1
		231/08	Uri	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	I	P2
		235/08	LC	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	X2
<b>21</b>	<i>E. faecalis</i>	326/02	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	-	R	A1
<b>22</b>		75/05	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	A8
		164/05	Sg	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	-	A7
		310/08	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	A8
	<i>E. faecium</i>	288/08	Sg	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	P14
		289/08	Sg	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	P14

## Anexo 1 cont.

Hospitais	Espécie	Nº cepa	Material clínico	Percentual de resistência												PFGE	
				HLGR	HLSR	VAN	TEI	AMP	CIP	TET	CLO	RIF	ERI	LNZ	QD	Subtipos	
23	<i>E. faecalis</i>	241/05	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	A14	
		257/05	Sg	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	A9	
24	<i>E. faecium</i>	112/06	Uri	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P6	
		120/06	Uri	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	P6	
		121/06	Uri	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P6	
		246/08	Sg	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	P12	
25	<i>E. faecalis</i>	7/06	Uri	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	A11	
		16/06	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	A8	
		34/06	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	A8	
		43/06	Sg	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	A9	
		46/06	Sg	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	S	-	D2	
		6/06	Uri	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	-	Q	
		21/06	Uri	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	-	P1	
		48/06	Uri	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	-	P1	
		83/06	LC	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	-	P6
		136/06	Uri	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	P16
26	<i>E. faecalis</i>	162/07	Sg	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	D1	
		266/07	Sg	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	D1	
		165/08	LC	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	D1	
		299/08	Uri	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	D1	
		417/07	Sg	S	S	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P1	
		601/07	Uri	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	P12	
		215/08	LC	S	R	R	R	R	R	-	I	R	R	S	S	P6	
		297/08	Sg	S	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	X1

HLGR: alto nível de resistência à gentamicina; HLSR: alto nível de resistência à estreptomicina; PFGE: eletroforese em gel de campo pulsado; LC: líquidos cavitários; Sg: sangue; Uri: urina; R: resistente; I: intermediário; S: sensível.