Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Rachel Leite Ribeiro

Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Enterococcus* isoladas em um hospital universitário da cidade do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2008

Rachel Leite Ribeiro

Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Enterococcus* isoladas em um hospital universitário da cidade do Rio de Janeiro

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Dra.Vânia Lúcia Carreira Merquior

Rio de Janeiro

2008

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

R484 Ribeiro, Rachel Leite.
Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Enterococcus* isoladas em um hospital universitário da cidade do Rio de Janeiro / Rachel Leite Ribeiro – 2008.
121 f.

Orientadora: Vânia Lúcia Carreira Merquior.
Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. *Enterococcus* - Teses. 2. Agentes antiinfecciosos - Teses. 3. Drogas -- Resistencia em microorganismos – Teses. 4. Biofilme – Teses. 5. Resistência Microbiana a Medicamentos. I. Merquior, Vânia Lúcia Carreira. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 576.8.06

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Rachel Leite Ribeiro

Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Enterococcus* isoladas em um hospital universitário da cidade do Rio de Janeiro

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de abril de 2008.

Banca Examinadora: _____

Prof.ª Dra. Vânia Lúcia Carreira Merquior (Orientadora)

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____

Prof.ª Dr. Arnaldo Feitosa Braga de Andrade

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Elizabeth de Andrade Marques

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Angela Correa de Freitas Almeida

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____

Prof.ª Dra.Alice Gonçalves Martins Gonzales

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2008

DEDICATÓRIA

À minha mãe Guilhermina

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença em todos os momentos da minha vida.

A minha mãe Guilhermina, minhas irmãs Christian e Bethania, pelo amor, paciência e pelo eterno apoio em todos os momentos da minha vida e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus eternos amigos, Robson de Souza Leão, Silvia Elaine Macedo Torres, Grasiella Maria Ventura Matioszek, Ana Paula D'Alincourt de Carvalho Assef e Felipe Piedade Gonçalves Neves, pelo simples fato de serem meus amigos, pelo apoio, pelo carinho e pelo companheirismo de sempre.

A minha orientadora Vânia Lúcia Carreira Merquior, pela amizade, dedicação, apoio e pelo carinho maternal nesses doze anos de convívio.

As professoras Elizabeth de Andrade Marques, Mara Lucia Penna Queiroz e Maria Cristina Maciel Plotkowski pelo carinho com que sempre me trataram e pelos ensinamentos.

Ao professor Arnaldo Feitosa Braga de Andrade, pela revisão deste trabalho.

A professora Lúcia Martins Teixeira, por permitir a execução de uma parte deste trabalho em seu laboratório.

Aos amigos especiais da Microbiologia, Alex Ferreira, Rosana Helena Pereira, Carla Freitas pela ajuda constante e pelos bons momentos compartilhados nesta jornada.

Aos amigos da UFRJ, Fabíola Kegele, Camille Moura, Clarissa Christiano, Giseli Wienen, Felipe Cruz, Jaqueline Morais e Filomena Rocha, pela alegria com que me receberam e pelos bons e engraçados momentos no Lab 27.

As companheiras de casa e amigas, Izabella Freitas, Lívia Santiago e Carolina Muzitano, pelo convívio, pelos momentos de alegria e de tristeza, por liberarem o computador sempre que eu precisei e por enlouquecerem comigo durante a execução deste trabalho.

Aos queridos amigos Bruno Silva, Carolina Bastos, Mariana Oliveira, Perla Vasconcelos, Janaína Fernandes e Angela Miosso que mesmo não entendendo nada de Microbiologia sempre me ouviram.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia: em especial, Márcia Jones e Denílson Batista, pela ajuda e o carinho de sempre.

A Coordenação do Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas representada pelos Professores Geraldo Moura Batista Pereira e João Ramos da Costa Andrade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Todo o conhecimento é uma resposta a uma pergunta.

Gaston Bachelard

RESUMO

RIBEIRO, Rachel Leite. **Caracterização fenotípica e molecular de amostras de Enterococcus isoladas em um hospital universitário da cidade do Rio de Janeiro**. 2008. 121f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Os enterococos estão amplamente distribuídos no ambiente. Nos seres humanos, compõem a microbiota do trato gastrintestinal, da cavidade oral e do trato geniturinário. Nas últimas décadas, esses microrganismos se tornaram importantes agentes etiológicos de infecções hospitalares. Uma característica marcante desses microrganismos é a resistência intrínseca a vários antimicrobianos utilizados habitualmente no tratamento de infecções, além de alguns fatores que tem sido relacionado à virulência de enterococos. Este estudo investigou a presença de enterococos em amostras de infecção e colonização de pacientes hospitalizados, profissionais de saúde, dietas hospitalares e manipuladores de alimentos. Foram analisadas 276 amostras de colonização, de quadros de infecção, dietas orais e manipuladores de alimento. Não foram recuperadas amostras dos profissionais de saúde. Todas as amostras foram submetidas a testes convencionais de caracterização do gênero e espécies. Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foram empregados pelo método de disco difusão, além da CIM para vancomicina e teicoplanina. A produção de biofilme e a expressão da gelatinase também foram avaliadas. Os genes de resistência a gentamicina, estreptomicina e vancomicina e os genes de virulência *cyl*A, *esp* e *fsr* foram pesquisados pela técnica de PCR. O polimorfismo genético foi determinado por PFGE. A espécie *E. faecalis* foi a prevalente nas amostras isoladas de colonização e infecção (42,2% e 81,9%, respectivamente). *E. casseliflavus* (58,9%) foi a mais freqüente dentre as amostras das dietas hospitalares e *E. faecium* (46,7%) de manipuladores. Dentre as amostras de colonização as maiores taxas de resistência foram observadas para eritromicina (76,3%) e ciprofloxacina (53,9%). Dentre as amostras de infecção, >70% foram resistentes a eritromicina, ciprofloxacina e tetraciclina. Resistência a níveis elevados de gentamcina (HLR-GE) e estreptomicina (HLR-ST) foi detectada em 24,6% e 20,4% das amostras, respectivamente, e todas foram portadoras dos respectivos genes. A maioria das amostras de colonização (52,6%) e infecção (55,7%) foram multirresistentes. A taxa para resistência a níveis elevados de vancomicina foi de 5,2% e todas eram portadoras do gene *vanA*. Em relação a formação de biofilme, 70,2% foram produtoras, com uma maior freqüência dentre as de infecção. A expressão de gelatinase foi detectada em 28,9% e 44,3% das amostras de colonização e infecção, respectivamente. Nenhuma das amostras isoladas das dietas hospitalares e de manipuladores expressou gelatinase. Nas amostras pertencentes as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* (n=109) 16,5%, 51,4% e 48,6% apresentaram produtos de amplificação referentes aos genes *cyl*A, *esp* e *fsr*, respectivamente. A análise do polimorfismo genético revelou uma extensa diversidade dentre as amostras pertencentes as espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, não acarretando um perfil eletroforético prevalente. Entretanto, foi observado um perfil único dentre as amostras de *E. gallinarum* resistentes a vancomicina (vanA). Este estudo mostrou que amostras de enterococos isoladas de diferentes fontes, não só de quadros infecciosos, podem representar um risco para a população, apontando para uma maior reflexão quanto ao papel desses microrganismos nas infecções humanas, particularmente no ambiente hospitalar.

Palavras-chave: *Enterococcus*. Resistência à antimicrobianos. Multirresistencia. Biofilme.

ABSTRACT

RIBEIRO, Rachel Leite. **Phenotypic and molecular characterization of strains of Enterococcus isolated in a university hospital in the city of Rio de Janeiro.** 2008. 121f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Enterococci are widespread in the nature. In humans, as in the other animals, gastrointestinal tract, the oral cavity and the genitourinary tract. In recent decades, these microorganisms have emerged as one important of the most pathogen associated with nosocomial infections. They shows intrinsic resistance to several antimicrobial commonly used for treatment of the infections. Several potential virulence factors have been identified in enterococci, but none has been established as having a major contribution to virulence in humans, as well as some factors that has been linked to the virulence of enterococci. We analyzed 276 isolates obtained from colonization, infection, hospital diets and food handlers. The isolates were identified by conventional physiological tests for characterization at genus and species level. Antimicrobial susceptibilities were determined by the disk diffusion test method. CIM to vancomycin and teicoplanin were avayable by E-test. The biofilm production and the expression of gelatinase were also evaluated. The genes for resistance to gentamicin, vancomycin, streptomycin resistance genes as code as determinants virulence *cyl*A, *esp* and *fsr* were investigated by PCR. The genetic polymorphism was determined by PFGE. *E. faecalis* was prevalent species recovered from colonization and infection (42.2% and 81.9%, respectively). *E. casseliflavus* (58.9%) was frequent species among the hospital diets samples. On the other hand, *E. faecium* (46.7%) was prevalent in food handlers. Among the colonization isolates the highest rates of resistance were observed to erythromycin (76.3%) and ciprofloxacin (53.9%). Although, >70% of infection isolates were resistant to erythromycin, tetracycline and ciprofloxacin. High level resistance to gentamicin (HLR-GE) and streptomycin (HLR-ST) were detected in 24.6% and 20.4% of the samples, respectively, and these isolates harboured the genes aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia and aph(2")-Ic. Most strains of colonization (52.6%) and infection (55.7%) were multidrug resistant. High level resistance to vancomycin were detected in 5.2% of isolates harbouring vanA gene. 70.2% of the isolates were biofilm producers, were greater frequency among of infection. The expression of gelatinase was detected in 28.9% and 44.3% of colonization and infection isolates, respectively. None of the isolates recovered from the hospital diets and food handlers expressed gelatinase. In *E. faecalis* and *E. faecium* strains (n = 109) 16.5%, 51.4% and 48.6% showed amplification products related *cyl*A, *esp* and *fsr* genes, respectively. The analysis of genetic polymorphism showed a wide diversity among the isolates belonging to the *E. faecalis* and *E. faecium* species. None prevalent profile was observed. The *E. gallinarum* vanc1/vanA isolates showed identical PFGE profiles. This study showed that enterococci strains isolated from diferents sources, also represents a potential risk for population, particularly those in hospital environment.

Keywords: Enterococcus. Resistance to antimicrobials. Multidrug resistance. Biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Quadro 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção dos genes responsáveis pela expressão de resistência a gentamicina, estreptomicina e vancomicina, por metodologia de PCR..... 54

Quadro 2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção dos genes responsáveis pela expressão de fatores de virulência, por metodologia de PCR 55

Figura 1 – Perfis de proteínas totais representativos de amostras de *Enterococcus*, obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida adicionado de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)..... 64

Figura 2 – Géis representativos da detecção por técnica de PCR dos produtos de amplificação dos genes *aac(6')Ie-aph(2'')Ia* (A) e *ant(6')Ia* (B), responsáveis pelos fenótipos HLR-GE e HLR-ST, respectivamente, em amostras de *Enterococcus*..... 71

Figura 3 – Géis representativos da detecção por técnica de PCR dos produtos de amplificação dos genes *vanC1* (A) e *vanA* (B)..... 72

Figura 4 – Imagem representativa da detecção da formação de biofilme, em placas de microtitulação, por amostras de *Enterococcus* 73

Figura 5 – Gel representativo da detecção, por metodologia de PCR, de produtos de amplificação referentes aos genes *esp* (933 pb) e *cylA* (517 pb) em amostras de *Enterococcus*..... 76

Figura 6 – Perfis de fragmentação do DNA cromossômico, obtidos após digestão com *SmaI* e separação por eletroforese em campo pulsado de amostras de *E. faecium*..... 80

Figura 7 – Perfis de fragmentação do DNA cromossômico, obtidos após digestão com *SmaI* e separação por eletroforese em campo pulsado de amostras de *E. gallinarum* portadoras dos genes vanA e vanC-1..... 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características fenotípicas utilizadas para a identificação das espécies de *Enterococcus* e algumas espécies fisiologicamente relacionadas..... 46

Tabela 2 – Distribuição dos antimicrobianos utilizados pelos 122 pacientes avaliados neste estudo, em relação ao número de tratamentos e ao número de pacientes em tratamento durante o período de coleta do material clínico..... 58

Tabela 3 – Distribuição dos antimicrobianos utilizados pelos pacientes que apresentaram cultura positiva e negativa para enterococos..... 60

Tabela 4 – Freqüência e distribuição das espécies de *Enterococcus* por origem de isolamento..... 62

Tabela 5 – Variações fisiológicas das 276 amostras de *Enterococcus* identificadas neste estudo..... 63

Tabela 6 – Distribuição das taxas de resistência, determinadas por testes de difusão em ágar, de amostras de *Enterococcus* em relação à origem de isolamento..... 65

Tabela 7 – Distribuição das taxas de resistência, determinadas por testes de difusão em ágar, em relação às espécies de *Enterococcus*..... 67

Tabela 8 – Taxas de resistência em relação ao número de classes de antimicrobianos testados..... 68

Tabela 9 – Distribuição das amostras de *Enterococcus* apresentando características de resistência a múltiplos antimicrobianos (multirresistência) em relação ás Unidades Hospitalares de origem..... 69

Tabela 10- Distribuição das amostras de *Enterococcus* apresentando fenótipos de resistência a níveis elevados dos aminoglicosídeos gentamicina (HLR-GE), estreptomicina (HLR-ST) ou ambos..... 70

Tabela 11- Distribuição das 191 amostras de *Enterococcus* de acordo com a origem de isolamento e a categoria de produção de biofilme..... 74

Tabela 12- Distribuição das 191 amostras de *Enterococcus* em relação as espécies identificadas e respectiva freqüência para cada categoria de produção de biofilme..... 74

Tabela 13- Expressão de gelatinase em amostras de *Enterococcus* em relação as espécies e origem de isolamento..... 75

Tabela 14- Freqüência de amostras das espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus*

faecium portadoras de genes codificadores de atributos de virulência, avaliados por metodologia de PCR, em relação à origem de isolamento..... 77

Tabela 15- Distribuição das amostras de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* em relação ao número de marcadores fenotípicos e genotípicos de virulência..... 78

Tabela 16- Distribuição das amostras de *E. faecalis* e *E. faecium* entre os perfis de virulência que foram prevalentes neste estudo..... 79

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	**MATERIAL E MÉTODOS**	38
1.1	**Desenho do Estudo e Amostras Bacterianas**	38
1.2	**Estudo Prospectivo**	38
1.2.1	Coleta e isolamento das amostras obtidas de colonização	39
1.2.2	Coleta e isolamento das amostras obtidas de alimentos	40
1.3	**Estudo Retrospectivo**	40
1.3.1	Recuperação e Manutenção das Amostras Bacterianas	41
1.4	**Aspectos Éticos**	41
1.5	**Caracterização Fisiológica das Amostras Bacterianas**	41
1.5.1	Produção da Catalase	42
1.5.2	Hidrólise da Esculina em presença de Bile	42
1.5.3	Crescimento em presença de NaCl a 6,5%	42
1.5.4	Hidrólise de L-pirrolidonil-β-naftilamida (Teste do PYR) e de L-leucina-β-naftilamida (Teste do LAP)	43
1.5.5	Produção de Pigmento	43
1.5.6	Motilidade	43
1.5.7	Descarboxilação da Arginina	44
1.5.8	Utilização do Piruvato de Sódio	44
1.5.9	Utilização de carboidratos	44
1.6	**Análise dos Perfis de Proteínas Totais**	45
1.6.1	Obtenção dos Extratos Protéicos	45
1.6.2	SDS-PAGE	47
1.7	**Determinação da Susceptibilidade aos Antimicrobianos**	47
1.7.1	Testes de Difusão em Ágar	47
1.7.2	Antibiotipagem	48
1.7.3	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para Vancomicina e Teicoplanina	49
1.8	**Detecção da Expressão de Fatores de Virulência**	49
1.8.1	Formação de Biofilme	49
1.8.2	Gelatinase	50

1.9 **Detecção de Genes Envolvidos na Expressão de Resistência aos Antimicrobianos**..... 50
1.9.1 Obtenção do DNA molde..... 51
1.9.2 Detecção de genes codificadores de HLAR..... 51
1.9.3 Detecção de genes codificadores de resistência a vancomicina..... 51
1.9.4 Eletroforese..... 52
1.10 **Detecção de Genes Envolvidos na Expressão de Fatores de Virulência**.... 52
1.10.1 Obtenção do DNA molde..... 52
1.10.2 Detecção de genes de virulência..... 53
1.10.3 Eletroforese..... 53
1.11 **Análise dos Perfis de Fragmentação do DNA Cromossômico por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)**..... 55
1.11.1 Preparo das Amostras..... 55
1.11.2 Eletroforese..... 56
1.11.3 Avaliação dos Resultados..... 56
2 **RESULTADOS**..... 57
2.1 **Fenótipos e Genótipos de Resistência aos Antimicrobianos**..... 64
2.2 **Detecção de Fenótipos e Genótipos de Virulência**..... 72
2.3 **Análise dos Perfis de Fragmentação do DNA Cromossômico por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)**..... 79
3 **DISCUSSÃO**..... 82
4 **CONCLUSÃO**..... 96
REFÊRENCIAS..... 98

INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* foi primeiramente descrito em 1984 por Schleifer & Kilper-Bälz, e é composto de cocos Gram-positivos, dispostos isolados, aos pares ou em cadeias curtas, anaeróbios facultativos e que não possuem enzimas citocromo oxidase. Apesar de sua temperatura ótima de crescimento ser 35ºC, a maioria das amostras é capaz de crescer na faixa entre 10ºC e 45ºC, além de tolerar temperaturas elevadas por longos períodos de tempo (60ºC/ 30 min). Esses microrganismos também são capazes de crescer em meios ácidos ou alcalinos e hipotônicos ou hipertônicos (crescem em meios contendo 6,5% de cloreto de sódio) (Murray, 1990).

Outras características específicas do gênero *Enterococcus* são: a capacidade de hidrolisar esculina na presença de 40% de sais biliares, e a produção das enzimas pirrolidonilarilamidase e leucina aminopeptidase responsáveis pela hidrólise dos substratos L-pirrolidonil β-naftilamida (teste do PYR) e L-leucina β-naftilamida (teste do LAP), respectivamente.

Os enterococos são homofermentativos, não produzem gás e o ácido lático é o produto final da fermentação da glicose. A maioria das amostras apresenta um antígeno associado à parede celular, que é identificado como antígeno do grupo D de Lancefield, sendo que sua detecção depende da eficácia do procedimento de extração e da qualidade do anti-soro utilizado (Facklam, Sahm & Teixeira, 1999).

Para facilitar a caracterização das espécies de *Enterococcus*, Teixeira e Facklam, em 2003, propuseram um esquema simplificado constituído de duas etapas. A primeira separa os enterococos em grupos fisiologicamente distintos, baseada em provas bioquímicas, tais como a produção de ácidos a partir dos açúcares manitol, sorbose e sorbitol e a descarboxilação do aminoácido arginina. Por fim, as espécies são identificadas por testes adicionais, que incluem a fermentação de outros açúcares como arabinose, rafinose, sacarose e metil-α-D-glicopiranosídeo (MGP), utilização do piruvato de sódio, capacidade de crescer em meio contendo 0,04% de telurito, produção de pigmento e mobilidade.

Atualmente, o gênero *Enterococcus* é composto por 36 espécies, discriminadas com base na quimiotaxonomia e em estudos filogenéticos, a saber: *E. aquimarinus*, *E. asini*, *E. avium*, *E. caccae*, *E. camelliae*, *E. canintestini*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. devriesei*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E.*

gallinarum, E. gilvus, E. haemoperoxidus, E. hawaiiensis, E. hermanniensis, E. hirae, E. italicus, E. malodoratus, E. moraviensis, E. mundtii, E. pallens, E. phoeniculicola, E. pseudoavium, E. raffinosus, E. ratti, E. saccharolyticus, E. sanguinicola, E. silesiacus, E. sulfureus, E. termitis e *E. villorum* (Carvalho *et al*., 2006; Svec *et al*., 2006; Teixeira *et al*., 2007; Sukontasing *et al*., 2007). Porém, já foi declarado que o arranjo filogenético do gênero *Enterococcus* ainda não está bem elucidado e é provável que reclassificações, ainda sejam necessárias (Svec *et al*., 2006; Teixeira *et al*., 2007). Até o momento, sabe-se que cinco espécies inicialmente nomeadas como pertencentes ao gênero *Enterococcus* já foram realocadas: *E. seriolicida* transferida para *Lactococcus garviae* (Teixeira *et al*., 1996); *E. porcinus* para *E. villorum* (De Graef *et al*., 2003); *E. solitarius* para *Tetragenococcus solitarius* (Ennahar & Cai, 2005); *E. flavescens* para *E. casseliflavus*; e *E. saccharominimus* para *E. italicus* (Naser *et al*., 2006).

A caracterização fisiológica das espécies de enterococos é complexa e eventualmente são isoladas amostras apresentando diversas atipias. Adicionalmente, a identificação precisa de algumas espécies é ainda mais dificultada por exibirem, de forma característica, um comportamento fisiológico "incomum" ao gênero. Por exemplo, amostras de *E. haemoperoxidus* podem ser positivas no teste da catalase (Svec *et al*., 2001); e *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. pallens*, *E. saccharolyticus* e algumas amostras de *E. cannisteni*, *E. devriesei* e *E. moraviensis* não hidrolizam o L-pirrolidonil β-naftilamida, sendo negativas no teste do PYR (Teixeira *et al*., 2007). Para todos esses casos, é recomendada a utilização de técnicas moleculares que auxiliem na confirmação da caracterização dessas amostras (Teixeira *et al*., 1995; Jurkovic *et al*., 2006). Dentre as mais referendadas encontra-se o emprego da análise dos perfis eletroforéticos de proteínas totais em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), que é uma ferramenta bastante confiável e de simples execução na caracterização das espécies do gênero (Merquior *et al.* 1994). A metodologia de amplificação em cadeia da polimerase (PCR, *Polymerase chain reaction*) também tem sido utilizada na identificação de diferentes "seqüências-alvo", que sejam espécie e/ou gênero-específicas, particularmente nos genes *16S rRNA*, que codifica o RNA ribossomal 16S (Monstein *et al*., 1998; Patel *et al*., 1998; Fortina *et al*., 2007) e *tuf*, responsável pela expressão do fator de elongação EF-Tu, envolvido na formação da cadeia peptídica durante a síntese protéica (Ke *et al*., 1999).

Os *Enterococcus* estão amplamente distribuídos no ambiente, em habitats variados. De modo geral, nos mamíferos, o habitat natural dos enterococos é o trato

gastrintestinal (aproximadamente 10^5-10^7 unidades formadoras de colônia por grama de fezes – UFC/g). Nos seres humanos, também, fazem parte da microbiota do trato geniturinário e da cavidade oral, sendo encontrados colonizando 100% dos indivíduos adultos sadios (Kaiser, 2003; McBride *et al*., 2007).

Apesar de não ser observada uma relação estrita entre uma determinada espécie de enterococos e um hospedeiro específico, já foram relatadas diferenças na predominância em algumas situações. Por exemplo, *E. faecalis* e *E. faecium* são as mais freqüentes nos casos de infecção e colonização em seres humanos. Por outro lado, *E. columbae*, *E, asini* e *E. villorum* são as espécies de enterococos prevalentes em aves (pombos), asininos e suínos, respectivamente (Teixeira *et al*., 2007).

A colonização de animais e seres humanos por diferentes espécies de enterococos está ainda sujeita a variações associadas a fatores variados, tais como dieta, idade, localização geográfica e efeitos sazonais. Em estudos comparativos foi demonstrado que a espécie *E. faecium* foi prevalente nas fezes de indivíduos residentes em países onde a dieta vegetariana é predominante (como por exemplo, Índia e Japão). Por outro lado, *E. faecalis* foi sempre encontrada em proporções bem mais elevadas do que as demais espécies, em avaliações epidemiológicas em países como Inglaterra, Escócia e Estados Unidos, onde são comuns outros tipos de dietas (Chenowett *et al*., 1990; Kayser, 2003).

Resistência aos Antimicrobianos

Uma característica marcante desses microrganismos é a resistência intrínseca a vários antimicrobianos empregados habitualmente no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram positivas. O termo resistência intrínseca é utilizado para designar fenótipos que representam propriedades inerentes a determinadas espécies ou gêneros bacterianos. Este tipo de resistência é codificado por genes cromossômicos e, em enterococos, inclui a resistência as sulfanamidas, aos beta-lactâmicos, a clindamicina e a concentrações baixas de aminoglicosídeos e vancomicina (Morrisson *et al*., 1997; Klare *et al*., 2003). Adicionalmente, amostras de enterococos têm adquirido com freqüência genes de resistência a múltiplos agentes antimicrobianos tais como, cloranfenicol, eritromicina, fluoroquinolonas, tetraciclina e a concentrações elevadas de beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e glicopeptídeos. Mecanismos de resistência adquirida são decorrentes de mutações ou aquisição de moléculas de DNA extra-cromossômicas, como plasmídeos e transposons (Murray, 1990; Suntharam *et al*., 2002; Franz *et al*., 2003).

Em enterococos, a resistência a níveis elevados de beta-lactâmicos está associada a dois mecanismos principais: a hiperprodução de proteínas que ligam penicilina (PBP, *Penicillin Binding Protein*) com afinidade reduzida para beta-lactâmicos ou a produção de beta-lactamase. A ação bactericida de agentes beta-lactâmicos depende da capacidade de inibir estágios finais da síntese do peptideoglicano por inativação das PBPs, que apresentam atividades de transpeptidases, carboxipeptidases e transglicosilases, *in vivo*. Dentre as diferentes classes de PBPs, pode-se afirmar que as PBPs 1, 2 e 3 possuem alta afinidade para a penicilina, enquanto as PBPs 4 e 6 apresentam baixa afinidade. E, ainda, a PBP 5 é a que possui menor afinidade por este antimicrobiano. Amostras exibindo resistência a níveis elevados de penicilina (Concentração Inibitória Mínima – CIM, de até 512μg/mL) têm sido identificadas com maior freqüência, particularmente na espécie *E. faecium*. Os mecanismos de resistência envolvidos correspondem a hiperprodução da PBP5 e/ou mutações em genes (por exemplo, *pbp5*), levando à diminuição, ainda mais significativa, de sua afinidade (Rybkine *et al.*, 1998; Jureen *et al*., 2003).

O primeiro relato de enterococos produtores de beta-lactamase foi em Houston, Texas, EUA, por Mederski-Samoraj & Murray, em 1983. Desde então, a freqüência de isolamento destas amostras é extremamente rara, tendo sido relatadas em apenas poucos episódios (Lopardo *et al*., 1990; Rhinehart *et al.*, 1990; Murray *et al.*, 1991). Conforme descrito por Murray (1998), o gene responsável pela produção da penicilinase em enterococos tem elevado grau de homologia com o gene que codifica a penicilinase A em estafilococos, porém aparentemente esta característica não se perpetuou entre as espécies do gênero.

O mecanismo de resistência intrínseca aos aminoglicosídeos, característico de enterococos, resulta em valores de CIM que podem variar de 16μg/mL a 64μg/mL. Esse fenótipo é decorrente de um defeito na energização oxidativa da membrana citoplasmática, resultando em uma redução do transporte ativo da droga para o interior da célula bacteriana (Leclercq, 1997). Quando este é o único mecanismo expresso, para este grupo de antimicrobianos, a associação de um aminoglicosídeo com um agente que atue interferindo na formação da parede celular, resulta em efeito sinérgico bactericida, comumente empregado como regime terapêutico nas enterococcias graves (Murray, 1990).

Já, a resistência adquirida a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLAR, do inglês *High-Level Aminoglycoside Resistance*) é decorrente de dois mecanismos

diferentes: alteração no sítio alvo nos ribossomos e inativação por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs). O primeiro é conseqüência de mutações cromossômicas, enquanto o segundo é mediado pela aquisição de genes localizados em plasmídeos transferíveis e transposons (Murray, 1998).

O fenótipo HLAR para estreptomicina (HLR-ST) pode ser decorrente da alteração de proteínas-alvo presentes no ribossomo ou também pode ocorrer devido à produção de EMAs. Neste último, a enzima ANT(6)-I, codificada pelo gene *ant(6)-Ia*, é a mais comumente detectada em enterococos, determinando valores elevados de concentração inibitória mínima (CIM>2.000 μg/mL).

A demonstração de que algumas amostras de enterococos eram resistentes a níveis elevados de estreptomicina levou ao aumento no uso de gentamicina, que associada a uma penicilina, passou a ser a escolha para o tratamento das infecções enterocócicas graves (por exemplo, endocardites). Subseqüentemente, decorrente da maior pressão seletiva, emergiram amostras de enterococos resistentes a níveis elevados de gentamicina (HLR-GE, CIM>500μg/ml). Quando a resistência a níveis elevados de gentamicina e estreptomicina ocorre na mesma amostra de enterococos perde-se o regime terapêutico bactericida confiável e conseqüentemente não há mais terapia ideal para endocardite enterocócica (Murray, 1998).

O fenótipo HLR-GE resulta, predominantemente, da expressão dos genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')Ib*, *aph(2'')Ic* e *aph(2'')Id*. A enzima AAC(6')-APH(2") é mais freqüentemente encontrada em enterococos e apresenta atividade bifuncional de acetiltransferase e de fosfotransferase. A expressão dessa enzima, codificada pelo gene correspondente, *aac(6´)-Ie-aph(2")-Ia* encontrado em plasmídeos conjugativos, confere resistência a todos os aminoglicosídeos comercialmente disponíveis, exceto estreptomicina (Donabedian *et al*., 2003; Lester *et al*., 2004; Qu *et al*., 2005).

As outras EMAs que têm sido associadas a amostras de *Enterococcus* são menos freqüentes. A enzima APH(2")-Ic, codificada pelo gene *aph(2")-Ic* foi responsabilizada pela ocorrência de resistência a níveis elevados de gentamicina (CIM=256μg/mL) em amostras de *E. faecalis* e de *E. gallinarum*, nos estudos desenvolvidos por Bantar *et al*. (1993) e Chow e colaboradores (1997), respectivamente. Enquanto que, Tsai *et al*. (1998) atribuíram a presença desta característica de resistência à detecção em amostras de *E. casseliflavus* da enzima APH(2")-Id e Kao *et al*. (2000) descreveram em *E. faecium* a ocorrência de APH(2")-Ib.

A partir dos primeiros relatos de amostras apresentando HLAR, a freqüência de infecções causadas por enterococos com esta característica tem aumentado significativamente (Watanakunakorn, 1992; Handwerger *et al*., 1993; Antalek *et al*., 1995; Vandamme *et al*., 1996; Merquior *et al*., 1997; Ma *et al*., 1998; Barisic & Punda-Polic, 2000; Lopes *et al*., 2006).

No Brasil, um estudo de freqüência de fenótipos de HLAR em amostras isoladas de infecções em pacientes provenientes de duas instituições hospitalares na cidade do Rio de Janeiro, revelou índices de 30,5% e 42,6% de amostras exibindo HLR-GE e HLR-ES, respectivamente (Netz, 1998). Estudo similar, realizado com amostras de enterococos obtidas de colonização intestinal de pacientes hospitalizados, revelou índices de 67,5% e 24% das amostras apresentando HLAR para os mesmos antimicrobianos (Cappelli, 1999). Outros relatos no Brasil apontaram percentuais similares (Stern *et al*., 1994; Carvalho, 1998; Mendonça, 1998; Albuquerque, 2000; Paula, 2000; Teixeira *et al*., 2001; Mondino *et al*., 2003).

Os antimicrobianos da classe dos macrolídeos (particularmente eritromicina) constituem uma terapia alternativa para o tratamento de enterococcias, tanto em humanos quanto animais (Butaye *et al*., 2001). Entretanto, três diferentes mecanismos de resistência já foram descritos em bactérias Gram positivas. São eles: alteração na fração 23S dos ribossomos, mecanismos de efluxo ativo da droga, codificado pelos genes *mef*, *msr* e *mre*, além de inativação enzimática por metilases, cujos genes correspondem a *ermA*, *ermB* e *ermC*. Os genes *mef* e *msrC* já foram descritos em enterococos (Clancy *et al*., 1997; Luna *et al*., 1999; Jensen *et al*., 1999). Entretanto, Portillo e colaboradores (2000) revelaram a prevalência absoluta do gene *ermB* em amostras resistentes a níveis elevados de eritromicina (CIM≥128μg/mL).

Em estudos nos quais perfis de resistência aos antimicrobianos foram avaliados, é destacada a freqüência elevada de enterococos resistentes à tetraciclina, tanto entre amostras de origem clínica quanto de alimentos. Os mecanismos de resistência à tetraciclina, em enterococos, estão associados à presença dos genes *tet*, que codificam a expressão de proteínas que protegem o alvo ribossomal, codificadas pelos genes *tetM*, *tetO* e *tetS*, e bombas de efluxo dependentes de energia, codificadas pelos genes *tetK* e *tetL* (Aarestrup *et al*., 2000; Butaye *et al*., 2001; Chopra *et al*., 2001; Leener *et al*., 2005; Cauwerts *et al*., 2007).

Mecanismos de resistência adquirida, também, já foram descritos para outros antimicrobianos, tais como: cloranfenicol através da expressão da enzima cloranfenicol

acetiltransferase (reconhecida pela sigla CAT) ou por efluxo ativo da droga; fluoroquinolonas, especialmente norfloxacina, por alteração da subunidade A da enzima DNA girase ou, também, por efluxo da droga (Nakanishi *et al.*, 1991; Lynch *et al.*, 1997).

Somando-se ao destacado "arsenal de resistência" presente em enterococos, pode-se observar, no final da década de 80, a emergência de amostras resistentes a níveis elevados de glicopeptídeos, particularmente vancomicina. A vancomicina é um agente alternativo no tratamento de enterococcias e, na maioria das vezes, é a droga de escolha quando a terapia sinérgica com beta-lactâmicos e aminoglicosídeos falha. No entanto, desde 1986, mecanismos de resistência adquirida à vancomicina em amostras de enterococos vêm sendo descritos com maior freqüência, em diferentes países, inclusive no Brasil (Chavers *et al*., 2003; Amyes *et al*., 2007).

Amostras de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE, *Vancomycin-Resistant Enterococci*) têm emergido como uma das mais importantes causas de infecções hospitalares, principalmente entre pacientes imunodeprimidos. Além disso, amostras de enterococos combinando mecanismos de resistência a este antimicrobiano e HLAR, praticamente, excluem todas as alternativas terapêuticas disponíveis (CDC, 1999; Kawalek *et al*., 2001; Rice, 2001; Novais *et al*., 2002; Simonsen *et al*., 2003; Amyes *et al*., 2007).

Amostras VRE apresentam elevada capacidade de disseminação, sendo rapidamente transmitidas de paciente para paciente, configurando situações de surto e/ou endemicidade, em várias instituições de todo o mundo. Atualmente, essas amostras são endêmicas em diversos hospitais norte-americanos e a prevalência vem se mantendo crescente em vários países europeus (HICPAC, 2003; Novais *et al*., 2004). Acredita-se que a aquisição de VRE, nos EUA, ocorra principalmente no ambiente hospitalar, onde a pressão seletiva do uso terapêutico e profilático de antimicrobianos levaria a emergência de amostras resistentes (Mascini & Boten, 2005; Tenover & McDonald, 2005). Por outro lado, na Europa, casos de infecções hospitalares por VREs são esporádicos e essas amostras foram isoladas a partir de animais, o que sugere outras possíveis fontes de disseminação desses microrganismos, nesse continente. A adição do glicopeptídeo avoparcina nas rações animais, como promotor de crescimento, parece ter favorecido a emergência dessas amostras em algumas regiões da Europa (Del Campo *et al*., 2003; Goossens, 2005; Johnsen *et al*., 2005). No Brasil, dados quanto à caracterização e disseminação dessas amostras, nos estados do Paraná, São Paulo, Rio

de Janeiro, Rio Grande do Sul, Pernambuco e Minas Gerais, foram relatados (Dalla Costa *et al*., 1998; Zanella *et al*., 1999, 2003; Albuquerque *et al*., 2000; d´Azevedo *et al*., 2001, Vilela *et al*., 2006; Ribas *et al*., 2007).

Os antimicrobianos da classe dos glicopeptídeos interagem com resíduos C-terminais de D-Alanil-D-Alanina, precursores do peptideoglicano, bloqueando a síntese da parede celular por inibição das reações de transglicosilação e transpeptidação (Arthur & Courvalin, 1993). Nas amostras de enterococos sensíveis a vancomicina, o dipeptídeo D-Alanil-D-Alanina, formado pela enzima D-Ala-D-Ala ligase, é unido a um tripeptídeo para formar um precursor pentapeptídico do peptideoglicano, fundamental à síntese da parede celular bacteriana. O terminal D-Ala-D-Ala é o sítio alvo da vancomicina, que, uma vez ligada, impede a utilização do precursor pentapeptídico na síntese da parede celular.

A resistência aos glicopeptídeos, em enterococos, deve-se à síntese de precursores de peptideoglicano modificados, que apresentam uma afinidade reduzida pela vancomicina e teicoplanina, estando associada a diversos fenótipos intrínsecos ou adquiridos. Os diversos fenótipos de resistência descritos entre os enterococos são denominados de VanA, VanB, VanC, VanD, VanE e VanG. Os fenótipos VanA, VanB e VanD sintetizam o UDP-muramil-pentapeptídeo[D-Lactato] como principal precursor do peptideoglicano. Já os fenótipos VanC e VanE sintetizam o UDP-muramil-pentapetídeo[D-Serina] (Ambúr *et al*., 2002). Entretanto, os de maior impacto são: VanA, relacionado a resistência induzida a níveis elevados de vancomicina e teicoplanina; e VanB relacionado a resistência induzida a níveis variados de vancomicina e manutenção da susceptibilidade a teicoplanina (Ambúr *et al*., 2002; Courvalin, 2006).

VanA é induzido pela exposição do microrganismo a vancomicina, que resulta na expressão de diversas proteínas que, em conjunto, conferem resistência a níveis elevados do antimicrobiano (CIM $\geq$ 64μg/mL). Este fenótipo é codificado por um conjunto de sete genes, denominado conjunto *vanA*, presente no transposon Tn*1546*, ou em elementos relacionados, localizados geralmente em um plasmídeo de alta freqüência de transferência. Quando há exposição do microrganismo à vancomicina, ocorre a indução de diversas proteínas que em conjunto conferem resistência ao antimicrobiano (Robredo *et al*., 2000).

A proteína VanA é uma ligase, que tem sua síntese induzida na presença de vancomicina e dá origem a uma D-Alanil-D-X, onde X geralmente é o lactato. A

formação do D-Lactato leva à expressão de VanH, uma desidrogenase codificada pelo gene *vanH*. O peptídeo desidrogenado modificado, D-Ala-D-Lac, é unido ao tripeptídeo, resultando num precursor pentapetídico alterado. A vancomicina não se liga ao terminal D-Ala-D-Lac; logo, este pentapeptídeo modificado pode ser utilizado nas etapas seguintes da síntese da parede celular. A presença concomitante do precursor pentapetídico normal é contornada pela expressão de VanX, uma dipeptidase codificada pelo gene *vanX*, que cliva D-Ala-D-Ala, impedindo a sua ligação ao tripeptídeo. Além desta, o gene *vanY* codifica para a síntese de uma carboxipeptidase (VanY), que cliva a D-Alanina e o D-Lactato dos terminais D-Ala-D-Ala e D-Ala-D-Lac, respectivamente, resultando em precursores tetrapeptídicos, aos quais a vancomicina também não tem afinidade. Outros genes envolvidos no fenótipo VanA são o *vanR* e o *vanS*, que codificam proteínas relacionadas a detecção da presença de vancomicina extracelular e a sinalização intracelular, resultando na transcrição de *vanAHX*. Por fim, o gene *vanZ*, também presente no conjunto *vanA*, codifica a proteína VanZ, cujo papel ainda não é conhecido (Novais *et al*., 2004).

O fenótipo VanB expressa resistência induzida e transferível a vancomicina, porém as amostras permanecem sensíveis à teicoplanina. A maioria das proteínas, codificadas pelo conjunto gênico *vanA*, possui homólogos codificados pelo *vanB*, com exceção de VanZ. O conjunto *vanB* apresenta um gene adicional, o *vanW*, cuja função ainda é desconhecida (Murray, 1998). O conjunto gênico *vanB* pode estar localizado nos transposons *Tn1547*, *Tn1549* ou *Tn5382* (Quintiliani & Courvalin, 1996; Carias *et al.*, 1998; Garnier *et al.*, 2000). O transposon *Tn5382* também carreia genes de resistência a ampicilina e a tetraciclina e foi responsabilizado pela disseminação do conjunto gênico *vanB* entre amostras de *E. faecium* relacionadas a surtos descritos em vários estados norte-americanos (Hanrahan *et al*., 2000). O gene *vanB* apresenta regiões variáveis e já foi classificado em três subtipos denominados *vanB1*, *vanB2* e *vanB3* (Dahl *et al.*, 1999).

O fenótipo VanC confere resistência intrínseca a níveis baixos de vancomicina e é característico das espécies de enterococos móveis (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. casseliflavus-E. flavescens*). As enzimas VanC1, VanC2 e VanC2-VanC3 ligase, específicas dessas espécies, participam da síntese do pentapeptídeo da parede celular, pela adição do terminal D-Alanil-D-Serina, que apresenta uma menor afinidade pela vancomicina, do que D-Ala-D-Ala. O fenótipo de resistência a níveis baixos de vancomicina é decorrente da síntese híbrida da parede celular, pela utilização de ambos

os precursores. A CIM para vancomicina em *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* pode variar entre 2-32μg/mL e 2-8μg/mL, respectivamente, e os microrganismos permanecem sensíveis a teicoplanina (Toye *et al.*, 1997).

Reynolds *et al.* (1994) demonstraram que o mecanismo de resistência relacionado ao genótipo *vanC-1*, característico de *E. gallinarum*, envolve uma via alterada da síntese do peptideoglicano e hidrólise dos precursores normais da via sensível a vancomicina. O marcador VanC de *E. gallinarum* consiste de cinco genes: *vanC-1*, *vanXY(C)*, *vanT*, *vanR(C)* e *vanS(C)*. Destes, apenas três genes são necessários para expressar resistência: *vanC-1* que codifica uma ligase que sintetiza o dipeptídeo D-Ala-D-Ser para adição ao UDP-muramil-tripeptídeo; *vanXY(C)* que codifica uma D,D-dipeptidase-carboxipeptidase que hidrolisa D-Ala-D-Ala (atividade D,D-dipeptidase), removendo o resíduo D-Ala terminal do UDP-muramil-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys-D-Ala-D-Ala; e *vanT* que codifica uma serina racemase ligada à membrana, disponibilizando D-serina para biossíntese. Os genes *vanS(C)-vanR(C)* são componentes do sistema regulatório (Arias *et al*., 2000; Panesso *et al*., 2005).

Dutta & Reynolds (2002) verificaram que o marcador *vanC-2* da amostra de referência *E. casseliflavus* ATCC 25788, também, consiste de cinco genes, denominados *vanC-2*, *vanXY(C-2)*, *vanT(C-2)*, *vanR(C-2)* e *vanS(C-2)*, e apresenta organização semelhante a do marcador de *E. gallinarum*. Através de análise comparativa, os autores evidenciaram que as proteínas codificadas por ambos os marcadores apresentaram um considerável grau de similaridade. A D,D-dipeptidase-carboxipeptidase codificada pelo gene *vanXY(C-2)* exibiu 81% de identidade na seqüência de aminoácidos com a enzima codificada pelo gene *vanXY(C)*. Os produtos dos genes *vanR(C-2)* e *vanS(C-2)* mostraram identidade com os produtos dos genes *vanR(C)* e *vanS(C)* e compartilharam resíduos conservados importantes, como para a função de regulador da resposta e de histidina quinase, respectivamente. Já, as serina racemases [*vanT(C-2)* e *vanT*] apresentaram 65% de identidade entre suas seqüências de aminoácidos. Um fato importante observado por esses autores foi a necessidade de um longo período de indução para que a amostra *E. casseliflavus* ATCC 25788 expressasse a resistência à vancomicina, sugerindo que a disponibilidade de D-Ser teria um papel relevante nesse processo.

Em amostras de enterococos móveis, o fenótipo de VanC pode coexistir com outros conjuntos gênicos envolvidos na expressão de resistência à vancomicina como *vanA* e *vanB*. Resistência a níveis elevados de glicopeptídeos mediada pelo gene *vanA*

já foi descrita em amostras de *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*. A presença de *vanB* em amostras de enterococos móveis, mais especificamente em amostras de *E. gallinarum*, foi relatada em três casos distintos, até o momento (Schooneveldt *et al*., 2000; Togneri *et al*., 2003; Neves, 2005).

Perichon e colaboradores (1997) descreveram o fenótipo VanD em uma amostra de *E. faecium* isolada nos Estados Unidos. Esta amostra apresentou resistência constitutiva à vancomicina (CIM=64μg/mL) e a baixas concentrações de teicoplanina (CIM=4μg/mL). Utilizando a técnica de PCR, esses autores demonstraram que o gene *vanD* apresenta uma homologia de 69% com *vanA* e *vanB* e de 43% com *vanC*. O gene *vanD* codifica uma D-Ala-D-Lac ligase, semelhante às codificadas por *vanA* e *vanB*, entretanto, neste caso, não é transferível.

O fenótipo VanE, descrito por Fines *et al.* (1999) em uma amostra de *E. faecalis*, aparentemente não é transferível e caracteriza-se pela expressão de resistência induzida a níveis baixos de vancomicina (CIM=16μg/mL) e susceptibilidade a teicoplanina (CIM=0,5μg/mL).

O fenótipo VanG, descrito em uma amostra de *E. faecalis* isolada na Austrália, é caracterizado por resistência à baixas concentrações de vancomicina (CIM de 12μg/mL a 16μg/mL) e susceptibilidade à teicoplanina (McKessar *et al*., 2000).

Patel *et al.* (1998) relataram que *Paenibacillus popilliae*, um biopesticida utilizado na agricultura há mais de 50 anos nos EUA, é portador de um fenótipo de resistência à vancomicina, designado VanF. O elevado grau de homologia das seqüências gênicas de *vanA* e de *vanF* sugeriu ser este último a origem da resistência à vancomicina em *Enterococcus*.

Muito embora a aquisição e transmissão nosocomial de amostras VRE sejam freqüentemente enfatizadas, a disseminação dessas amostras no ambiente comunitário já foi observada e, neste caso, os animais e os alimentos foram considerados como importantes reservatórios. Particularmente, amostras da espécie *E. faecium* (VRE) já foram isoladas a partir de carne de bovinos, suínos e aves destinadas ao consumo humano. Porém, a correlação entre a presença de amostras VRE em alimentos e em infecções hospitalares ainda não foi claramente documentada. Entretanto, dados epidemiológicos sugerem a participação da cadeia alimentar como uma importante rota de disseminação de amostras de enterococos multirresistentes (Gambarotto *et al*., 2001; Mannu *et al*., 2003; Aarestrup *et al*., 2004).

Nos últimos 10 anos, diversos antimicrobianos foram desenvolvidos e lançados como alternativas terapêuticas para o tratamento de amostras de enterococos multirresistentes, porém os resultados inicialmente promissores mais uma vez deparam-se com a emergência de amostras resistentes (Miyazaki *et al*., 2002; Burleson *et al*., 2004; Novais *et al*., 2004). Estudos realizados por Gonzales *et al*. (2001) demonstraram a emergência da resistência à linezolida, um antimicrobiano considerado promissor no tratamento das enterococcias refratárias a terapêutica usual, particularmente aquelas causadas por amostras de *E. faecium* resistentes à vancomicina. A associação quinupristina-dalfopristina, quando foi disponibilizada para uso já apresentava limitações, pois não é eficaz para espécie *E. faecalis*, que apresenta resistência intrínseca a estes antimicrobianos. Entretanto, pode ser utilizada no tratamento das infecções causadas por amostras da espécie *E. faecium* (Soltani *et al*., 2000). A daptomicina, um antimicrobiano lipopeptídico cíclico, derivado dos produtos da fermentação de *Streptomyces roseosporus*, tem sido utilizado no tratamento das infecções causadas por bactérias Gram-positivas. O uso de daptomicina, aprovado em 2003 pelo *FDA* (*Food and Drugs Administration*, EUA) e em 2006 pela *EMA* (*European Medicines Agency*, Comunidade Européia), tem se mostrado muito eficaz no tratamento de infecções causadas por VRE, e ainda não foram identificados relatos de resistência (Gobernado, 2007, Sader *et al*. 2007).

Patogenicidade e Fatores de Virulência

Há duas décadas atrás, os enterococos eram considerados microrganismos de reduzido impacto clínico. Porém, atualmente são reconhecidos como um dos principais microrganismos envolvidos em infecções endógenas e exógenas, de origem comunitária ou hospitalar, principalmente em pacientes imunossuprimidos (Teixeira e Facklam, 2003). No ambiente hospitalar, fatores como hospitalização prolongada, uso maciço de antibioticoterapia de amplo espectro, condições clínicas subjacentes dos pacientes, dentre outros, contribuem para a seleção, manutenção e disseminação de amostras multirresistentes de enterococos (Goldmann & Huskins, 1997; Hughes & Tenover, 1997; Dennesen *et al*., 1998).

Nos últimos anos, os enterococos têm sido apontados entre os três principais agentes de infecções hospitalares, representando cerca de 10% a 12% dessas infecções (HICPAC, 2003; Zarrilli *et al*., 2005; Qu *et al*., 2006). Dentre as espécies do gênero, *E. faecalis* é responsabilizado por 80% a 90% das enterococcias, seguida de *E. faecium*, com freqüência entre 5%-10%. Outras espécies, tais como *E. casseliflavus*, *E. durans*,

E. gallinarum, *E. hirae*, *E. mundtii* e *E. raffinosus*, quando em freqüência destacada estão geralmente envolvidas em situações de surtos específicos (Chirurgi *et al*., 1992; Nauchuertz *et al*., 1993; Jett *et al*., 1994; Patterson *et al*., 1995).

A maioria das amostras relacionadas a infecções de origem nosocomial apresenta multirresistência e tem elevada capacidade de transmissão (Handwerger *et al.*, 1993; Jureen *et al.*, 2003; Leavis *et al.*, 2003). Amostras multirresistentes também já foram isoladas do ambiente hospitalar, de instrumental médico como termômetros, estetoscópios e tensiômetros, assim como das mãos de profissionais de saúde (Noskin *et al.*, 1995; Bonilla *et al*., 1997; Leclercq, 1997).

A pressão seletiva provocada pelo uso de antimicrobianos, aos quais os enterococos são naturalmente resistentes, resulta na supressão dos demais representantes da microbiota normal e no aumento quantitativo da colonização intestinal por esses microrganismos; o que favorece a disseminação e o aparecimento de surtos epidêmicos (Kayser, 2003; Amyes, 2007).

Os enterococos podem causar uma variedade de infecções monomicrobianas e polimicrobianas, principalmente em pacientes em estado clínico grave. Estes quadros infecciosos incluem, predominantemente: infecções do trato urinário, bacteremias, endocardites, intra-abdominais, do trato biliar e de feridas, incluindo úlceras de decúbido e úlceras de pé diabético (Murray, 1990).

Estudos indicam que a origem dos enterococos que causam as infecções do trato urinário (ITUs) é, predominantemente, a microbiota gastrintestinal do próprio paciente (Hall *et al.*, 1992b) e as manifestações clínicas podem variar de bacteriúria assintomática até pielonefrite enterocócica. Embora as ITUs, causadas por enterococos, apresentem baixo índice de morbidade e mortalidade, estas infecções aumentam o tempo e os custos de hospitalização (Chenoweth & Schaberg, 1990). Em mulheres jovens sadias, os enterococos causam menos de 5% das ITUs (Murray, 1990). No entanto, em indivíduos que foram submetidos a cateterismo vesical, que possuem patologia urológica de base ou que receberam antibioticoterapia, a freqüência de ITUs aumenta drasticamente (Morrison & Wenzel, 1986). Lemoine e Hunter (1987) notaram um aumento de 11% para 20% no número de isolamentos de enterococos a partir da urina de pacientes cateterizados, durante 6 anos de estudo. Dados do sistema NNIS (*National Nosocomial Infections Surveillance*), pertencente ao CDC (*Centers for Disease Control and Prevention* - Atlanta, GA, EUA), classificaram os enterococos como a terceira causa de ITUs nosocomiais. O levantamento da distribuição dos

principais patógenos isolados de ITUs, de janeiro de 1992 a maio de 1999, revelou que os enterococos foram responsáveis por 13,8% destas infecções, ficando atrás apenas de *E. coli* (17,5%) e *Candida albicans* (15,8%) (CDC, 1999).

A incidência de bacteremias causadas por enterococos parece estar aumentando. A bacteremia enterocócica pode ter origem em outros sítios de infecção ou colonização. Naquelas sem a presença de endocardite, o trato urinário é a fonte mais comum e outros sítios de origem também importantes são o trato hepatobiliar e as infecções intra-abdominais. Amostras de enterococos já foram apontadas como a principal causa de bacteremia secundária em pacientes com infecções pós-operatórias. Infecções enterocócicas de tecidos moles representam outra fonte de bacteremia e, finalmente, muitas delas não apresentam sítio de origem óbvio e possivelmente estão relacionadas aos acessos intravasculares. (Shlaes, Levy & Wolinsky, 1981; Whiteside, Moore & Ratzan, 1983; Maki & Agger, 1988; Chenoweth & Schaberg, 1990; Graninger & Ragette, 1992; Jarvis & Martone, 1992).

As bacteremias enterocócicas monomicrobianas não costumam apresentar gravidade extrema, estando raramente associadas à coagulação intravascular disseminada ou choque. Quando são polimicrobianas correspondem a 25%-46% dos casos; são mais graves, o desenvolvimento de choque, trombocitopenia ou coagulação intravascular disseminada é mais freqüente e a taxa de mortalidade mais elevada (Maki & Agger, 1988).

As bacteremias enterocócicas adquiridas no hospital respondem por 78% do total dos casos (Chenoweth & Schaberg, 1990). Dados do sistema NNIS revelaram que os enterococos foram os causadores de 13,5% das bacteremias entre 1992 e 1999, sendo o segundo microrganismo mais freqüentemente isolado, ficando atrás apenas dos estafilococos coagulase negativa, que neste período foram responsáveis por 37,3% das septicemias (CDC, 1999). A bacteremia enterocócica ocorre predominantemente em pacientes com períodos prolongados de hospitalização e outras condições associadas, tais como doenças malignas, cateterismo vesical, acessos intravasculares, cirurgias recentes, grandes queimaduras e terapia prévia com antimicrobianos de amplo espectro (Shlaes, Levy & Wolinsky, 1981; Graninger & Ragette, 1992). Em crianças, os principais fatores predisponentes são os cateteres venosos centrais ou lesões gastrintestinais (Bonadio, 1993).

A incidência de bacteremia neonatal causada por enterococos também é preocupante, particularmente se associada a amostras multirresistentes (Dobson &

Baker, 1990). Luginbuhl *et al.* (1987) relataram que neonatos que desenvolveram sepse enterocócica freqüentemente apresentavam baixo peso e eram prematuros (aproximadamente 27 semanas). Os autores atribuíram como importantes fatores de risco a cateterização venosa central não-umbilical e ressecção intestinal. Dobson & Baker (1990) descreveram que os sintomas iniciais de sepse enterocócica em neonatos são: desconforto respiratório, anorexia, letargia, icterícia, irritabilidade, febre e diminuição do tônus muscular. Leucocitose pode estar ou não presente e a principal complicação da bacteremia enterocócica em neonatos é a meningite.

Os enterococos são a terceira principal causa de endocardites, respondendo por 5% a 20% destas infecções (Megran, 1992). Embora as endocardites, causadas por enterococos, aconteçam predominantemente na comunidade, estas também acometem pacientes hospitalizados (Maki & Agger, 1988). Nas endocardites, a fonte de aquisição dos microrganismos não é conhecida, mas, em alguns casos, acredita-se que as infecções do trato genitourinário possam ter sido o foco primário. Em estudo epidemiológico com 38 pacientes hospitalizados, Mandell *et al.* (1970) observaram que 50% dos homens com endocardite enterocócica tinham história prévia de ITUs ou haviam sido submetidos a procedimentos médicos invasivos envolvendo o trato genitourinário; e 43% das mulheres tinham história de parto ou procedimento ginecológico nos 3 meses precedentes.

Pacientes com patologia valvular cardíaca de base possuem maior risco de desenvolver endocardites por enterococos. No entanto, 42% dos pacientes no estudo de Mandell (1970), que apresentaram endocardite, não possuíam doença cardíaca de base. Além disso, o uso de drogas intravenosas parece também ser um fator predisponente para aquisição dessas infecções (Hall *et al.*, 1976). Amostras de enterococos hospitalares e resistentes a antimicrobianos vêm reduzindo as opções terapêuticas nos quadros de endocardites (Chenoweth & Schaberg, 1996).

Como os enterococos são isolados freqüentemente em culturas mistas na maioria das infecções abdominais, o seu papel na patogênese dessas infecções é controverso. Adicionalmente, estudos demonstraram que a antibioticoterapia empírica foi eficaz no tratamento de infecções intra-abdominais polimicrobianas, mesmo quando os enterococos estavam presentes (Murray, 1990; Nichols & Muzik, 1992). Porém, outros autores, já relataram a presença de enterococos como único microrganismo isolado em infecções intra-abdominais, inclusive em peritonites (Pascual *et al.*, 1990).

Como nas infecções intra-abdominais, os enterococos raramente são isolados em cultura pura de infecções de pele e de tecidos moles. Estes microrganismos são também encontrados em infecções polimicrobianas de feridas cirúrgicas, úlceras diabéticas de membros inferiores, úlceras de decúbito e queimaduras. Entretanto, o seu real papel patogênico nessas infecções também tem sido questionado. Por outro lado, em alguns estudos, as infecções de pele e de tecidos moles têm sido identificadas como fontes de bacteremias (Shlaes *et al.*, 1981; Whiteside *et al.*, 1983; Graninger & Ragette, 1992). Além disso, pode-se destacar as queimaduras infectadas como significantes fontes para a aquisição de bacteremias enterocócicas (Shlaes *et al.*, 1981; Maki & Agger, 1988).

Os enterococos raramente causam infecções do sistema nervoso central, a não ser em neonatos, como anteriormente descrito. O principal fator de risco para o desenvolvimento de meningites enterocócicas é manipulação neurológica prévia (Koorevaar *et al.*, 1992). Porém, já foram relatados casos de meningite em pacientes imunocomprometidos (Patton *et al.*, 1991). O desenvolvimento de meningite está associado a defeitos anatômicos no sistema nervoso central ou a procedimentos neurológicos prévios. A presença de derivações ventrículo-peritoneais também parece favorecer à aquisição de meningite por enterococos (Chenoweth & Schaberg, 1990).

Outras infecções incomuns, causadas por enterococos, incluem as endoftalmites endógenas e as otites médias (Dudley & Sercarz, 1990; Uchio *et al.*, 1992). Os enterococos também são raramente implicados em infecções do trato respiratório (Jarvis & Martone, 1992). Embora o sistema NNIS (1990) tenha relatado isolamento de enterococos em aproximadamente 2% das culturas de secreções respiratórias, estes microrganismos geralmente são considerados colonizadores e não patogênicos nesses sítios. Por outro lado, há relatos de pneumonia enterocócica em pacientes em uso de cefalosporinas de amplo espectro (Berk *et al.*, 1983; Bonten *et al.*, 1993).

Apesar da grande variedade e infecções com as quais os enterococos estão envolvidos, os fatores que determinam a patogenicidade destes microrganismos não estão ainda totalmente elucidados (Amyes, 2007; Willems & Boten, 2007).

Genes responsáveis pela expressão de atributos de virulência podem estar presentes no cromossomo ou em elementos extra-cromossômicos, como plasmídeos e transposons. Em diferentes gêneros bacterianos a virulência é multi-fatorial e regulada de forma coordenada por genes presentes em regiões específicas do cromossomo, as ilhas de patogenicidade. Essas regiões estão associadas às linhagens virulentas, já que não são observadas, ou quando presentes encontram-se alteradas em amostras cuja

virulência é menos expressiva (Pillar & Gilmore, 2004; Tendolkar *et al*., 2004). Shankar e colaboradores (2002) descreveram pela primeira vez a presença de uma ilha de patogenicidade em amostras de *E. faecalis*. Posteriormente, Leavis e colaboradores (2004) relataram a presença desses elementos genéticos em amostras da espécie *E. faecium*, que também apresentavam níveis elevados de resistência à ampicilina e à vancomicina e estavam associadas a surtos hospitalares.

Entretanto, alguns poucos fatores têm sido relacionados à virulência de enterococos, destacando-se uma citolisina, uma metaloprotease (gelatinase), um sistema *Quorum Sensing* (fsr) envolvido na regulação de gelatinase e/ou de uma serina-protease e uma proteína de superfície, dita Esp (Tendolkar *et al*., 2004).

Amostras de enterococos, principalmente a espécie *E. faecalis*, podem expressar uma exotoxina citolítica termolábil, que age em membranas celulares (Gilmore, 2002). A citolisina apresenta também atividade de bacteriocina, sendo tóxica para diversas outras espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A atividade citotóxica é observada contra diferentes células eucarióticas, incluindo macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares. Esta proteína tem ação sobre eritrócitos humanos, de cavalos e de coelhos. Entretanto, não age em hemácias de carneiro. Em meios de cultura acrescidos de sangue, a sua expressão é reconhecida por promover um halo claro ao redor das colônias bacterianas (beta-hemólise), que é resultante da lise total dos eritrócitos (Coque *et al.*, 1995).

O papel da expressão desta citolisina na virulência de amostras de *E. faecalis* é controverso. Vários autores têm associado o isolamento de amostras beta-hemolíticas com uma maior severidade do quadro infeccioso, enquanto outros encontraram percentuais semelhantes de amostras hemolíticas isoladas tanto de infecção, quanto de colonização, que seriam supostamente menos virulentas (Coque *et al*., 1995; Dupont *et al*., 1998; Gentry-Weeks *et al*., 1999).

Facklam *et al*. (1972) relataram que 11% das amostras de *E. faecalis* isoladas de endocardite foram hemolíticas. Ike, Hashimoto & Clewell (1984) inocularam, na cavidade peritonial de camundongos, amostras de enterococos beta-hemolíticas e não hemolíticas (mutantes produzidos experimentalmente) e relataram um aumento significativo na severidade da infecção causada pelas amostras produtoras de hemolisina. Em outro estudo, os mesmos autores relataram que 60% das amostras de *E. faecalis* isoladas de quadros infecciosos eram portadoras de atividade hemolítica,

enquanto apenas 17% daquelas obtidas das fezes de indivíduos sadios apresentaram esta característica (Ike, Hashimoto & Clewell, 1987).

Huycke e colaboradores (1991) observaram uma taxa cinco vezes maior no número de óbitos relacionados a infecções causadas por amostras produtoras de beta-hemolisina, quando comparadas àquelas decorrentes de amostras não hemolíticas. Uma outra associação entre infecção e produção de hemolisina foi relatada por Libertin e colaboradores (1992) que detectou a expressão de beta-hemolisina em 40% das amostras isoladas de sangue, 25% de urina e 23% de feridas. Os mesmos autores relataram que nenhuma amostra de colonização expressou esta característica.

Por outro lado, Coque *et al*. (1995) sugeriram que a expressão de hemolisina não é um fenótipo essencial na patogênese de enterococos. Os autores não encontraram uma diferença significativa na freqüência de amostras isoladas de quadros de endocardite e bacteremia em relação às obtidas de colonização em indivíduos sadios, quanto a expressão desta característica (16%, 32% e 20%, respectivamente). Já, em modelos animais, infecções experimentais por amostras de *E. faecalis* beta-hemolíticas resultaram em quadros de endoftalmite mais severos, acarretando inclusive a destruição da retina. Estes achados não foram observados em animais inoculados com amostras mutantes não hemolíticas (Callegan *et al.*, 2002). No mesmo estudo, os autores ressaltaram que a terapia antimicrobiana foi ineficaz no tratamento das infecções causadas pelas amostras produtoras de beta-hemolisina.

Na espécie *E. faecalis* a expressão da atividade hemolítica-citolítica requer a presença de cinco genes: $cylL_L$, $cylL_s$, *cylM*, *cylB* e *cylA*. A expressão de todos estes genes é necessária para produzir uma citolisina ativa. A molécula funcional possui dois domínios, uma região operacional $CylL_L$, que é termoestável, e uma segunda região ativadora $CylL_S$, que é termolábil. Estas subunidades são codificadas pelos respectivos genes $cylL_L$ e $cylL_S$ e são modificadas pelo produto de um terceiro determinante, *cylM* (Gilmore *et al*., 1994; Franz *et al*., 1999; Haas *et al*., 2002).

Os peptídeos modificados $CylL_L$' e $CylL_S$' são exportados por uma proteína transmembrânica, que é codificada por um quarto gene, o *cylB.* A proteína CylB pertence à família HlyB, que congrega proteínas comuns em microrganismos Gram-positivos. No ambiente extracelular as duas subunidades, $CylL_L$' e $CylL_S$', são clivadas por uma serina protease que é codificada por um quinto gene, o *cylA*. Como resultado, uma citolisina totalmente funcional, composta por dois peptídeos $CylL_L$'' e $CylL_S$'', poderá atuar no meio (Fath & Kolter, 1993; Gilmore *et al*., 1994; Haas *et al*., 2002).

Outros três genes também estão envolvidos no processo de expressão da hemolisina-citolisina de enterococos: *cylI*, *cylR*$_1$ e *cylR*$_2$. A proteína CylI confere proteção à atividade bactericida na célula produtora. Enquanto que, os genes *cylR*$_1$ e *cylR*$_2$ são os reguladores negativos da expressão. A proteína CylR$_1$, localizada na membrana celular, liga-se a CylL$_S$'' permitindo que CylR$_2$ reprima a transcrição do promotor específico (pL). Os genes *cylL*$_L$, *cylL*$_S$, *cylB*, *cylA* e *cylI* são colineares (Coburn *et al*., 1999 Haas *et al*., 2002).

A citolisina-bacteriocina de *E. faecalis* contém resíduos de lantionina e β-metilantionina, sugerindo que pertença a classe I desse grupo de proteínas. A expressão é decorrente da presença de plasmídeos, principalmente pAD1, que é do tipo conjugativo em resposta a feromônios. O plasmídeo pAD1 possui cerca de 59,6 Kb, em algumas situações pode encontrar-se integrado ao cromossomo, é conjugativo a uma freqüência de 10^{-3} a 10^{-1} (em 20 a 30 minutos) e a sua presença também está relacionada a resistência à ação da luz ultravioleta. Possui uma região contígua de, aproximadamente, 17,5 Kb e uma região de cerca de 45 Kb contendo outros determinantes de virulência, que estão envolvidos na aderência do microrganismo às células hospedeiras (Clewell, 2007).

Alguns estudos têm demonstrado que amostras de *E. faecalis* apresentam estruturas e/ou substâncias envolvidas na aderência *in vitro* a uma variedade de linhagens de células humanas, tais como as do trato urinário e intestinal e as cardíacas e ligações específicas com proteínas da matriz extracelular (Zareba *et al*., 1997; Sussmuth *et al*., 2000; Duprè *et al*., 2003).

A substância de agregação é um dos fatores mais estudados, dentre os que possivelmente estão envolvidos na aderência de enterococos às células do hospedeiro. Esta proteína é uma adesina filamentar, cuja expressão é induzida por feromônio. Encontra-se inserida na parede celular e, caracteristicamente, se apresenta em forma de tufos distribuídos irregularmente na superfície da célula bacteriana. A distribuição dessa estrutura na célula é dependente da indução e do tempo de exposição aos denominados feromônios sexuais (Hirt *et al*., 2002). A substância de agregação é primariamente responsável pelo contato bactéria-bactéria, promovendo a formação de agregados celulares, que precedem a transferência genética de plasmídeos em eventos de conjugação (Isenmann *et al*., 2000). Dentre os plasmídeos responsáveis pela expressão de substâncias de agregação, o pAD1, que carreia o gene *asa1*, é o mais estudado. Seqüências específicas presentes na proteína ASA1 reconhecem receptores do tipo

integrinas em células eucariotas. Também já foi observado que essa proteína enterocócica interage com fibrina, fibronectina, vitronectina, colágeno do tipo I e trombospondina (Wirth, 2000; Rozdzinski *et al*., 2001; Hirt *et al*., 2002).

Uma outra proteína de superfície de enterococos, denominada Esp (*Enterococcal surface protein*), apresenta características bioquímicas e funcionais similares as de outras adesinas bacterianas (Shankar *et al*, 1999). A proteína Esp é encontrada preferencialmente em amostras de *E. faecalis* isoladas de quadros infecciosos, principalmente na adesão às células epiteliais do trato urinário (Gilmore *et al*., 2002; Duprè *et al*., 2003). Toledo-Arana e colaboradores (2001) demonstraram uma estreita relação entre a presença do gene *esp* e a formação de biofilmes em superfícies abióticas por amostras de *E. faecalis*. Resultados semelhantes foram descritos por Tendolkar *et al*. (2004), que atestaram a relação entre a produção de Esp e a formação de biofilmes por amostras de *E. faecalis*, especialmente na presença de concentrações elevadas de glicose.

A persistência de enterococos no ambiente hospitalar, particularmente amostras VRE pertencentes à espécie *E. faecium*, tem sido associada à expressão de Esp (Tendolkar *et al*., 2004; Harrington *et al*., 2004; Ramadhan & Hegedus, 2005). Esta característica já foi apontada como importante marcador de grupos clonais mais adaptados a uma determinada instituição, ou até mesmo região geográfica, potencialmente aptos a emergir em situações epidêmicas (Leavis *et al*., 2003; Coque *et al*., 2005; Klare *et al*., 2005).

Além de ASA1 e de Esp, outras proteínas de superfície celular são alvos de estudos, quanto a sua participação na aderência de enterococos. A denominada EfaA (*Enterococcus faecalis antigen*) apresenta homologia com proteínas de superfície presentes em microrganismos do gênero *Streptococcus* e sua expressão é induzida na presença de soro humano. As proteínas Ace, presente em *E. faecalis* (Lowe *et al*.,1995), e Acm, característica de *E. faecium* (Nallapareddy *et al*., 2003), pertencem a subfamília de adesinas bacterianas designadas MSCRAMM (do inglês, *Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*), que especificamente interagem com integrantes de matriz celular, tais como colágeno, fibronectina e laminina (Duprè *et al*., 2003).

Um exoproduto também apontado como potencial fator de virulência em enterococos é a gelatinase. Esta proteína é uma zinco-metalopeptidase extracelular, que possui homologia com outras proteinases, particularmente com a elastase de

Pseudomonas aeruginosa. Funcionalmente, a gelatinase de enterococos hidrolisa insulina, fibrinogênio, colágeno, gelatina, caseína, hemoglobina, glucagon, neurotensinas e outros peptídeos bioativos, sugerindo que participe do processo inflamatório no hospedeiro (Kanemitsu *et al*., 2001; Archimbaud *et al*., 2002; Nakayama *et al*., 2002; Roberts *et al*., 2004).

Sabe-se que, muitos processos regulatórios, referentes a importantes fatores relacionados à expressão de virulência em bactérias, ocorrem em resposta à sinalização célula-célula. E, atualmente, admite-se que a expressão de gelatinase seja regulada pelo fenômeno de *Quorum Sensing*. Nesse processo, quando o acúmulo de moléculas sinalizadoras, como os pequenos peptídeos chamados de feromônios, alcança uma concentração detectável, um sensor na célula bacteriana é ativado e a expressão de certos genes é desreprimida (Lazazzera, 2001; Nakayama *et al*., 2001).

Em *E. faecalis*, o lócus *fsr* regula positivamente a expressão de gelatinase e de serina protease, codificadas pelos genes *gelE* e *sprE*, respectivamente. A produção inicial e posterior excreção destas proteínas parecem ser realizadas na fase logarítmica tardia do crescimento bacteriano e atingem sua produção máxima no início da fase estacionária. Neste caso, o fenômeno de *Quorum Sensing* é mediado por um feromônio, que bioquimicamente apresenta-se como um peptídio cíclico de 11 resíduos, denominado GBAP (*Gelatinase Biosynthesis Activating Pheromone*). Uma proteína na membrana citoplasmática, a FsrB, é responsável por transportar GBAP para o meio extracelular. O aumento da concentração de GBAP fora da célula (cerca de 1000 moléculas por célula) resulta no sinal para o início da expressão de gelatinase. Análises realizadas a partir de experimentos utilizando *Northern blot* demonstraram que o GBAP induz a transcrição de dois operons: (i) *fsrB-fsrC*, que codifica as proteínas FsrB e uma histidina-quinase FsrC; (ii) *gelE-sprE*, responsável pela expressão da gelatinase (GelE) e da serina protease (SprE), que é sugerida como o receptor para o GBAP (Nakayama *et al*., 2001; 2002; Qin *et al*., 2000; 2001).

Sifri *et al.* (2002) investigaram o papel do lócus *fsr* na patogênese de amostras de *E. faecalis* em modelos experimentais, utilizando camundongos e, também, o nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Os autores constataram que mutantes defectivos dos genes *fsrA*, *fsrB* e *fsrC* apresentaram uma significativa atenuação de seu potencial de virulência, quando comparados com a amostra controle, não sendo capazes de causar morte em ambos os modelos avaliados. O mesmo foi observado com mutantes apresentando deleções nos genes *gelE* e *sprE*. Diante dos resultados obtidos, os autores

sugeriram que a gelatinase constitui um importante atributo na patogênese de *E. faecalis* mesmo em modelos experimentais com distância filogenética considerável.

A maioria dos relatos sobre os fatores provavelmente envolvidos na virulência de enterococos está baseada na análise de amostras provenientes de material clínico humano e de ensaios utilizando modelos animais. Porém, Eaton e Gasson, em 2001, demonstraram que amostras isoladas de alimentos, incluindo as que são eventualmente utilizadas em tecnologia de produção, podem ser portadoras de determinantes de virulência, mesmo que em freqüência menos expressiva do que as amostras de origem clínica.

Sabendo-se que os *Enterococcus*, merecem reconhecida atenção, diante do seu significado patológico e epidemiológico no ambiente hospitalar, principalmente por estarem freqüentemente envolvidos em eventos ímpares de aquisição e de transferência de genes de resistência aos antimicrobianos e de virulência, o monitoramento contínuo desses microrganismos é fundamental ao desenvolvimento de estratégias efetivas de controle da transmissão e disseminação de amostras multirresistentes.

OBJETIVOS

Considera-se, portanto, que os microrganismos do gênero *Enterococcus* apresentam destacada participação no cenário da infecções humanas e que a diversidade ilustrada pelos vários determinantes genéticos, relacionados à expressão dessas características, corrobora a necessidade do rastreamento dessas amostras e das potenciais fontes de disseminação. Sendo assim, foram objetivos deste estudo:

- Caracterizar amostras de enterococos obtidas de diversas origens relacionadas ao ambiente hospitalar, a saber: colonização e infecção em pacientes hospitalizados, profissionais de saúde, dietas hospitalares e manipuladores de alimentos atuantes no preparo dessas dietas;
- Determinar os perfis fenotípicos e genotípicos relacionados a susceptibilidade aos antimicrobianos e investigar as taxas de resistência das amostras bacterianas obtidas das diferentes origens avaliadas;
- Avaliar a expressão fenotípica e a presença de determinantes genéticos relacionados a virulência desses microrganismos;
- Comparar as freqüências das características fenotípicas e genotípicas avaliadas em relação à origem das amostras, bem como avaliar comparativamente tais características dentre as amostras de origem humana (infecção X colonização);

- Avaliar o polimorfismo genético de amostras selecionadas, visando a investigação de aspectos relativos à transmissão e manutenção das amostras multirresistentes no ambiente hospitalar.

1. **MATERIAIS E MÉTODOS**

1.1. **Desenho do estudo e amostras bacterianas**

Este estudo teve por característica uma investigação da veiculação de amostras de *Enterococcus* multirresistentes no ambiente hospitalar. A unidade institucional avaliada foi o Hospital Universitário Pedro Ernesto, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HUPE-UERJ). O HUPE/UERJ é um hospital terciário com 600 leitos e 16 salas cirúrgicas, onde são realizadas internações e cirurgias em mais de 60 especialidades médicas.

1.2. **Estudo prospectivo**

Foi realizado um estudo de caráter prospectivo, durante um período de três meses consecutivos (uma coleta mensal), de novembro de 2000 a janeiro de 2001. Foi avaliada a presença de amostras de *Enterococcus* em colonização intestinal de um total de 122 pacientes, que se encontravam hospitalizados em Unidades hospitalares selecionadas, de acordo com possíveis diferenças relacionadas ao grau de exposição a fatores determinantes da aquisição de microrganismos resistentes, a saber:

- CTI Geral, Centro de Terapia Intensiva (08 leitos), grau máximo pela utilização de antimicrobianos de amplo espectro, maior gravidade dos quadros clínicos dos pacientes, uso freqüente de procedimentos invasivos e riscos decorrentes da administração de alimentação parenteral;

- Enfermarias de Clínica Médica (feminina e masculina, 10 leitos cada), grau intermediário de utilização de antimicrobianos, tempo de internação prolongado em

decorrência de patologias graves, alta prevalência de quadros infecciosos incluindo patologias infecciosas de origem comunitária;

- Enfermaria de Clínica Cirúrgica (feminina e masculina, 10 leitos cada), menor grau de risco, utilização de antimicrobianos com menor freqüência, de menor espectro e por tempo menor, maior proporção de internações com indicações de cirurgias eletivas.

Durante o mesmo período foram realizadas coletas de *swab* de pele de profissionais de saúde (n=98), de dietas servidas aos pacientes (n=66, sendo 49 orais, 14 enterais e 3 parenterais) e de *swab* da pele de manipuladores destes alimentos (n=88). Os profissionais de saúde eram atuantes nas clínicas citadas anteriormente e as dietas hospitalares coletadas eram da mesma categoria e tipo a ser servida aos pacientes hospitalizados nas mesmas Unidades hospitalares avaliadas.

1.2.1. Coleta e isolamento das amostras obtidas de colonização:

As amostras oriundas de colonização (intestinal de pacientes e pele de profissionais de saúde e de manipuladores de alimentos) foram coletadas com auxílio de *swabs* estéreis individuais em embalagens comerciais e, sem meio de transporte, que foram encaminhados imediatamente para o processamento no laboratório. Amostras representativas de colonização intestinal foram oriundas da coleta de *swabs* retais e as de pele foram obtidas pela fricção de *swabs*, previamente umedecidos em solução salina fisiológica estéril (NaCl 0,85%), no primeiro e no segundo quirodáctilo e na região palmar da mão dominante.

O processamento do material seguiu as recomendações de Ieven e colaboradores (1999). Após a coleta do material, os *swabs* foram eluídos em 2mL de salina fisiológica estéril e alíquotas de 0,5mL foram adicionadas a tubos contendo 4,5mL de caldo Enterococcosel (*Enterococcosel Broth*, Becton Dickinson Diagnostic Systems, Franklin Lakes, NJ, EUA), adicionados ou não de 6μg/mL de vancomicina, que foram incubados por 24h-48h a 36±1°C. A partir de cada tubo que apresentou escurecimento do meio, foi retirada uma alçada que foi semeada em ágar Enterococcosel (*Enterococcosel Agar*, Becton Dickinson Diag). Após incubação por 18-24h a 36±1°C foram selecionadas até cinco colônias sugestivas de *Enterococcus* (que apresentaram escurecimento do meio), que foram subcultivadas em placas contendo meio ágar BHI (*Brain Heart Infusion*

Agar, Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro (ágar sangue). Cada uma das colônias foi considerada como uma amostra e recebeu uma numeração específica.

1.2.2. Coleta e isolamento das amostras obtidas de alimentos:

As dietas hospitalares foram coletadas nas embalagens originais, transportadas ao laboratório em caixas de isopor, sob refrigeração, e em seguida processadas. Conforme o estabelecido pelo Serviço de Nutrição do HUPE/UERJ, as dietas orais e enterais são normalmente servidas em embalagens descartáveis e as parenterais administradas em frascos próprios fornecidos pelo Serviço de Farmácia, onde são preparadas.

Para o processamento das dietas líquidas ou sólidas, 25mL ou 25g, respectivamente, foram homogeneizados em 225mL de água peptonada (peptona 0,1% - Difco Labs.; NaCl 0,85%), com auxílio de *mixer*. Todo o processamento foi realizado assepticamente em câmara de fluxo laminar. Alíquotas de 1mL foram semeadas em 9 mL de Caldo Enterococcosel e incubadas por 18-24h a 36ºC±1ºC. Após o período de incubação, as demais etapas de processamento e isolamento das amostras foram equivalentes ao já descrito no item 1.1.1.

1.3. **Estudo retrospectivo:**

Foram também utilizadas neste estudo 61 amostras oriundas de diversos processos infecciosos em pacientes hospitalizados em diferentes setores hospitalares, durante o período de junho de 2000 a junho de 2001. Os espécimes clínicos foram coletados conforme rotina própria para investigação microbiológica e o isolamento primário foi realizado pela equipe técnica do Laboratório de Bacteriologia Clínica (LABAC) do HUPE/UERJ. Os dados dos pacientes foram obtidos mediante revisão de prontuários, disponibilizados no arquivo médico hospitalar e dos relatórios emitidos pelo LABAC.

1.3.1. Recuperação e manutenção das amostras bacterianas:

As amostras bacterianas utilizadas neste estudo estavam mantidas em solução de leite desnatado a 10% acrescido de glicerol a 10% e a -20ºC, compondo a Coleção de Culturas do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DMIP/UERJ), sob a coordenação da Profa. Vânia Lúcia Carreira Merquior, de onde foram recuperadas para realização de testes fisiológicos convencionais, para caracterização e/ou confirmação do gênero e espécies, e demais análises contidas neste estudo.

1.4. **Aspectos éticos**

A obtenção das amostras avaliadas neste estudo não incluiu coleta adicional de exames, além dos previstos como rotina assistencial da unidade hospitalar envolvida. O sigilo dos dados obtidos foi mantido, sendo divulgado apenas o conjunto dos resultados, resguardando-se a individualidade dos pacientes. As avaliações e procedimentos que constam deste estudo foram submetidos à análise, sendo aprovados pelo Comitê de Ética do HUPE/UERJ.

1.5. **Caracterização fisiológica das amostras bacterianas**

A caracterização fisiológica do gênero e das espécies de enterococos seguiu as recomendações de Facklam *et al.* (1999) e Teixeira e Facklam (2003) com a utilização dos seguintes testes:

(i) para caracterização do gênero *Enterococcus* – além da determinação das características morfo-tintoriais em esfregaços corados pelo método de Gram, foram realizados os testes de produção da catalase; hidrólise da esculina em presença de bile; crescimento em presença de NaCl a 6,5%; hidrólise do L-pirrolidonil-β-naftilamida; e hidrólise de L-leucina-β-naftilamida.

(ii) para caracterização das espécies de *Enterococcus* – produção de pigmento; motilidade; descarboxilação da arginina; utilização do piruvato de sódio; e produção de ácidos a partir da utilização dos açúcares L-arabinose, manitol, D-rafinose, sacarose, sorbitol, D-sorbose e metil-α-glicopiranosídeo (MGP).

Todos os testes foram sempre realizados a partir de crescimento bacteriano recente (18h a 36ºC±1ºC). Para o controle dos testes, foram utilizadas as seguintes amostras de referência, gentilmente cedidas pela Profª Lucia Martins Teixeira, do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IMPPG/UFRJ): *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* SS1274, *E. casseliflavus* SS1224 e *E. gallinarum* SS1228, *Leuconostoc pseudomesenteroides* SS1238 (controle negativo dos testes do PYR e do LAP) e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (controle positivo do teste da catalase).

1.5.1. Produção de catalase:

A observação da produção da catalase foi efetuada por metodologia convencional, em lâmina de vidro. Foi preparada uma suspensão espessa do microrganismo em uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v). A ausência de formação de bolhas foi considerada indicativa de reação negativa característica de *Enterococcus*.

1.5.2. Hidrólise da esculina em presença de bile:

As amostras bacterianas foram semeadas em ágar Bile Esculina (*Bile Esculin Agar*, Difco Labs.) e incubadas a 36ºC±1ºC por 18-24h. A positividade do teste foi considerada pelo escurecimento do meio, em função da hidrólise da esculina em esculetina, na presença de 40% de bile.

1.5.3. Crescimento em presença de NaCl a 6,5%:

Para este teste foi utilizado o caldo HIB (*Heart Infusion Broth*, Difco Labs.) ajustado para conter 6,5% de NaCl (Merck S.A., São Paulo, SP) e 0,5% de glicose (Sigma Co.). A fim de facilitar a leitura do teste, foi acrescentado 0,1% do indicador de pH (púrpura de bromocresol). Após a incubação a 36ºC±1ºC por 18-24h, o teste foi considerado positivo pela alteração da cor do indicador de pH e/ou simplesmente pela turvação do meio, que indica crescimento do microrganismo.

1.5.4. Hidrólise de L-pirrolidonil-β-naftilamida (Teste do PYR) e de L-leucina-β-naftilamida (Teste do LAP):

Para execução destes testes, uma suspensão bacteriana espessa foi preparada em 0,2 mL de caldo THB (*Todd-Hewitt Broth*, Difco Labs.), contendo 0,01% de PYR ou 0,02% de LAP (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA). Após um período de 4h de incubação a 36ºC±1ºC, foram adicionadas uma a duas gotas de solução reveladora contendo dimetilamino cinamaldeído (Sigma Co.) a 1% em HCl a 10% (v/v). A leitura dos testes foi feita imediatamente e em até 10 min, após agitação suave. A positividade em ambos os testes, observada pelo aparecimento de coloração rosa forte ou púrpura, é característica de *Enterococcus*.

1.5.5. Produção de pigmento:

A presença de pigmento amarelo foi observada diretamente em um crescimento bacteriano recente (18h a 36ºC±1ºC) obtido em meio ágar sangue. O pigmento pode ser evidenciado com maior facilidade pela retirada de algumas colônias com auxílio de um *swab*.

1.5.6. Motilidade:

O teste foi realizado em meio de cultura semi-sólido (*Motility Medium*, Difco Labs). O inóculo foi introduzido com auxílio de agulha bacteriológica e o resultado foi observado após incubação a 30ºC±1ºC por 18-24h. As amostras que se apresentaram negativas (imóveis) foram re-incubadas por até sete dias.

1.5.7. Descarboxilação da arginina:

Foi utilizado o meio *Decarboxylase Base Möeller* (Difco Labs.) acrescido de 1% de L-arginina (Sigma Co.). Após a inoculação do meio, foi adicionada uma camada de cerca de 10 mm de óleo mineral estéril e os testes foram incubados a 36ºC±1ºC por até sete dias. O aparecimento de uma cor púrpura é indicativo de reação positiva, devido à alcalinização do meio através da descarboxilação da arginina. Por outro lado, o aparecimento de coloração amarela é indicativo de reação negativa pela acidificação do meio.

1.5.8. Utilização do piruvato de sódio:

O meio de cultura utilizado foi preparado pela adição de 1% de Triptona (Difco Labs), 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de K_2HPO_4 e 0,5% de NaCl (Merck S.A.), 0,01% de azul de bromotimol e 1% de piruvato de sódio (Sigma Co.). Testes positivos são reconhecidos pelo aparecimento de uma coloração amarela, em até sete dias de incubação a 36ºC±1ºC.

1.5.9. Utilização de carboidratos:

A produção de ácidos a partir dos carboidratos foi observada em meio HIB acrescido de 1% do respectivo carboidrato (p/v) e de 0,1% do indicador de pH, púrpura de bromocresol. A leitura foi feita após 18-24h e até o sétimo dia de incubação a

36ºC±1ºC. Testes positivos são determinados pela mudança da cor do indicador de púrpura para amarelo, resultante da utilização do açúcar e acidificação do meio.

Os resultados obtidos no conjunto de testes empregados foram confrontados com dados divulgados por Teixeira *et al*. (2007), segundo padrões de comportamento característicos das espécies, apresentados pelos autores (Tabela 1).

1.6. **Análise dos perfis de proteínas totais**

A análise dos perfis de proteínas totais por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida acrescido de dodecil sulfato de sódio) foi empregada como uma ferramenta adicional na caracterização de amostras atípicas e/ou que apresentaram resultados pouco esperados nos testes fisiológicos convencionais. A metodologia empregada seguiu as recomendações de Merquior *et al*. (1994).

1.6.1. Obtenção dos extratos protéicos:

A partir de um cultivo recente (18h a 36ºC±1ºC) em ágar sangue, as células bacterianas foram ressuspensas em 0,5 mL de uma solução aquosa contendo 10mg/mL de lisozima (Sigma Co.). Esta suspensão foi incubada a 36ºC±1ºC por duas horas, em banho-maria, e posteriormente adicionada de igual volume de uma solução contendo 0,5M Tris-HCl (pH 6,8), SDS 4% p/v, glicerol 20% v/v, 2-mercaptoetanol 10% v/v. A mistura foi submetida por 5 min em banho fervente, posteriormente centrifugada por 5 min a 4.500 G, e o sobrenadante utilizado para a análise eletroforética de proteínas.

Tabela 1 – Características fenotípicas utilizadas para a identificação das espécies de *Enterococcus* e algumas espécies fisiologicamente relacionadas.

Espécies	Características Fenotípicas (a)											
	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SUC	PYR	MGP
Grupo I												
E. avium	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	V
E. gilvus	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
E. hawaiiensis	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
E. malodoratus	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	V
E. pallens	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
E. pseudoavium	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
E. raffinosus	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	V
E. saccharolyticus	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
Grupo II												
E. faecalis	+(d)	-	+(d)	-	+	-	+	-	-	+(d)	+	-
E. faecium	+(d)	-	+	+	V	V	-	-	-	+(d)	-	-
E. casseliflavus	+	-	+(d)	+	V	+	+(d)	+(d)	+ (d)	+	V	+
E. gallinarum	+	-	+(d)	+	-	+	-	+(d)	-	+	-	+
E. haemoperoxidus	+(c)	-	+(c)	-	-	-	-	-	-	+	-	+
E. mundtti	+	-	+	+	V	+	-	-	+	+	-	-
E. sanguinicola	+	-	+	-	-	-	+(e)	-	-	+	-	-
Lactococcus sp.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-
Grupo III												
E. díspar	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
E. durans	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. hirae	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
E. ratti	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. villorum	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo IV												
E. asini	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
E. cacae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+(c)
E. cecorum	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
E. phoeniculicola	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
E. sulfureus	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
Grupo V												
E. canis	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
E. columbae	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
E. hermanniensis	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. italicus	+	-	-	-	V	-	-	-	-	+	+	+
E. moraviensis	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Vagococcus fluvialis	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+

(a) Abreviaturas e símbolos; MAN, Manitol; SOR, Sorbose; ARG, Arginina; ARA, Arabinos; SBL, Sorbitol; RAF, Rafinose; TEL, 0,04% de Telurito; MOT, Motilidade; PIG, Pigmento; SAC, Sacarose; PYR, Piruvato; MGP, Metil-α-glicopiranosídeo;
(+) 90% das amostras ou mais são positivas; (-) 90% das amostras ou mais são negativas; (V) Variáveis;
(c) Resultados tardios (3 ou mais dias de incubação);
(d) Exceções ocasionais (menos de 3% das amostras);
(e) Reação em uma semana.
Fonte: Teixeira *et al*., 2007.

1.6.2. SDS-PAGE:

Volumes de 15μL das preparações solúveis (extratos protéicos) foram aplicados em um gel de empilhamento (ou superior) composto de acrilamida 4% em 0,125M Tris-HCl (pH 6,8) confeccionado sobre um gel de separação (ou inferior) composto de 10% de acrilamida em 0,375M Tris-HCl (pH 8,8). O tampão utilizado para a corrida eletroforética foi 25mM Tris-HCl – 0,192M glicina (pH 8,3) e a concentração final de SDS foi de 0,1%, tanto no gel como no tampão de corrida. A corrida eletroforética foi feita no sistema Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Califórnia, EUA) em uma corrente constante de 20mA. Padrões de pesos moleculares (20-250kD, *Prestained Protein Molecular Weight Standards*, BioRad) foram incluídos em cada uma das corridas. O gel foi corado com azul de Coomassie R-250 a 0,125% p/v em metanol: ácido acético: água (5:1:4 v/v) e descorados com a mesma solução solvente. Os perfis obtidos foram avaliados por inspeção visual.

1.7. **Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos**

1.7.1. Testes de Difusão em Ágar:

Três a cinco colônias de cada amostra bacteriana foram semeadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion* – Difco Labs.) e incubadas a 36ºC±1ºC por 18-24h. Após o período de incubação, foi feita uma suspensão do crescimento bacteriano, em solução salina fisiológica estéril (NaCl 0,85%), para obter uma turbidez equivalente a 0,5 da escala de McFarland. Com auxílio de *swabs*, as suspensões bacterianas foram inoculadas em ágar Müeller-Hinton (MHA, *Müeller-Hinton Agar*, Difco Labs.), sobre as quais foram depositados discos impregnados com os antimicrobianos. Após o período de incubação de 16-18h, a 36ºC±1ºC, os halos de inibição do crescimento bacteriano foram medidos para a definição da categoria de susceptibilidade. Para determinação da susceptibilidade a vancomicina, o tempo de incubação foi de 24h. A

análise dos resultados seguiu as recomendações do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI), 2007.

Os antimicrobianos testados e suas respectivas concentrações nos discos foram: ampicilina-10μg, ciprofloxacina-5μg, cloranfenicol-30μg, eritromicina-15μg, tetraciclina-30μg, vancomicina-30μg e discos especiais contendo concentrações elevadas de gentamicina-120μg e estreptomicina-300μg. Os discos de antimicrobianos foram obtidos da Oxoid Ltd. (Cambridge, Reino Unido). A amostra de referência *E. faecalis* ATCC 29212 foi utilizada como controle nos testes.

1.7.2. Antibiotipagem:

A definição de antibiotipos foi realizada segundo Barros *et al*. (1999), utilizando-se os resultados obtidos no teste de difusão em ágar para os 8 antimicrobianos testados. Os antimicrobianos foram reunidos em três grupos de três, e um grupo de dois, na seguinte ordem: ampicilina / ciprofloxacina / cloranfenicol; eritromicina / tetraciclina / vancomicina; e gentamicina / estreptomicina. Os resultados obtidos na categoria intermediária de susceptibilidade foram convencionalmente considerados como resistentes. Sendo assim, os bionúmeros representativos dos antibiotipos foram gerados segundo o arranjo obtido pelo emprego da seguinte representação (onde S, sensível; R, resistente ou categoria intermédiária):

Combinação dos resultados:	Representação:
SSS	1
SSR	2
SRS	3
SRR	4
RRR	5
RRS	6
RSR	7
RSS	8
SS	A
SR	B
RS	C
RR	D

1.7.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para vancomicina e teicoplanina:

A partir de um inóculo padronizado (suspensão celular com turbidez equivalente a 0,5 da escala McFarland), confeccionado como descrito no item 5.1, foi realizada a semeadura nas placas de ágar Müeller-Hinton (Difco Labs.) com o auxílio de um *swab* estéril, a fim de obter um crescimento confluente e homogêneo. Fitas impregnadas com os antimicrobianos (*E- test*®, *AB Biodisk*, Culver City, CA, EUA) foram depositadas sobre o inóculo. O valor da CIM para cada antimicrobiano foi obtido pela leitura do valor correspondente a interseção entre a origem da elipse de inibição do crescimento bacteriano e a fita do *E- test*®.

1.8. **Detecção da expressão de fatores de virulência**

1.8.1. Formação de Biofilme:

A metodologia utilizada foi baseada na descrita por Tendolkar *et al.* (2004). As amostras foram semeadas em TSB (*Tripcase Soy Broth*, Difco Labs.) ajustado para uma concentração final de 0,25%, 0,5%, 0,75% ou 1,0% de glicose (TSB-G) e incubadas a 36ºC±1ºC por 16-18h. Após incubação, foram centrifugadas a 6.000g/10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 5 mL do meio TSB. As suspensões celulares com turbidez padronizada foram diluídas a 1:40 em caldo TSB-G e 200µL foram adicionadas em poços de placas de microtitulação de poliestireno (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA) que foram incubadas a 36ºC±1ºC por 16-18h Após este período, as células planctônicas foram removidas e os poços foram lavados com tampão fosfato-salina (PBS, 0,85% NaCl; 0,2M NaH_2PO_4; 0,2M $NaHPO_4$, pH7,2) estéril. As placas foram invertidas e deixadas por 1 h à temperatura ambiente para secar.

A quantificação do biofilme foi feita adicionando-se em cada poço da microplaca 200µL de uma solução aquosa de cristal violeta a 0,2%. Após 15 minutos de

incubação em temperatura ambiente, os poços foram lavados por 3 X com PBS estéril e adicionados de 200μL de uma solução álcool-acetona (80:20). Os resultados foram quantificados pela leitura da absorbância dos testes em um leitor de microplacas (*Model 550 Microplate Reader*, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) a λ=595nm.

Os testes foram sempre realizados em quadruplicata. A formação do biofilme foi categorizada segundo as recomendações de Seno *et al*. (2005), com algumas modificações em: forte $DO_{595} \geq 0,6$; média $0,3 \leq DO_{595} \leq 0,599$; ou fraca $0,1 \leq DO_{595} \leq 0,299$. Amostras que apresentaram valores menores do que 0,1 foram consideradas não produtoras de biofilme.

1.8.2. Gelatinase:

A metodologia utilizada para a detecção da produção de gelatinase seguiu as recomendações de Coque *et al.* (1995). As amostras bacterianas foram semeadas em *spot* no meio THB acrescido de 1,5% de ágar e 30 g/L de gelatina (*Gelatin*, Difco Labs.) e incubadas por um período de 24h a 36ºC±1ºC, seguido de uma incubação por 5h, sob refrigeração (4ºC - 10°C, em geladeira). O aparecimento de um halo turvo ao redor do crescimento, devido à hidrólise da gelatina, foi considerado positivo para o teste.

1.9. **Detecção de genes envolvidos na expressão de resistência aos antimicrobianos**

A investigação da presença de genes codificadores da expressão de resistência aos antimicrobianos foi realizada por PCR. A metodologia empregada seguiu as recomendações de Sutcliffe *et al*. (1996) e Swenson *et al.* (1995), com algumas modificações, para a presença dos genes responsáveis pela expressão de resistência à gentamicina [gene *aac(6´)-I/aph(2´´)-Ie*], estreptomicina [gene *ant(6´)-Ia*] e vancomicina (genes *vanA*, *vanB*, *vanC1* e *vanC2*). As amostras HUPE-101 (portadora dos genes responsáveis pelo fenótipo HLR-GE e HLR-ST), *E. faecalis* A256 (*vanA*), *E. faecalis* V583 (*vanB*), *E. gallinarum* SS1228 (*vanC-1*) e *E. casseliflavus* SS1229 (*vanC-*

2) foram utilizadas como controles positivos dos testes. A amostra *E. faecalis* ATCC 29212 foi utilizada como controle negativo. Todos os reagentes utilizados foram obtidos da Invitrogen do Brasil (São Paulo, SP).

1.9.1. Obtenção do DNA molde:

As amostras bacterianas foram semeadas em ágar sangue e incubadas por 16-18h a 36ºC±1ºC. A partir do crescimento, três a cinco colônias bacterianas foram suspensas em 100μL de água Milli-Q estéril. As suspensões celulares foram submetidas a banho fervente por 10 min, para lise das células e conseqüente liberação do DNA. Após centrifugação (4.500 G) por 15 seg, alíquotas de 2μL (para detecção de genes *van*) ou 5μL (para detecção de genes codificadores do fenótipo HLAR) do sobrenadante foram adicionadas à mistura de reação de PCR.

1.9.2. Detecção de genes codificadores de HLAR:

A mistura de reação constou de 0,5 μM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,25 mM de dNTP *mix* (2,5 mM de cada), 1,5 U de Taq polimerase e 2 mM de cloreto de magnésio e água Milli-Q estéril para um volume final de 30μl. Esta mistura foi submetida a um ciclo inicial de 93ºC por 3 min, seguido de 52ºC por 1 min, e de 35 ciclos de 72ºC por 1 min, 93ºC por 1 min e 52ºC por 1 min, e um ciclo final de 72ºC por 5 min em termociclador (*Model PT100, Programable Thermal Controler*, MJ Research Inc., MA, EUA). As seqüências dos iniciadores utilizados para a amplificação de cada um dos genes investigados estão indicadas na QUADRO 1.

1.9.3. Detecção de genes codificadores de resistência à vancomicina:

A mistura da reação de PCR constou de 0,5μM de cada iniciador, 0,2mM de dNTP *mix* (100mM de cada), 2,5U de Taq polimerase, 1,5mM de cloreto de magnésio e água Milli-Q para um volume final de 100μL. Esta mistura foi submetida a 1 ciclo de 95°C por 10 min, para lise bacteriana e desnaturação do DNA, 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg e 72°C por 30 seg e 1 ciclo final de 72°C por 10 min, em termociclador PT100. As seqüências dos oligonucleoídeos iniciadores utilizados estão descritos na Quadro 1.

1.9.4. Eletroforese:

Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE 0,5X (45mM Tris, 45mM ácido bórico, 1mM EDTA). Após eletroforese por 1h a 100V, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 μg/mL) por 30 min, descorados duas vezes (30 min cada), visualizados em transiluminador de luz UV e os resultados foram registrados com auxílio de câmara digital (Sistema EDAS 120, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EUA). As corridas eletroforéticas foram acompanhadas de um padrão de pares de base (100 bp ou 1kb *Ladder*) utilizado para estimar o tamanho dos produtos de amplificação obtidos.

1.10. **Detecção de genes envolvidos na expressão de fatores de virulência**

A presença dos genes codificadores da expressão de hemolisina (*cylA*), Esp (*esp*) e FsrB (*fsr*) foi investigada por PCR. A metodologia empregada seguiu as recomendações de Eaton & Gasson (2001) e de Roberts *et al*. (2004). As amostras de *E. faecalis* OG1XpAM714 e ATCC 29212 foram utilizadas como controles dos testes. Todos os reagentes utilizados foram obtidos da Invitrogen do Brasil (São Paulo, SP).

1.10.1. Obtenção do DNA molde:

O DNA das amostras bacterianas foi obtido segundo as recomendações de Beall *et al*. (1998). A partir de um crescimento recente (18-24h a 36ºC±1ºC), foi confeccionada uma suspensão bacteriana espessa em 300μL de salina fisiológica estéril (NaCl a 0,85%). Após centrifugação a 3.000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi desprezado e as células bacterianas foram suspensas em 50μL de tampão TE (10mM Tris; 0,1M de EDTA, pH 7,6) adicionado de 9U de mutanolisina (Sigma Co.). Após incubação por 10 min em banho-maria a 36ºC±1ºC, seguida de mais 5 min em banho fervente, as suspensões foram centrifugadas (1.000 G por 5 min) e 5μL do sobrenadante, contendo o DNA extraído, foram adicionados à mistura de reação.

1.10.2. Detecção de genes de virulência:

A mistura de reação constou de 0,5 μM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,25 mM de dNTP *mix* (2,5 mM de cada), 1,5 U de Taq polimerase, 2 mM de cloreto de magnésio e água Milli Q para um volume final de 50μL. Esta mistura foi submetida a um ciclo inicial de 93ºC por 3 min, seguido de 52ºC por 1 min, e de 35 ciclos de 72ºC por 1 min, 93ºC por 1 min e 52ºC por 1 min, e um ciclo final de 72ºC por 5 min em termociclador PT100. As seqüências dos iniciadores utilizados para a amplificação de cada um dos genes investigados estão indicadas no QUADRO 2.

1.10.3. Eletroforese:

A detecção dos produtos de amplificação foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X. Após a corrida eletroforética, por 1h a 100V, os géis foram corados, descorados e visualizados conforme já descrito no item 7.4.

QUADRO 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção dos genes responsáveis pela expressão de resistência a gentamicina, estreptomicina e vancomicina, por metodologia de PCR.

GENE	**INICIADORES**	**PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO (bp)**
aac(6')Ie-aph(2'')Ia	348: 5' TGATGATTTTCCTTTGATGT 3' 1723: 3' GTTAGAAATATTCAGGAAAA 5'	1.375
ant(6')Ia	1268: 5' ACTGGCTTAATCAATTTGGG 3' 1845: 3' CGGAAAGGCGGTGGAGTGGC 5'	577
vanA	VanA1: 5' GCTATTCGACTGTAGC 3' VanA2: 5' CGACGGCCATCATACGG 3'	1.030
vanB	VanB1:5' CATCGCCGTCCCCGAATTTCAAA 3' VanB2: 5' GATGCGGAGAACCGTGGCT 3'	433
vanC-1	VanC1-1:5' GGTATCAAGGAAACCTC 3' VanC1-2: 5' CTTCCGCCATCATAGCT 3'	796
vanC-2	VanC2-1: 5'CTCCTACGATTCTCTTG 3' VanC2-2: 5' CGAGCAAGACCTTTAAG 3'	484

QUADRO 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção dos genes responsáveis pela expressão de fatores de virulência, por metodologia de PCR.

GENE	INICIADORES	PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO (bp)
cylA	TE17: 5' TGGATGATAGTGATAGGAAGT 3' TE18: 5' TCTACAGTAAATCTTCGTCA 3'	517
esp	TE34: 5' TTGCTAATGCTAGTCCACGACC 3' TE36: 5' GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA 3'	933
fsr	fsrBF1:5' GGGAGCTCTGGACAAAGTATTATCTAACCG 3' fsrBR2: 5' TTGGTACCCACACCATCACTGACTTTTGC 3'	541

1.11. **Análise dos perfis de fragmentação do dna cromossômico por eletroforese em campo pulsado (PFGE)**

O método de PFGE (*Pulsed field gel electrophoresis*) por ser considerado como "padrão ouro" foi empregado na tipagem molecular das amostras de enterococos em estudo. O protocolo utilizado foi baseado na descrição de Teixeira *et al.* (1997).

1.11.1. Preparo das Amostras:

Após cultivo das amostras, por 18/24h a 36±1ºC em ágar sangue, as células bacterianas foram suspensas em 500µL de tampão PIV (1M NaCl, 10mM Tris, pH 7,6), para turbidez equivalente ao padrão 8 da escala de McFarland. À suspensão celular foi adicionado o mesmo volume de agarose de baixo ponto de fusão (*NuSieve GTG Agarose*; FMC Bioproducts, Rockland, ME, EUA) a 2%, confeccionada em tampão PIV, e a mistura vertida em moldes apropriados. Após solidificar, os blocos resultantes foram incubados em uma solução de lise, constituída do tampão EC (6mM Tris, pH 7,6;

1M NaCl; 100mM EDTA; 1% Sarcosyl) adicionado de 1 mg/mL de lisozima e 5U/mL de mutanolisina (Sigma Co.), por 18-24 h a 36±1ºC. Para a remoção das proteínas, esta solução foi então substituída pelo tampão ESP (0,5M EDTA, pH 9,5; 1% Sarcosyl; 1mg/mL de proteinase K, Sigma Co.) e incubação por 18-24h a 50ºC. Após uma segunda incubação em ESP e nas mesmas condições descritas, os blocos foram submetidos a 4 etapas de lavagens (duas por 30 min e duas por 1h) em tampão TE. A partir desta etapa, os blocos foram equilibrados, por 2h, em 250 μL do tampão específico para a endonuclease de restrição *Sma*I (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EUA). Após a retirada do tampão, cada bloco foi incubado com 2U de *Sma*I por 18-24 h a 25°C, em banho-maria.

1.11.2. Eletroforese:

Após o período de digestão com a enzima *Sma*I, os blocos, contendo o DNA fragmentado por ação enzimática, foram aquecidos, a 70°C, e aplicados em gel de agarose a 1% em 0,5X TBE. Os fragmentos de restrição foram separados em um sistema de eletroforese em campo pulsado (*CHEF DRIII Variable Angle System*, Bio-Rad Labs.), por 22 h com pulsos de 5 a 35 segundos, ângulo 120º e a 6V/cm. Os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5mg/mL), por 30 min, descorados em água por 2h, posteriormente observados em um transiluminador e fotografados sob luz UV.

1.11.3. Avaliação dos resultados:

A análise dos perfis eletroforéticos obtidos por PFGE das amostras foi feita por inspeção visual. A interpretação seguiu os critérios de Tenover *et al.* (1995), onde: (i) amostras apresentando perfis idênticos foram consideradas como pertencentes ao mesmo clone; (ii) amostras estreitamente relacionadas foram aquelas cujos perfis apresentaram diferenças de duas a quatro bandas; (iii) amostras não relacionadas mostraram diferenças superiores a quatro bandas.

2. **RESULTADOS**

Foram analisadas amostras de *Enterococcus* obtidas de diferentes origens: colonização de pacientes hospitalizados, infecção (enterococcias) em pacientes hospitalizados, profissionais de saúde, dietas hospitalares servidas aos pacientes e manipuladores desses alimentos. As características deste estudo variaram de acordo com as possibilidades de obtenção dos materiais para análise. Porém, a investigação proposta teve como base uma avaliação sistêmica da resistência bacteriana a partir de diferentes fontes de isolamento, em um período determinado de tempo.

O estudo da colonização por *Enterococcus* em pacientes hospitalizados foi, caracteristicamente, prospectivo e a coleta dos materiais clínicos foi realizada em pacientes hospitalizados em unidades selecionadas, que teoricamente representariam níveis diversos de pressão seletiva, quanto ao uso de antimicrobianos, conforme explicitado em Materiais e Métodos.

Foram realizadas coletas mensais, durante três meses consecutivos, de novembro de 2000 a janeiro de 2001. Neste período, foram coletados *swabs* retais de todos os pacientes que no momento da coleta estavam hospitalizados nas enfermarias (masculina e feminina) das Unidades de Clínica Médica e de Clínica Cirúrgica e no CTI. Todos os pacientes ou, quando necessário, seus responsáveis foram esclarecidos quanto aos procedimentos aos quais seriam submetidos, para o devido consentimento da realização do estudo, de acordo com o estabelecido e aprovado pelo Comitê de Ética Médica do HUPE/UERJ.

A partir dos dados clínico-demográficos coletados, foi possível observar que o número de pacientes do sexo feminino e masculino foi coincidentemente o mesmo (61 para cada). A idade dos pacientes variou de 14 a 86 anos (média: 55,3 anos). Destacaram-se como condições clínicas subjacentes: neoplasias (21,3%) diabetes (15,6%), insuficiência renal crônica (6,6%), insuficiência respiratória associada a infecções do trato respiratório (4,1%) e síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA; 3,4%). Do total de pacientes avaliados, 50,0% (61/122) estavam em uso de antimicrobianos no momento da coleta. Destes, 57,4% (35/61) estavam em uso de esquemas terapêuticos compostos por mais de um antimicrobiano, resultando em 125 tratamentos (considerando-se cada antimicrobiano como um tratamento). Ceftriaxona

foi o antimicrobiano mais utilizado, correspondendo a 17,6% (22/125) dos tratamentos, seguido de metronidazol (8,0%; 10/125) (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição dos antimicrobianos utilizados pelos 122 pacientes avaliados neste estudo, em relação ao número de tratamentos e ao número de pacientes em tratamento durante o período de coleta do material clínico.

ANTIMICROBIANOS	% DO ANTIMICROBIANO POR:	
	Nº DE TRATAMENTOS [1] (n=125)	Nº DE PACIENTES EM TRATAMENTO [2] (n=59)
Amicacina	4,0	8,5
Ampicilina	7,2	15,3
Aztreonam	1,6	3,4
Cefazolina	1,6	3,4
Cefepime	2,4	5,1
Ceftazidima	1,6	3,4
Ceftriaxona	17,6	37,3
Ciprofloxacina	6,4	13,6
Claritromicina	3,2	6,8
Clindamicina	5,6	11,8
Gentamicina	3,2	6,8
Imipenem	4,8	10,2
Isoniazida	3,2	6,8
Metronidazol	8,0	16,9
Mupirocina	0,8	1,7
Norfloxacina	4,8	10,2
Oxacilina	4,8	10,2
Pirazinamida	3,2	6,8
Rifampicina	3,2	6,8
STX[3]	6,4	13,6
Vancomicina	6,4	13,6

[1] Corresponde a freqüência de utilização de um determinado antimicrobiano, para o total de tratamentos (um tratamento corresponde ao uso de um antimicrobiano);
[2] Corresponde a freqüência de utilização de um determinado antimicrobiano, para o total de pacientes em uso de antimicrobianos no momento da coleta do espécime clínico neste estudo;
[3] Sulfametoxazol-trimetoprim.

Foram recuperadas amostras de *Enterococcus* de 64 (52,5%; 64/122) espécimes clínicos dos pacientes estudados. Destes pacientes, 36 (56,3%; 36/64) estavam em uso de antimicrobianos no momento da coleta. Enquanto que, 25 (43,1%; 25/58) pacientes, dentre os que apresentaram cultura negativa para enterococos, fizeram uso de antimicrobianos. Os antimicrobianos mais freqüentemente utilizados entre os pacientes, cujos espécimes clínicos foram positivos para o isolamento de enterococos, também foram ceftriaxona (20,3%; 13/64) e metronidazol (12,5%; 8/64). O uso de ceftriaxona também foi prevalente entre os pacientes com cultura negativa para enterococos (10,3%; 6/58). Entretanto, foram observadas diferenças quanto à freqüência do uso dos antimicrobianos nos pacientes que apresentaram cultura positiva e negativa. O maior percentual de tratamentos realizados com a maioria dos antimicrobianos foi relacionado aos pacientes apresentando cultura positiva. Para os pacientes apresentando culturas negativas, foi observado uma maior freqüência de tratamentos relacionados aos antimicrobianos imipenem e norfloxacina (Tabela 3).

Foram avaliadas até cinco colônias sugestivas de enterococos de cada cultura positiva, resultando em 161 amostras bacterianas obtidas de colonização dos 64 pacientes com cultura positiva. As colônias consideradas sugestivas apresentaram-se escuras e circundadas por um halo negro quando em meio Enterococcosel, decorrente da hidrólise da esculina, uma das principais características do gênero *Enterococcus*.

Neste estudo, foram coletadas amostras de todos os profissionais de saúde, que atuavam nas mesmas unidades hospitalares e durante o mesmo período da avaliação da colonização de pacientes hospitalizados (uma coleta mensal de nov/2000 a jan/2001). Foram avaliados 98 profissionais (incluindo acadêmicos), dos quais 10 eram Enfermeiros, 8 Nutricionistas, 6 Fisioterapeutas, 5 Médicos, 41 Auxiliares de Enfermagem, 18 Residentes em Medicina, 5 Residentes em Enfermagem e 5 Internos em Medicina. Entretanto, não foram recuperadas amostras de *Enterococcus* a partir dos *swabs* obtidos das mãos desses profissionais.

Foram coletadas também, durante o mesmo período, dietas hospitalares (n=66) servidas aos pacientes presentes nas mesmas Unidades Hospitalares avaliadas no estudo de colonização (CTI, enfermarias de Clínica Médica e Cirúrgica), bem como *swabs* das mãos de manipuladores (n=88) dessas dietas. Dentre as 66 dietas avaliadas, 49 eram orais, 14 enterais e três parenterais, e foram selecionadas de acordo com as necessidades dos pacientes hospitalizados no momento da coleta dos alimentos. Não foi detectada a presença de amostras de enterococos nas dietas enterais e parenterais, pela metodologia

aplicada. Entretanto, foram isoladas amostras de *Enterococcus* em 17 dietas orais (34,7%; 17/49) e a partir do material coletado de seis manipuladores (6,8%; 6/88). Dentre as 17 dietas hospitalares e os seis manipuladores, foram obtidas 39 e 15 amostras de *Enterococcus*, respectivamente. Ressalta-se que não foi objetivo do estudo quantificar as colônias suspeitas de *Enterococcus* nos alimentos avaliados.

Tabela 3 – Distribuição dos antimicrobianos utilizados pelos pacientes que apresentaram cultura positiva e negativa para enterococos.

ANTIMICROBIANOS/ TRATAMENTOS	% DO ANTIMICROBIANO POR:	
	PACIENTES COM CULTURA POSITIVA	PACIENTES COM CULTURA NEGATIVA
Amicacina (n=5)	80,0	20,0
Ampicilina (n=9)	77.8	22,2
Aztreonam (n=2)	100,0	-[1]
Cefazolina (n=2)	100,0	-
Cefepime (n=3)	66,7	33,3
Ceftazidima (n=2)	100,0	-
Ceftriaxona (n=22)	63,6	36,4
Ciprofloxacina (n=8)	50,0	50,0
Claritromicina (n=4)	75,0	25,0
Clindamicina (n=7)	85,7	14,3
Gentamicina (n=4)	75,0	25,0
Imipenem (n=6)	33,3	66,7
Isoniazida (n=4)	25,0	75,0
Metronidazol (n=10)	90,0	10,0
Mupirocina (n=1)	-	100,0
Norfloxacina (n=6)	33,3	66,7
Oxacilina (n=6)	83,3	16,7
Pirazinamida (n=4)	25,0	75,0
Rifampicina (n=4)	25,0	75,0
STX[2] (n=8)	62,5	37,5
Vancomicina (n=8)	62,5	37,5

[1] Nenhum paciente;
[2] Sulfametoxazol-trimetoprim.

Adicionalmente, foi conduzida uma avaliação retrospectiva a partir da inclusão neste estudo de 61 amostras de *Enterococcus* obtidas de quadros de infecção, isoladas de pacientes hospitalizados na mesma Instituição (HUPE/UERJ), durante o período de cerca de um ano (jun/2000 a jun/2001). Estas amostras foram inicialmente isoladas no Laboratório de Bacteriologia do referido hospital. Das 61 amostras avaliadas, a maioria (62,3%; 38/61) foi isolada de urina. O restante foi obtido de sangue (16,4%), ferida (8,2%), secreções do trato respiratório (4,9%), secreções intra-abdominais (4,9%) e cateteres (3,3%).

As amostras foram obtidas de pacientes hospitalizados nas Unidades de Clínica Médica e na Nefrologia (22,9% cada). As demais amostras foram oriundas de 18,0% dos pacientes internados nas enfermarias de Clínica Cirúrgica, 11,4% no CTI, 9,8% na Unidade de Transplantes e 14,8% em Unidades referentes a outras especialidades médicas (tais como, Urologia, Adolescentes e Ginecologia – 2 amostras cada; e Pediatria, Doenças Infecciosas e Neurologia – 1 amostra cada).

Sendo assim, foram analisadas 276 amostras bacterianas, que foram compatíveis nos testes fisiológicos, como pertencentes ao gênero *Enterococcus*. Todas se apresentaram como cocos Gram-positivos, catalase negativa, hidrolisaram a esculina na presença de 40% de bile, cresceram em meio contendo 6,5% de NaCl e hidrolisaram o PYR e o LAP.

De um modo geral, dentre as 276 amostras bacterianas, a espécie mais freqüente foi *E. faecalis* (45,2%). Entretanto, a freqüência das espécies variou de acordo com a fonte de isolamento. Dentre as amostras obtidas de colonização (n=161), a predominância foi da espécie *E. faecalis* (42,2%; 68/161), seguida de *E. gallinarum* (21,7%; 35/161) e *E. faecium* (18,0%; 29/161). Dentre as amostras isoladas de infecção (n=61), a predominância absoluta foi da espécie *E. faecalis* (81,9%; 50/61). Já entre as amostras de dietas hospitalares, as espécies *E. casseliflavus* (58,9%; 23/39), e *E. gallinarum* (28,2%; 11/39) foram as que se destacaram em freqüência. Das 15 amostras isoladas de manipuladores, a predominância foi de *E. faecium* (46,7%; 7/15). A Tabela 4 apresenta as espécies de enterococos identificadas e sua distribuição quanto à origem de isolamento.

A maioria das amostras avaliadas apresentou perfis fisiológicos esperados de acordo com os padrões de classificação para as espécies de *Enterococcus*. As variações possíveis determinaram a identificação de biotipos distintos apresentados na Tabela 5. Destaca-se, por exemplo, que amostras de *E. faecium* sorbitol-negativo/rafinose-

negativa, correspondendo ao biotipo fc-III, foi o único perfil desta espécie identificado a partir de amostras de dietas e de manipuladores. Amostras de *E. casseliflavus* sorbitol-positivo foi o biotipo (cs-I) mais comum entre amostras isoladas de dietas hospitalares. O único resultado atípico pode ser observado em duas amostras de *E. gallinarum* que utilizaram o açúcar sorbitol, denominado de biotipo ga-II e incomum para a espécie (Tabela 5).

A caracterização das espécies consideradas pouco comuns como, por exemplo, *E. avium*, *E. durans* e *E. hirae*, bem como as amostras atípicas de *E. gallinarum*, foi confirmada pela análise por SDS-PAGE dos perfis de proteínas totais, comparados aos de amostras de referência. A Figura 1 demonstra um gel representativo das análises realizadas por SDS-PAGE.

Tabela 4 – Freqüência e distribuição das espécies de *Enterococcus* por origem de isolamento.

ESPÉCIES	% de Amostras Bacterianas (Nº/Total)				
	Origem de Isolamento[1]				
	COL (n=161)	INF (n=61)	DHOSP (n=39)	MANIP (n=15)	TOTAL (n=276)
E. faecalis	42,2 (68/161)	81,9 (50/61)	5,1 (2/39)	-[2]	43,5 (120/276)
E. faecium	18,0 (29/161)	4,4 (7/61)	7,7 (3/39)	46,7 (7/15)	16,7 (46/276)
E. gallinarum	21,7 (35/161)	4,9 (3/61)	28,2 (11/39)	-	17,8 (49/276)
E. casseliflavus	12,4 (20/161)	-	58,9 (23/39)	26,7 (4/15)	17,0 (47/276)
E. raffinosus	1,2 (2/161)	-	-	20,0 (3/15)	1,8 (5/276)
E. hirae	3,1 (5/161)	-	-	-	1,8 (5/276)
E. avium	1,2 (2/161)	1,6 (1/61)	-	-	1,1 (3/276)
E. durans	-	-	-	6,7 (1/15)	0,4 (1/276)

[1]Origem de Isolamento: COL, colonização; INF, infecção; DHOSP, dietas hospitalares; MANIP, manipuladores.

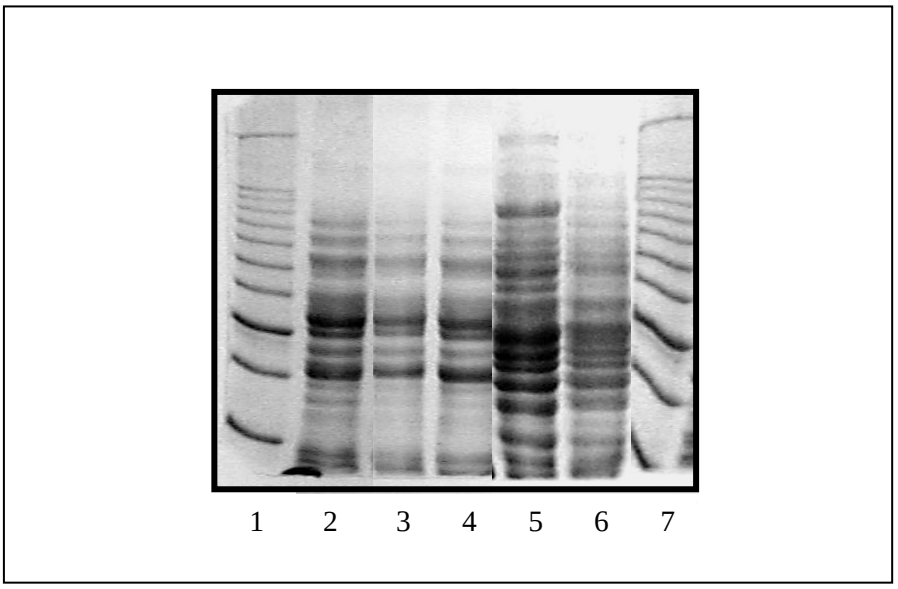
[2] Nenhuma amostra

Tabela 5 – Variações fisiológicas das 276 amostras de *Enterococcus* identificadas neste estudo.

ESPÉCIES	PERFIS FISIOLÓGICOS	TESTES FISIOLÓGICOS[1]										ORIGEM[2] % de Amostras			
		MAN	SOR	ARG	ARA	SOL	RAF	MOT	PIG	SAC	MGP	COL	INF	DHOSP	MANIP
E. faecalis	fa-I (n=113)	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	54,9	43,3	1,8	-
	fa-II (n=7)	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	85,7	14,3	-	-
E. faecium	fc-I (n=21)	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	80,9	19,1	-	-
	fc-II (n= 10)	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	80,0	20,0	-	-
	fc-III (n= 15)	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	20,0	13,3	20,0	46,7
E. casseliflavus	cs-I (n=25)	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	40,0	-	60,0	-
	cs-II (n=22)	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	45,5	-	36,4	18,1
E. gallinarum	ga-I (n=47)	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	70,2	6,4	23,4	-
	ga-II (n=2)	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	100	-	-	-
E. raffinosus	rf-I (n=2)	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	100	-	-	-
	rf-II (n=3)	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	100
E. hirae	hi-I (n=5)	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	100	-	-	-
E. avium	av-I (n=3)	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	66,7	33,3	-	-
E. durans	du-I (n=1)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100

[1] fermentação dos açúcares: MAN, manitol; SOR, sorbose; ARA, arabinose; SOL, sorbitol; RAF, rafinose; SAC, sacarose; MGP, metil-α-D-glicopiranosídeo; ARG, decarboxilação da arginina; MOT, motilidade; PIG, pigmento; Origem: COL, colonização; INF, infecção; DHOSP, dietas hospitalares; MANIP, manipuladores; +, positivo; -, negativo.

Figura 1 – Perfis de proteínas totais representativos de amostras de *Enterococcus*, obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida adicionado de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).



Linhas 1 e 7, padrões de peso molecular; 2, SS1278, amostra referência de *E. raffinosus*; 3-4, amostras clínicas; 5. SS1227, amostra referência de *E. hirae*; 6. amostra clínica.

2.1. **Fenótipos e genótipos de resistência aos antimicrobianos**

Neste etapa do estudo, foram selecionadas 191 amostras de enterococos, sendo 76 amostras de colonização, 61 de infecção, 39 de dietas hospitalares e 15 de manipuladores. Os resultados obtidos no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos por difusão em ágar (disco difusão) revelaram que as taxas de resistência variaram de 9,4%, para ampicilina, a 76,4%, para eritromicina, seguida de ciprofloxacina (54,5%). Dentre as 191 amostras avaliadas, 16,2% (31/191) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados.

Levando-se em consideração a distribuição das amostras por origem de isolamento, as taxas de resistência relativas às amostras provenientes de infecção foram as mais elevadas. Enquanto que, amostras provenientes da colonização de pele de manipuladores foram as que apresentaram as menores taxas de resistência. A maioria (>50%) das amostras provenientes de infecção foi resistente a ciprofloxacina, cloranfenicol, eritromicina e tetraciclina.

Fenótipos de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina) foram observados apenas entre amostras isoladas de colonização de pacientes

hospitalizados e de infecção. A taxa relativa a HLR-GE foi ligeiramente superior entre amostras de colonização do que de infecção. Por outro lado, as taxas de HLR-ST foram semelhantes dentre amostras isoladas de ambas as origens. A taxa de resistência plena para vancomicina foi de 5,2% (10/191), desconsiderando-se as amostras que apresentaram característica intermediária e que foram restritas as espécies móveis *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*.

A Tabela 6 demonstra os resultados obtidos quanto ao percentual de amostras resistentes aos diversos antimicrobianos testados.

Tabela 6 – Distribuição das taxas de resistência, determinadas por testes de difusão em ágar, de amostras de *Enterococcus* em relação à origem de isolamento.

Antimicrobianos	Origem de Isolamento[1] % de amostras (nº/total)				
	COL	INF	DHOSP	MANIP	TOTAL
Ampicilina	10,5 (8/76)	13,1 (8/61)	-[2]	13,3 (2/15)	9,4 (18/191)
Ciprofloxacina	53,9 (41/76)	70,5 (43/61)	38,3 (13/39)	46,7 (7/15)	54,5 (104/191)
Cloranfenicol	48,7 (37/76)	55,7 (34/61)	-	-	37,1 (71/191)
Eritromicina	76,3 (58/76)	91,8 (56/61)	56,4 (22/39)	66,7 (10/15)	76,4 (146/191)
Tetraciclina	51,3 (39/76)	70,5 (43/61)	23,0 (9/39)	13,3 (2/15)	48,7 (93/191)
Vancomicina[3]	10,5 (8/76)	1,6 (2/61)		-	5,2 (10/191)
Gentamicina[4]	38,2 (29/76)	29,5 (18/61)	-	-	24,6 (47/191)
Estreptomicina[5]	28,9 (22/76)	27,9 (17/61)	-	-	20,4 (39/191)

[1] Origem das amostras: COL, colonização; INF, infecção; DHOSP, dietas hospitalares; MANIP, manipuladores;
[2] Nenhuma amostra;
[3] Foram consideradas apenas as amostras que apresentaram resistência plena (não foi incluída a categoria intermediária, característica intrínseca de *E. gallinarum* e de *E. casseliflavus*);
Foram testados discos contendo concentrações elevadas de gentamicina e de estreptomicina para determinação dos fenótipos HLR-GE[4] e HLR-ST[5], de acordo com a metodologia descrita em Materiais e Métodos.

Dentre as espécies identificadas, foi observado que ≥ 50% das amostras pertencentes a *E. faecalis* e a *E. faecium* foram resistentes a quatro dos oito antimicrobianos testados. Destaca-se que para eritromicina 91,8% e 100% das amostras de *E. faecalis* e *E. faecium*, respectivamente, foram resistentes a este antimicrobiano. Taxas elevadas de resistência a eritromicina também foram observadas para as espécies *E. gallinarum* (45,9%; 17/37) e para *E. casseliflavus* (60,0%; 21/35).

Adicionalmente, as taxas de resistência para ciprofloxacina também foram consideravelmente elevadas dentre a amostragem estudada, particularmente nas amostras pertencentes a *E. faecalis* (72,9%; 62/85) e *E. faecium* (83,3%; 20/24). Amostras de *Enterococcus* resistentes a vancomicina-VRE (considerando-se apenas a característica de resistência plena) foram observadas entre as espécies *E. gallinarum* (21,6%; 8/37) e *E. faecium* (8,3%; 2/24).

A Tabela 7 demonstra a distribuição dos percentuais de resistência para os antimicrobianos testados, em relação as diferentes espécies de enterococos identificadas neste estudo.

A maioria das amostras de colonização e de infecção (52,6% e 55,7%, respectivamente) apresentou características de resistência a múltiplos antimicrobianos (multirresistência). Neste estudo, amostras bacterianas que apresentaram resistência a mais de três classes de antimicrobianos foram convencionalmente consideradas como multirresistentes (Tabela 8). Adicionalmente, foi observado que uma amostra isolada de urina (infecção) apresentou resistência a todas as classes de antimicrobianos testadas.

Ressalta-se que, dentre as amostras selecionadas e obtidas de manipuladores, nenhuma apresentou característica de multirresistência. De forma semelhante, foi observado que apenas uma amostra (2,6%), dentre as 39 isoladas de dietas hospitalares, foi multirresistente (Tabela 8).

A avaliação das amostras bacterianas por antibiotipagem revelou uma extensa diversidade, não sendo observados antibiotipos prevalentes para nenhuma das espécies identificadas. Foram determinados 27, 8, 8 e 7 antibiotipos para *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*, respectivamente.

Tabela 7 – Distribuição das taxas de resistência, determinadas por testes de difusão em ágar, em relação às espécies de *Enterococcus*.

Espécies	Antimicrobianos[1] % de amostras resistentes (nº/total)							
	AMP	CIP	CLO	ERI	TET	VAN[2]	GE	ST
E. faecalis (n=85)	4,7 (4/85)	72,9 (62/85)	60,0 (51/85)	91,8 (78/85)	82,4 (70/85)	-[3]	34,1 (29/85)	35,3 (30/85)
E. faecium (n=24)	50,0 (12/24)	83,3 (20/24)	50,0 (12/24)	100,0 (24/24)	20,8 (5/24)	8,3 (2/24)	45,8 (11/24)	25,0 (6/24)
E. gallinarum (n=37)	-	21,6 (8/37)	10,8 (4/37)	45,9 (17/37)	5,4 (2/37)	21,6 (8/37)	21,6 (8/37)	2,7 (1/37)
E. casseliflavus (n=35)	-	31,4 (11/35)	-	60,0 (21/35)	28,6 (10/35)		-	5,7 (2/35)
E. raffinosus (n=3)	66,7 (2/3)	33,3 (1/3)	-	33,3 (1/3)	66,7 (2/3)	-	-	-
E. hirae (n=3)	-	66,7 (2/3)	100,0 (3/3)	100,0 (3/3)	100,0 (3/3)	-	-	-
E. durans	-	-	-	100,0 (1/1)	-	-	-	-
E. avium	-	-	100,0 (1/1)	100,0 (1/1)	100,0 (1/1)	-	-	-

[1] Antimicrobianos: AMP, ampicilina; CIP, ciprofloxacina; CLO, cloranfenicol; ERI, eritromicina; TET, tetraciclina; VAN, vancomicina; GE, níveis elevados de resistência a gentamicina; ST, níveis elevados de resistência a estreptomicina.

[2] Foram consideradas apenas as amostras que apresentaram resistência plena (não foi incluída a categoria intermediária, característica intrínseca de *E. gallinarum* e de *E. casseliflavus*).

[3] Nenhuma amostra.

Tabela 8 – Taxas de resistência em relação ao número de classes de antimicrobianos testados.

Nº de classes	Origem de Isolamento % de amostras (nº/total)				
	COL	INF	DHOSP	MANIP	TOTAL
Nenhuma	15,8 (12/76)	3,3 (2/61)	38,5 (15/39)	13,3 (2/15)	16,2 (31/191)
1	1,2 (4/76)	6,6 (4/61)	17,9 (7/39)	33,3 (5/15)	10,5 (20/191)
2	13,2 (10/76)	11,5 (7/61)	33,3 (13/39)	53,4 (8/15)	19,9 (38/191)
3	13,2 (10/76)	22,9 (14/61)	7,7 (3/39)	-	14,1 (27/191)
4	25,0 (19/76)	16,4 (10/61)	2,6 (1/39)	-	15,7 (30/191)
5	25 (19/76)	27,9 (17/61)	-	-	18,9 (36/191)
6	2,6 (2/76)	9,8 (6/61)	-	-	4,2 (8/191)
7	-[1]	1,6 (1/61)	-	-	0,5 (1/191)

[1]Origem: COL, colonização; INF, infecção; DHOSP, dietas hospitalares; MANIP, manipuladores.
[2] Nenhuma amostra
Área acinzentada: multirresistentes.

Considerando-se a distribuição das amostras multirresistentes pelos setores hospitalares, foi observado que os maiores percentuais de amostras albergando esta característica estão relacionados ao CTI (75,0%), seguido das Clínicas Cirúrgicas (54,3%) e Médica (51,5%) (Tabela 9). Da mesma forma, comparando-se os índices de multirresistência nas amostras de colonização e de infecção, foi observado que, para ambas as origens de isolamento, as taxas mais elevadas corresponderam as amostras isoladas de pacientes hospitalizados no CTI (Tabela 9).

Tabela 9 – Distribuição das amostras de *Enterococcus* apresentando características de resistência a múltiplos antimicrobianos (multirresistência[1]) em relação ás Unidades Hospitalares de origem.

Unidades Hospitalares[2]	Origem de Isolamento % de amostras (nº/total)	
	Colonização	Infecção
CTI	71,4 (15/21)	85,7 (6/7)
Clínica Médica	41,9 (13/31)	71,4 (10/14)
Clínica Cirúrgica	50,0 (12/24)	63,6 (7/11)
Nefrologia	NA	50,0 (7/14)
Transplante	NA	33,3 (2/6)
Outras Especialidades	NA	22,2 (2/9)

[1] Definida como fenótipo de resistência a mais do que três classes de anitmicrobianos.
[2] CTI: Centro de Tratamento Intensivo; Clinica Médica e Clinica Cirúrgica: Enfermarias masculinas e femininas de ambas unidades; Outras especialidades: uma amostra obtida de paciente hospitalizado na Unidade de Urologia e uma amostra da Unidade de atendimento a adolescentes.
NA, Não Aplicável.

Amostras apresentando níveis elevados de resistência aos aminoglicosídeos, fenótipos HLR-GE e HLR-ST, foram identificadas a partir de colonização e de infecção. A distribuição destas amostras pelas unidades hospitalares de origem, também revelou que os maiores percentuais então relacionados aquelas isoladas de pacientes do CTI. A Tabela 10 sumariza os resultados encontrados.

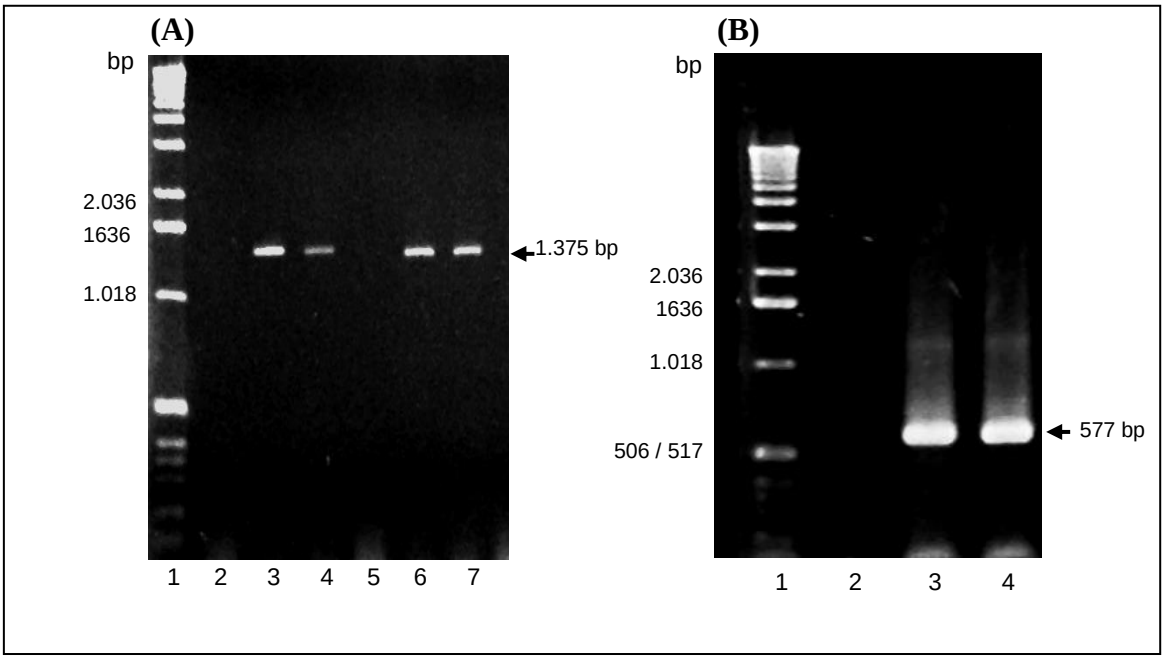
Tabela 10 – Distribuição das amostras de *Enterococcus* apresentando fenótipos de resistência a níveis elevados dos aminoglicosídeos gentamicina (HLR-GE), estreptomicina (HLR-ST) ou ambos.

Origem de Isolamento/ Unidades Hospitalares[1]	Antimicrobianos % de amostras (nº/total)			
	HLR-GE	HLR-ST	HLR-GE + HLR-ST	TOTAL
COLONIZAÇÃO:				
CTI	38,1 (8/21)	38,1 (8/21)	9,5 (2/21)	85,7 (18/21)
Clínica Médica	25,8 (8/31)	9,7 (3/31)	9,7 (3/31)	45,1 (14/31)
Clínica Cirúrgica	20,8 (5/24)	12,5 (3/24)	12,5 (3/24)	45,8 (11/24)
INFECÇÃO:				
CTI	57,1 (4/7)	-[2]	-	57,1 (4/7)
Clínica Médica	21,4 (3/14)	21,4 (3/14)	28,6 (4/14)	71,4 (10/14)
Nefrologia	21,4 (3/14)	21,4 (3/14)	-	42,9 (6/14)
Clínica Cirúrgica	27,3 (3/11)	36,4 (4/11)	-	63,6 (7/11)
Transplante	-	33,3 (2/6)	-	33,3 (2/6)
Outras Especialidades	11,1 (1/9)	11,1 (1/9)	-	22,2 (2/9)

[1]CTI: Centro de Tratamento Intensivo; Clinica Médica e Clinica Cirúrgica: Enfermarias masculinas e femininas de ambas unidades; Outras especialidades: ;
[2]Nenhuma amostra.

Todas as amostras que apresentaram fenótipo HLR-GE e HLR-ST eram portadoras dos genes *aac(6')Ie-aph(2'')Ia* e *ant(6')Ia*), respectivamente. As Figuras 2A e 2B correspondem a géis representativos de produtos de amplificação, obtidos por metodologia de PCR, relativos aos genes *aac(6')Ie-aph(2'')Ia* e *ant(6')Ia*, respectivamente.

Figura 2 – Géis representativos da detecção por técnica de PCR dos produtos de amplificação dos genes *aac(6')Ie-aph(2'')Ia* (A) e *ant(6')Ia* (B), responsáveis pelos fenótipos HLR-GE e HLR-ST, respectivamente, em amostras de *Enterococcus*.



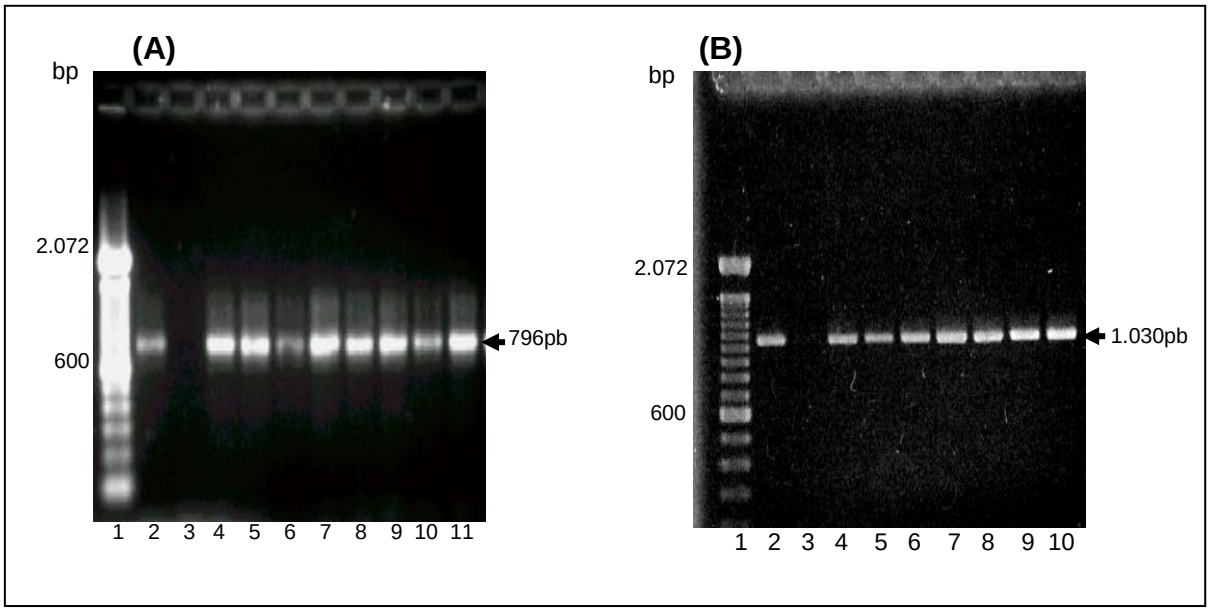
(A) Detecção de *aac(6')Ie-aph(2'')Ia*: Linhas 1. Kb *Ladder*; **2.** Controle negativo; **3.** Controle positivo (HUPE-101); **4, 6-7.** Amostras positivas para o teste; **5.** Amostra negativa para o teste.

(B) Detecção de *ant(6')Ia*: Linhas 1. Kb *Ladder*; **2.** Controle negativo; **3.** Controle positivo (HUPE-101); **4.** Amostra positiva para o teste.
HLR-GE, resistência a níveis elevados de gentamicina; HLR-ST, resistência a níveis elevados de estreptomicina.

As 10 amostras (8 *E. gallinarum* e duas *E. faecium*) que apresentaram resistência plena a vancomicina foram também resistentes, por metodologia de disco difusão, à teicoplanina (dados não mostrados). A determinação da CIM para ambos os glicopeptídeos, foi realizada por teste-E. Os resultados indicaram valores de CIM > 256μg/mL para vancomicina e de 64μg/mL a 96μg/mL para teicoplanina.

Todas as amostras que apresentaram resistência a níveis elevados de vancomicina e teicoplanina apresentaram produtos de amplificação, por metodologia de PCR, compatíveis com o gene *vanA*. Sendo assim, as 8 amostras da espécie *E. gallinarum* albergavam de forma concomitante os genes *vanC1* (espécie-específico e responsável pela resistência constitutiva e em níveis baixos à vancomicina) e o gene *vanA* (transferível e responsável pela resistência em níveis elevados à vancomicina e teicoplanina). Os géis representativos da detecção de genes de resistência a vancomicina (*vanA* e *vanC1*) estão apresentados nas Figuras 3A e 3B.

Figura 3 – Géis representativos da detecção por técnica de PCR dos produtos de amplificação dos genes *vanC1* (A) e *vanA* (B).



(A) Detecção de *vanC1*: Linhas 1. Kb *Ladder*; **2.** Controle positivo (*E. gallinarum* SS1228); **3.** Controle negativo; **4 a 11.** Amostras positivas para o teste.

(B) Detecção de *vanA*: Linhas 1. Kb *Ladder*; **2.** Controle positivo (*E. faecalis* A256); **3.** Controle negativo; **4 a 10.** Amostras positivas para o teste.

2.2. **Detecção de fenótipos e genótipos de virulência**

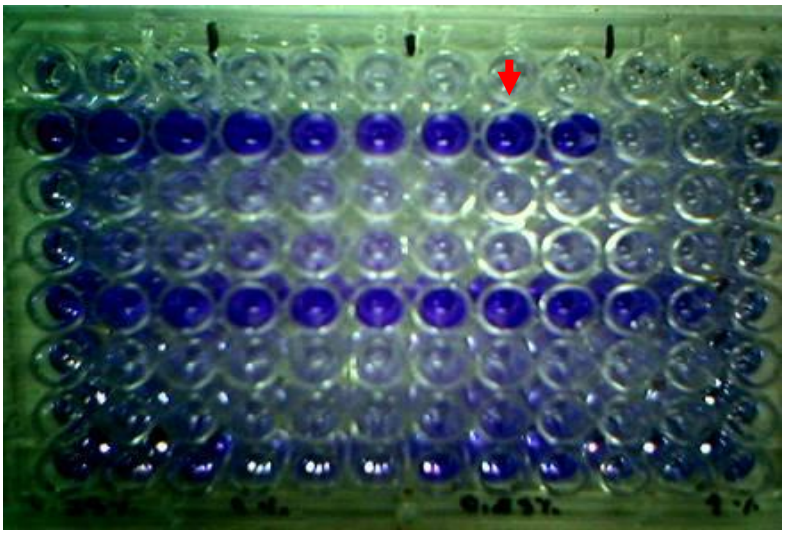
A formação de biofilme foi investigada nas mesmas 191 amostras selecionadas para as análises de perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos. A presença de biofilme foi determinada após cultivo do microrganismo em meio TSB. Avaliações iniciais incluíram diferentes concentrações de glicose (0,25%, 0,5%, 0,75% e 1,0%), para determinação das melhores condições para a realização dos testes. Os melhores resultados (obtenção de valores mais elevados nas leituras espectrofotométricas) foram provenientes do cultivo do microrganismo em meio TSB acrescido de 0,75% de glicose, sendo esta concentração escolhida para a confecção dos demais testes.

A quantificação da formação de biofilme foi realizada pela avaliação espectrofotométrica a λ=595nm. Os resultados foram decorrentes da variação na impregnação do cristal violeta, dependente da quantidade de biofilme formado nas paredes dos poços das placas de microtitulação. Os valores de leitura são proporcionais à intensidade de cor obtida na solução descorante, pela retirada do corante impregnado no biofilme.

Conforme descrito em Materiais e Métodos, a formação do biofilme foi categorizada em: forte, quando $DO_{595} \geq 0,6$; média $0,3 \leq DO_{595} \leq 0,599$; ou fraca $0,1 \leq DO_{595} \leq 0,299$. Amostras que apresentaram valores menores do que 0,1 foram consideradas não produtoras de biofilme. A Figura 4 demonstra uma placa de microtitulação representativa dos resultados obtidos.

Dentre as 191 amostras avaliadas, 134 (70,2%) foram produtoras de biofilme, sendo que destas 39,6% (53/134), 17,9% (24/134) e 42,5% (57/134) corresponderam a categorias forte, média e fraca, respectivamente. Em relação à origem, pode-se observar que o maior percentual de amostras produtoras de biofilme correspondeu àquelas provenientes de infecção (83,6%; 51/61). Enquanto que, a menor freqüência de amostras produtoras de biofilme foi detectada dentre as oriundas de dietas hospitalares (33,3%; 13/39) (Tabela 11).

Figura 4. Imagem representativa da detecção da formação de biofilme, em placas de microtitulação, por amostras de *Enterococcus*.



Maiores intensidades de cor (seta) determinam valores de leitura espectrofotométrica elevados, indicando formações de biofilme mais expressivas.

Tabela 11 – Distribuição das 191 amostras de *Enterococcus* de acordo com a origem de isolamento e a categoria de produção de biofilme (forte, médio ou fraco).

Origem[1]	Produção de Biofilme % de amostras (nº/total)				Não Produtoras % de amostras (nº/total)
	Categorias[2]			Total[3]	
	Forte	Médio	Fraco		
Colonização (n=76)	36,8 (28/76)	7,9 (6/76)	32,9 (25/76)	77,6 (59/76)	22,3 (17/76)
Infecção (n=61)	26,2 (16/61)	26,2 (16/61)	31,5 (19/61)	83,6 (51/61)	16,4 (10/61)
Dietas Hospitalares (n=39)	2,6 (1/39)	5,1 (2/39)	25,6 (10/39)	33,3 (13/39)	66,7 (26/39)
Manipuladores (n=15)	53,3 (8/15)	-[4]	20,0 (3/15)	73,3 (11/15)	26,7 (4/15)

[1] Origem de isolamento de acordo com o descrito em Materiais e Métodos; [2] Categorias de produção de biofilme determinadas de acordo com padrões estabelecidos, conforme descrito em Materiais e Métodos; [3] Total de amostras produtoras; [4] Nenhuma amostra.

Tabela 12 – Distribuição das 191 amostras de *Enterococcus* em relação as espécies identificadas e respectiva freqüência para cada categoria de produção de biofilme.

Espécies	Produção de Biofilme				Não Produtoras % de amostras (nº/total)
	Categorias % de amostras (nº/total)				
	Forte	Médio	Fraco	Total	
E. faecalis	48,2 (41/85)	22,4 (19/85)	20,0 (17/85)	90,6 (77/85)	9,4 (8/85)
E. faecium	29,2 (7/24)	20,8 (5/24)	33,3 (8/24)	83,3 (20/24)	16,7 (4/24)
E. gallinarum	2,7 (1/37)	-[1]	48,7 (18/37)	51,4 (19/37)	48,6 (18/37)
E. casseliflavus	2,9 (1/35)	-	28,6 (10/35)	31,4 (11/35)	68,6 (24/35)
E. raffinosus	40,0 (2/5)	-	20,0 (1/5)	60,0 (3/5)	40,0 (2/5)
E. hirae	-	-	100,0 (3/3)	100,0 (3/3)	-
E. durans	100,0 (1/1)	-	-	100,0 (1/1)	-

[1] Nenhuma amostra na categoria.

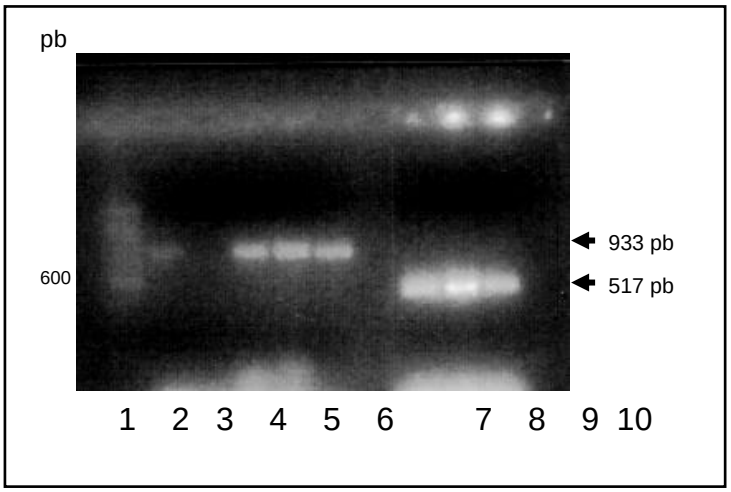
A expressão de gelatinase foi avaliada nas 191 amostras de enterococos. Os resultados positivos foram detectados pela observação do aparecimento de um halo turvo ao redor do crescimento bacteriano, resultante da hidrólise da gelatina presente no meio de cultura. Foi observado que apenas amostras pertencentes às espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, obtidas de colonização ou de infecção, expressaram gelatinase. O total de amostras produtoras foi de 25,7% (49/191). Dentre as amostras de colonização e de infecção, 28,9% (22/76) e 44,3% (27/41) expressaram gelatinase, respectivamente. Portanto, nenhuma das amostras obtidas de dietas hospitalares e de manipuladores dessas dietas foi positiva nos testes de detecção da expressão de gelatinase. Em relação às espécies estudadas, os resultados obtidos apontam uma maior associação desse fator às amostras pertencentes à espécie *E. faecalis* (55,3%; 47/85), já que foi encontrada em apenas 8,3% das amostras de *E. faecium*, e em nenhuma outra espécie avaliada. Ressalta-se que, apesar do total de amostras produtoras de gelatinase obtidas de infecção ter sido maior do que aquelas obtidas de colonização (44,3% e 28,9%, respectivamente), se considerarmos apenas as amostras de *E. faecalis*, o percentual de amostras positivas provenientes de colonização foi ligeiramente superior (63,4% em colonização *versus* 52,0% em infecção). Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 13.

Tabela 13 – Expressão de gelatinase em amostras de *Enterococcus* em relação as espécies e origem de isolamento.

Espécies	Expressão de Gelatinase / Origem das amostras % de amostras (nº/total)		TOTAL % de amostras (nº/total)
	COLONIZAÇÃO	INFECÇÃO	
E. faecalis	63,6 (21/33)	52,0 (26/50)	55,3 (47/85)
E. faecium	14,3 (1/7)	14,3 (1/7)	8,3 (2/24)
Total	28,9 (22/76)	44,3 (27/61)	25,7 (49/191)

A metodologia de PCR foi utilizada para investigar em todas as amostras de *E. faecalis* (n=85) e de *E. faecium* (n=24) a presença dos genes *cylA*, *esp* e *fsr*, que são apontados como responsáveis pela expressão de fatores de virulência nesses microrganismos. A presença desses genes foi determinada pela observação de produtos de amplificação de 517pb, 933pb e 541pb, para *cylA*, *esp* e *fsr*, respectivamente. A Figura 5 demonstra um gel representativo da determinação por PCR da presença do gene *esp* e *cylA*.

Figura 5 – Gel representativo da detecção, por metodologia de PCR, de produtos de amplificação referentes aos genes *esp* (933 pb) e *cylA* (517 pb) em amostras de *Enterococcus*.



Linha 1. Kb *Ladder***; Linhas 2 a 6, Detecção de *esp*: 2.** *E. faecalis* OG1XpAM714 (controle positivo); **3.** Controle negativo; **4 a 6** Amostras positivas para o teste.
Linhas 7 a 10, Detecção de *cylA*: 7. *E. faecalis* OG1XpAM714 (controle positivo); **8 e 9** Amostras positivas para o teste; **10.** Controle negativo.

Do total de amostras estudadas (n=109), 16,5%, 51,4% e 48,6% apresentaram produtos de amplificação referentes aos genes *cylA*, *esp* e *fsr*, respectivamente. Dentre as amostras de *E. faecalis* obtidas de colonização e de infecção, a maioria apresentou produtos de amplificação para *esp* (54,5% e 56,0%, respectivamente) e *fsr* (72,7% e 52,0%, respectivamente). Em relação à freqüência do gene *cyl*, os percentuais foram menos expressivos, independentes da origem das amostras (colonização ou infecção). Já para a espécie *E. faecium*, os percentuais mais elevados foram referentes a presença de *esp*. A Tabela 14 sumariza os resultados obtidos.

Tabela 14 – Freqüência de amostras das espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* portadoras de genes codificadores de atributos de virulência, avaliados por metodologia de PCR, em relação à origem de isolamento[1].

Genes	Espécies / Origem de Isolamento % de amostras (nº/total)							
	E. faecalis				*E. faecium*			
	Colonização	Infecção	Dietas Hospitalares	TOTAL	Colonização	Infecção	Dietas Hospitalares	TOTAL
cyl	24,2 (8/33)	14,0 (7/50)	100,0 (2/2)	20,0 (17/85)	-[2]	14,3 (1/7)	-	4,2 (1/24)
esp	54,5 (18/33)	56,0 (28/50)	-	54,1 (46/85)	71,4 (5/7)	71,7 (5/7)	-	41,7 (10/24)
fsr	72,7 (24/33)	52,0 (26/50)	-	58,8 (50/85)	28,6 (2/7)	14,3 (1/7)	-	12,5 (3/24)

[1] As amostras obtidas de Manipuladores não apresentaram produtos de amplificação referentes aos genes avaliados; [2] Nenhuma amostra

Associando-se os marcadores fenotípicos (expressão de gelatinase e produção de biofilme) e genotípicos (presença de *esp, cyl* e *fsr*) avaliados nas amostras de *E. faecalis* e *E. faecium*, pode-se observar que apenas duas (1,8%; 2/109) não apresentaram nenhum destes fatores. Ambas pertenciam a espécie *E. faecalis* e foram isoladas de infecção, sendo uma isolada de sangue de paciente com insuficiência renal crônica e em hemodiálise e a outra de infecção urinária em gestante. A distribuição do número de marcadores de acordo com a origem de isolamento das amostras de *E. faecalis* e *E. faecium* está indicada na Tabela 15.

Analisando-se o arranjo obtido com os diferentes fenótipos e genótipos avaliados pode-se observar uma extensa variabilidade de perfis de virulência distribuídos pela amostragem de *E. faecalis* e *E. faecium*. Entretanto, a presença concomitante do *esp* e capacidade de produção de biofilme foi o perfil prevalente para ambas as espécies, tanto em amostras provenientes de colonização quanto de infecção.

Tabela 15 – Distribuição das amostras de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* em relação ao número de marcadores fenotípicos e genotípicos de virulência.

Nº de Marcadores	Espécies / Origem de Isolamento % de amostras (nº/total)							
	E. faecalis				*E. faecium*			
	COL	INF	DHOSP	MANIP	COL	INF	DHOSP	MANIP
Nenhum	-[1]	4,0 (2/50)	100,0 (2/2)	NA	-	-	-	-
1	3,0 (1/33)	18,0 (9/50)	-	NA	42,9 (3/7)	42,9 (3/7)	100,0 (3/3)	100,0 (7/7)
2	15,2 (5/33)	24,0 (12/50)	100,0 (2/2)	NA	42,9 (3/7)	42,9 (3/7)	-	-
3	48,5 (24/33)	28,0 (14/50)	-	NA	-	-	-	-
4	30,3 (10/33)	24,0 (12/50)	-	NA	14,2 (1/7)	-	-	-
Todos	3,0 (1/33)	2,0 (1/50)	-	NA	-	14,3 (1/7)	-	-

[1] Nenhuma amostra; Origem das amostras: COL, colonização; INF, infecção; DHOSP, dietas hospitalares; MANIP, manipuladores; NA, não se aplica.

A Tabela 16 demonstra os percentuais relativos aos perfis prevalentes de virulência obtidos. As demais combinações entre os determinantes avaliados corresponderam a no máximo duas amostras. As três amostras de *E. faecium* obtidas de dietas hospitalares apresentaram apenas o fenótipo de produção de biofilme. Por outro lado, as duas amostras de *E. faecalis*, obtidas de dietas hospitalares, apresentaram o gene *cyl* concomitante à produção de biofilme, configurando um perfil que não foi observado dentre as amostras humanas (infecção e colonização). Todas as amostras de *E. faecium* obtidas de manipuladores de alimentos apresentaram apenas o fenótipo de produção de biofilme.

Tabela 16 – Distribuição das amostras de *E. faecalis* e *E. faecium* entre os perfis de virulência que foram prevalentes neste estudo.

PERFIS DE VIRULÊNCIA[1]	Espécie / Origem[2] / Número de Amostras			
	E. faecium		*E. faecalis*	
	COL	INF	COL	INF
esp	2	1	-[3]	3
BF	1	2	1	6
esp +BF	2	3	4	10
esp + *fsr* +BF	-	-	5	1
fsr+GEL+BF	-	-	7	9
esp + *fsr*+GEL+BF	1	-	6	9
fsr+*cyl* + GEL+BF	-	-	3	2
esp +*fsr*+*cyl* + GEL+BF	-	1	1	1

[1] BF, produção de biofilme; GEL, expressão de gelatinase.
[2] COL, colonização intestinal em pacientes hospitalizados; INF, infecção em pacientes hospitalizados.
[3] Nenhuma amostra.

2.3. **Análise dos perfis de fragmentação do dna cromossômico por eletroforese em campo pulsado (PFGE)**

Para a realização desta análise, foram selecionadas as seguintes amostras:

- 25 amostras de *E. faecium* (todas previamente avaliadas quanto aos diferentes perfis fenotípicos e genotípicos de virulência);

- 15 amostras da espécie *E. faecalis* (dentre as 85 anteriormente selecionadas para os testes de virulência), apresentando variados perfis genotípicos e fenotípicos de resistência aos antimicrobianos e de virulência, e isoladas das diferentes origens (colonização, infecção, dietas hospitalares e manipuladores);

- 8 amostras de *E. gallinarum*, provenientes de colonização intestinal (n=7) e de infecção (n=1) e que apresentaram resistência a níveis elevados de vancomicina.

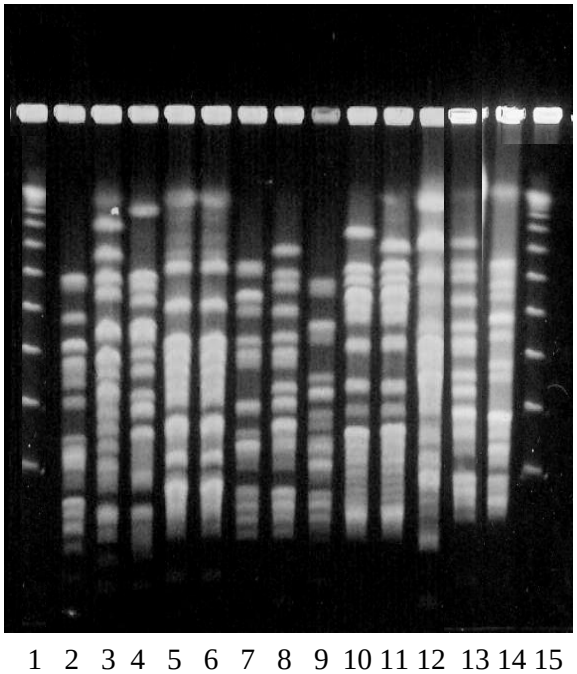
A análise do polimorfismo genético das cepas de *Enterococcus*, foi realizada visualmente a partir dos padrões de bandas determinados por técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE), após digestão do DNA com a endonuclease de restrição *Sma*I. Em relação as 24 amostras da espécie *E. faecium* foram determinados 12 perfis distintos de

fragmentação do DNA cromossômico, que foram nomeados de A a L. A Figura 6 demonstra um gel representativo dos perfis de PFGE obtidos com as amostras de *E. faecium*. Não foi observado um perfil prevalente. Adicionalmente, as amostras de *E. faecium* VRE (resistentes a níveis elevados de vancomicina e teicoplanina) apresentaram perfis idênticos, porém não relacionados aos obtidos com as amostras sensíveis (Figura 6, linha 12).

Da mesma forma, não foi observado perfil de PFGE prevalente entre as amostras pertencentes à espécie *E. faecalis* selecionadas para esta análise. Para esta espécie, considerando-se as amostras selecionadas, foram observados 9 perfis distintos.

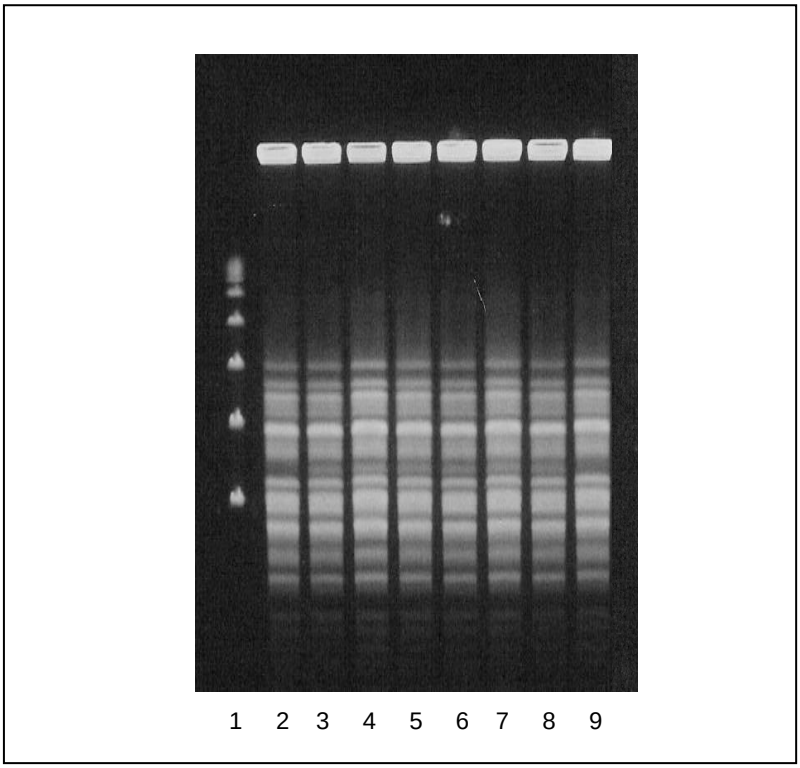
Por outro lado, as sete amostras de *E. gallinarum* que apresentaram resistência a níveis elevados de vancomicina, demonstraram perfis de PFGE idênticos. A Figura 7 apresenta o gel representativo dos perfis eletroforéticos obtidos para as amostras das espécies *E. gallinarum.*

Figura 6 – Perfis de fragmentação do DNA cromossômico, obtidos após digestão com *Sma*I e separação por eletroforese em campo pulsado de amostras de *E. faecium*.



Linhas: 1 e 15. Padrões de pares de base; **2-14.** Perfis de PFGE.
2**.** Perfil A; 3, Perfil B; 4. Perfil C;5 e 6. Perfil D;7. Perfil E; 8. Perfil F; 9. Perfil G; 10. Perfil H; 11. Perfil I; 12. Perfil J; 13. Perfil K; 14. Perfil L.

Figura 7 – Perfis de fragmentação do DNA cromossômico, obtidos após digestão com *Sma*I e separação por eletroforese em campo pulsado de amostras de *E. gallinarum* portadoras dos genes *vanA* e *vanC-1*.



Linhas: 1. Padrões de pares de base; **2 a 8.** Perfis de PFGE de amostras de *E. gallinarum vanC-1*/*vanA* obtidas de colonização; **9.** Perfil de PFGE da amostra de *E. gallinarum vanC-1*/*vanA* obtida de infecção.

3. **DISCUSSÃO**

Os microrganismos do gênero *Enterococcus* são reconhecidamente notórios patógenos hospitalares, principalmente devido a sua crescente importância como reservatórios de genes de resistência a diferentes classes de antimicrobianos, comumente usados na propedêutica médica.

Os *Enterococcus*, especialmente as espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, podem ser considerados como patógenos oportunistas. Infecções nosocomiais ocorrem usualmente em pacientes debilitados, com hospitalizações prolongadas, que apresentam uma doença de base ou que tenham recebido instrumentação médica. Entretanto, a incidência de infecções causadas por enterococos tem aumentado anualmente. Isto se deve principalmente as dificuldades no tratamento, pois a maioria é decorrente de amostras resistentes a múltiplos antimicrobianos e, portanto, refratária a antibioticoterapia de escolha.

No ambiente hospitalar, o controle da disseminação e aquisição de enterococcias causadas por amostras multirresistentes requer monitoramento contínuo diante de diferentes complicadores, que incluem particularmente a multiplicidade de vias de transmissão como a própria microbiota endógena dos pacientes, a veiculação pessoa-pessoa e os fômites contaminados (Gordts *et al.*, 1995).

Diante disto, este estudo se propôs a caracterizar marcadores fenotípicos e genotípicos envolvidos no comportamento fisiológico, resistência a antimicrobianos e virulência de amostras de enterococos de origens diversas, porém relacionadas ao ambiente nosocomial, como infecção, colonização, dietas hospitalares e os manipuladores desses alimentos, visando avaliar de forma sistêmica, por um período determinado, tais microrganismos.

As principais patologias de base encontradas nos pacientes em que foram isoladas as amostras de colonização intestinal foram as neoplasias (21,3%) e diabetes (15,6%). Em relação as amostras bacterianas obtidas de quadros de infecção, observou-se também uma freqüência elevada relacionada às nefropatias, refletida pelo índice de pacientes hospitalizados na unidade de Nefrologia. Tanto as neoplasias como as nefropatias se caracterizam como enfermidades crônicas com potencial imunodepressor. Apesar de não ter sido o enfoque em nosso estudo, podemos determinar uma paralelo com os fatores de risco á aquisição de enterococos no ambiente hospitalar. Tais fatores já foram citados por outros autores que atestam que para aquisição de enterococos, particularmente amostras com característica de

multirresistência aos antimicrobianos, a presença de patologias crônicas graves concomitantes são as principais condições predisponentes (Plessis *et al.*, 1995; Perl, 1999).

O uso de antimicrobianos, principalmente cefalosporinas (ceftriaxona), foi observado em um elevado percentual de pacientes que apresentaram colonização intestinal por enterococos multirresistentes. Estudos anteriores ressaltaram que a terapia prévia, utilizando antimicrobianos com atividade contra os enterococos, foi um fator de risco para infecção/colonização por amostras resistentes, promovendo a seleção dos microrganismos portadores de fenótipos de resistência, atuando na co-seleção dos marcadores gênicos de tais características. Jarvis *et al*. (1992), em estudo comparado de casos de bacteremia por enterococos portadores de HLR-GE, apontaram para associação deste fenótipo de resistência com o uso prévio de cefalosporinas e os carbapenemas, além das quinolonas e dos glicopeptídeos. Em um outro estudo, Weinbren, Johnson e Woodford (2000) descreveram o isolamento de amostras HLR-GE após profilaxia com ampicilina e gentamicina. Krupova *et al.*, em 1998, registraram o surgimento de episódios de bacteremias por enterococos resistentes durante profilaxia por quinolonas. Em contrapartida, um estudo desenvolvido num hospital em Indianapolis, após a redução da utilização de antimicrobianos de amplo espectro, principalmente as cefalosporinas de 3ª geração, houve uma diminuição significativa na freqüência de isolamento de microrganismos resistentes, incluindo enterococos (Smith, 1999).

Entre as origens de isolamento avaliadas, não foram obtidas amostras de enterococos das mãos de profissionais de saúde, nem das dietas enterais e parenterais. Devemos destacar que, consideramos que a investigação através da coleta de *swabs* das mãos, talvez não tenha sido o protocolo mais adequado, diante da possibilidade de contaminação eventual e em baixas concentrações. Esta hipótese baseia-se no fato de que em estudos anteriores, onde foram empregados métodos diferentes de coleta do material (imersão em meio de cultura) foram observadas taxas elevadas de colonização, sendo a colonização das mãos dos profissionais de saúde considerada como um importante veículo de transmissão de amostras multirresistentes (Bonten *et al*., 2001; Aiello *et al*., 2004). Por outro lado, a ausência de enterococos nas dietas enterais e parenterais atesta a qualidade microbiológica dos materiais avaliados, resultantes do cuidado durante o preparo. Ao contrário, Santos *et al.* (2004) demonstraram o isolamento de enterococos em 16,6% das dietas enterais avaliadas. Os autores reforçaram que, a presença destes microrganismos era um forte indicador de práticas inadequadas de manipulação.

Nos estudos de colonização intestinal dos pacientes hospitalizados, as amostras foram isoladas após o cultivo no meio *Enterococcosel*. O emprego deste meio de cultura apresenta

atributos particulares que favorecem a recuperação de amostras de enterococos, por ser diferencial, contendo esculina, e seletivo, pela presença de bile e azida sódica, reduzindo o crescimento de bactérias Gram negativas e leveduras (Gray *et al*., 1992). A metodologia de isolamento, baseada em um estudo anterior (Ieven *et al*., 1999), mostrou-se satisfatória e pode, portanto, ser mais uma vez referendada para avaliações semelhantes, como também em laboratórios clínicos de rotina.

Através de caracterização fisiológica convencional, foram identificadas 276 amostras de enterococos, obtidas das diferentes origens analisadas. A identificação dos enterococos ao nível de espécie é de grande utilidade como ferramenta epidemiológica na investigação de surtos hospitalares e para a escolha terapêutica correta, devido às diferentes características de resistência aos antimicrobianos apresentadas pelas espécies mais freqüentemente envolvidas em infecções humanas. O comportamento bioquímico da maioria das amostras de enterococos estudadas, não apresentou alteração que pudesse vir a dificultar a sua caracterização com o conjunto de testes empregados. A maior parte das variações bioquímicas observadas está prevista nas recomendações de Teixeira *et al*. (2007). A identificação das poucas amostras que apresentaram resultados atípicos foi confirmada pelo emprego da análise dos perfis eletroforéticos de proteínas totais por SDS-PAGE. Este método já foi utilizado por outros autores e se mostrou eficaz na caracterização das espécies do gênero (Merquior *et al*., 1994; Naser *et al*., 2005). No nosso estudo esta metodologia se mostrou, mais uma vez, como uma ferramenta fundamental para caracterização complementar das espécies de *Enterococcus*.

A espécie predominante em nosso estudo foi a *E. faecalis*, corroborando os dados da literatura. Entretanto, considerando-se todas as origens avaliadas, a segunda espécie em freqüência foi *E. gallinarum*. Portanto, este dado não traduz uma variação em relação ao esperado na literatura que apresenta *E. faecium*, como a segunda espécie mais isolada dos quadros infecciosos, representando até 20% das amostras clínicas (Ogier & Serror, 2007). Cabe ressaltar que, as espécies de enterococos móveis, como *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*, têm sido apontadas como prevalentes em investigações a partir de fontes contaminadas, não humanas. Adicionalmente, a inclusão de vancomicina aos meios de cultivo para isolamento primário, também favorece o crescimento de amostras dessas espécies, neste caso inclui-se os espécimes clínicos humanos.

A prevalência da espécie *E. casseliflavus* nas amostras de dietas hospitalares orais diverge um pouco do que é apresentado na literatura, quanto ao isolamento de enterococos de alimentos. Quanto aos estudos que relataram o isolamento de enterococos a partir de produtos cárneos, *E. faecalis* se destacou como a prevalente em carcaças de porcos (Knudtson &

Hartman, 1993), frangos (Turtura & Lorenzelli, 1994) e carne bovina e suína (Klein *et al.*, 1998). Já Pavia *et al.* (2000), analisaram 100 amostras de carne comercializadas em Catanzaro (Itália) e observaram que 45% das amostras de alimentos eram positivas para enterococos, sendo que as espécies mais freqüentes foram *E. faecium* (35,6%) e *E. faecalis* (33,3%). Já McGowan *et al.* (2006) em um estudo analisando amostras de frutas e vegetais, encontraram como espécie prevalente *E. casseliflavus* (35,0%), assim como os dados do nosso estudo. Entretanto, ressalta-se que as dietas orais avaliadas refletem uma composição de alimentos, que incluía carne, cereais, verduras e legumes, possivelmente apresentando índices de contaminação por espécies diversas.

Foram encontrados poucos estudos na literatura similares ao nosso no que diz respeito à análise das condições sanitárias das dietas hospitalares administradas por via oral (alimentos prontos). Monge *et al.* (1994) estudaram a qualidade sanitária de 100 amostras de salada e 100 amostras de frutas sem casca distribuídas por Serviços de Alimentação hospitalares, encontrando 93% e 64% de contaminação fecal nas saladas e frutas analisadas, respectivamente. Adicionalmente, encontraram importantes índices de contaminação fecal nas mãos dos manipuladores de alimentos e nos utensílios. Rego, Pires & Medina (1999) coletaram 265 amostras de preparações prontas para o consumo, água, equipamentos, utensílios, ambientes e mãos de manipuladores, sendo 123 antes e 142 amostras após o treinamento dos manipuladores e nutricionistas. Antes do treinamento, 39% das amostras apresentavam condições sanitárias precárias ou insatisfatórias; após, este índice foi reduzido gradativamente até alcançar o valor de 8,5%. Esses dados mostraram a importante contribuição do treinamento para a melhoria da qualidade dos alimentos produzidos por uma Unidade de Alimentação e Nutrição. Hartwell & Edwards (2001), com o objetivo de comparar 2 sistemas de distribuição diferentes, analisaram 27 amostras de alimentos servidos no desjejum, almoço e ceia aos pacientes, concluindo que em ambos sistemas os alimentos apresentaram qualidade microbiológica insatisfatória.

A presença de enterococos em alimentos é preocupante por refletir baixa qualidade microbiológica, bem como falhas nos processos de cocção e/ou de manipulação. Tais evidências podem acarretar riscos aos pacientes diante de sua condição especial, que envolve freqüentemente graus de imunossupressão. A possibilidade de aquisição de amostras albergando características de resistência aos antimicrobianos, a maioria delas supostamente veiculadas por genes extracromossômicos, pode ser considerada como uma situação de risco. Uma discussão importante é a sobrevivência destes microrganismos no trato gastrintestinal, sua implantação, multiplicação, trocas genéticas e potencial para causar doença. Entretanto,

Sorensen e colaboradores (2001) conduziram um estudo onde 18 voluntários ingeriram culturas de *E. faecium* resistentes a vancomicina e oriundas de alimentos de origem animal contaminados. Até 14 dias após a ingestão das amostras foi possível recuperá-las das fezes dos voluntários. Os autores ressaltaram que as amostras de enterococos sobreviveram à passagem pelo trato gastrintestinal, multiplicaram-se e puderam então ser recuperadas das fezes, e indicaram que os alimentos contaminados possam atuar como vias de transmissão de amostras resistentes. A veiculação de enterococos das mãos dos manipuladores para os alimentos e vice-versa não foi avaliada em nosso estudo. Entretanto, sabe-se que estes microrganismos são freqüentemente transmitidos via contato direto, sendo assim, os manipuladores de alimentos, dentro do ambiente hospitalar, podem também ser ativos na transmissão desses microrganismos.

Nas últimas décadas tem sido verificado um aumento rápido no número de infecções graves causadas por enterococos resistentes a múltiplos antimicrobianos (Tendolkar, Baghdayan & Shankar, 2003). Atkinson, Abu-Al-Jaibat e LeBlanc (1997) num interessante estudo realizado com amostras de enterococos isoladas entre 1953 e 1954, verificaram 54% de resistência a tetraciclina, 2,7% a eritromicina, 0,9% ao cloranfenicol e 53% a níveis elevados de estreptomicina, não sendo detectado nenhuma amostra com resistência a ampicilina, gentamicina ou vancomicina. Menos de meio século após, os dados apresentados na literatura, assim como, os verificados em nosso estudo apontam para valores elevados nas taxas de resistência aos antimicrobianos entre amostras de enterococos. Adicionalmente, os enterococos são intrinsicamente resistentes a maioria dos antimicrobianos usados na terapêutica, e eles são conhecidos pela capacidade de adquirir e transferir marcadores de resistência por um processo mediado por genes presentes em plasmídeos e transposons, o que facilita essa disseminação (Murray, 1990).

Em nosso estudo, os percentuais de resistência mais elevados detectados em nossas amostras corresponderam a eritromicina (76,4%), ciprofloxacina (54,5%) e tetraciclina (48,7%). De acordo com a origem de isolamento, as maiores taxas de resistência encontradas pertenceram às amostras provenientes de quadros de infecção. Quando analisamos por espécie estudada, observamos que, *E. faecalis* apresentou altas taxas de resistência para os antimicrobianos eritromicina (91,8%) e tetraciclina (82,4%) e, já para a espécie *E. faecium*, obtivemos taxas de resistência para todos os antimicrobianos testados, tendo 100% de resistência a eritromicina e 83,3% para ciprofloxacina.

De acordo com Franz *et al.* (1999) a presença de resistência baseada na aquisição de plasmídeos e transposons é relevante para eritromicina, altas concentrações de

aminoglicosídeos, tetraciclinas, beta-lactâmicos e glicopeptídeos. Da mesma forma, a ocorrência concomitante de resistência à tetraciclina e gentamicina é comum em amostras de eneterococos.

Resistência a eritromicina em enterococos é um marcador freqüentemente associado às cepas isoladas de amostras de carcaças animais, comercializadas pela indústria alimentícia (Martel *et al.*, 2002). Eritromicina é um antimicrobiano que faz parte do grupo dos macrolídeos. Macrolídeos, lincosamina e estreptogramina forma uma família, comumente designada de MLS, e, apesar de quimicamente distintos, têm um modo de ação similar. Já foram descritos vários genes que conferem resistência cruzada à maioria dos antimicrobianos desta família (Roberts *et al*., 1999). Em enterococos, a resistência à eritromicina pode ser decorrente de um número variado de marcadores genotípicos. Entretanto, de acordo com a literatura, a maioria das amostras que expressaram resistência aos macrolídeos, dentre as de origem humana e animal, é decorrente da presença de genes *erm* (Roberts *et al*., 1999). Diferentes classes de genes *erm* têm sido descritas, mas em *Streptococcus* e em *Enterococcus*, *ermB* é o mais freqüentemente encontrado (Arpin *et al*., 1999; Jensen, Fridmodt-Moller & Aarestrup, 1999). Em nosso estudo não foi determinado, o marcador genotípico que estaria associado a resistência à eritromicina nas amostras estudadas que apresentaram, independente da origem, taxas de resistência bastante elevadas.

Apesar do uso de tetraciclina no tratamento das infecções humanas estar diminuindo, dando lugar ao uso de minociclina e glicilcilina, as taxas de resistência a este antimicrobiano continuam elevadas. Em um estudo de Huys e colaboradores (2004), comparando enterococos de diversas origens frente à resistência a tetraciclina, os autores encontraram taxas elevadas de resistência em amostras obtidas de todas as fontes estudadas. Os autores ressaltaram que a resistência a este antimicrobiano não está restrita apenas a amostras humanas, mas também a amostras isoladas de ambiente e alimentos. Em nosso estudo, taxas elevadas de resistência à tetraciclina estiveram mais relacionadas as origens colonização e infecção em pacientes hospitalizados. Sendo esta última a que apresentou maior destaque. Comparando-se com dados da literatura, pode-se relatar que Portillo *et al*. (2000), em um extenso estudo sobre a distribuição de marcadores de resistência aos macrolídeos em enterococos, indicaram que o gene *msrA* foi o marcador genotípico prevalente em amostras de enterococos, particularmente em *E. faecium*. Porém, a pesquisa desses marcadores não fez parte dos objetivos de nosso estudo.

Um dado marcante, em nosso estudo, foi a resistência à ciprofloxacina. Foram encontradas taxas de resistência elevadas para as amostras das diferentes origens.

Comparativamente, apresentamos dados do início da década de 90, em que Gordon *et al.* (1992) não encontraram taxas de resistência elevadas para esses antimicrobianos em amostras de enterococos. Nossos achados apontam para a mudança radical neste aspecto, e sugere que o emprego disseminado de fluorquinolonas, particularmente nos últimos 10 anos, tenha sido decisivo para a emergência de amostras resistentes.

Dentre os agentes ativos contra parede celular, a ampicilina é, certamente, o beta-lactâmico de escolha, uma vez que grande parte das cepas de enterococos é resistente à penicilina (Murray, 1998). A combinação de um agente ativo contra parede celular e um aminoglicosídeo é bactericida para os enterococos e ainda é considerado como um esquema imprescindível no tratamento de infecções graves, como endocardites e meningites (Levison, 2000). Em nosso estudo, não encontramos taxas elevadas de resistência à ampicilina. Entretanto, essa avaliação foi realizada apenas por metodologia de difusão em ágar. Consideramos a possibilidade futura de avaliarmos tais amostras por metodologia de diluição, o que deverá trazer indicações mais fiéis quanto ao comportamento dessas amostras frente a este antimicrobiano. Porém, podemos indicar o encontro de uma variação considerável entre as taxas de resistência à ampicilina nas diferentes espécies de enterococos. Como esperado, o maior percentual de amostras foi relacionado a espécie *E. faecium* (50,0%) comparado a *E. faecalis* (4,7%). Este resultado é concordante com a literatura que aponta que amostras de *E. faecalis*, em geral, apresentam maior susceptibilidade à ampicilina do que *E. faecium* (Fontana *et al*., 1992; Teixeira *et al*., 2007).

A presença de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLR) foi determinada, neste estudo, por técnica de difusão em ágar. Sabe-se que, a resistência a concentrações elevadas de estreptomicina e de gentamicina é decorrente, na maioria das vezes da expressão de EMAs. Em nossos estudo, a resistência a níveis elevados de estreptomicina (HLR-ST) foi relacionada a presença do gene *ant(6')Ia* detectada entre amostras obtidas de colonização e de infecção. Historicamente, o aumento da freqüência de isolamento de amostras apresentando resistência a níveis elevados de estreptomicina (CIM > 2.000μg/mL) levou ao uso indiscriminado de gentamicina, em associação a um beta-lactâmico, para o tratamento das enterococcias graves associadas em sua maioria ao ambiente hospitalar. Conseqüentemente, foi observada a emergência de amostras resistentes a níveis elevados de gentamicina (CIM > 500μg/mL), o que vem freqüentemente determinando assim falhas terapêuticas decorrentes do emprego dessa associação. (Murray, 1998). Em nosso estudo, observamos que a maioria (69,2%) das amostras obtidas dos quadros infecciosos que resultaram em óbitos eram portadoras de fenótipos HLR.

A resistência a níveis elevados de gentamicina (HLR-GE) pode ser codificada principalmente pelos seguintes genes: *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* e *aph(2'')-Id*. O fenótipo mais comum é codificado pelo gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* e deve-se à expressão de uma proteína bifuncional, a AAC(6')-I/APH(2")-I, com atividades de 6'-acetiltransferase e de 2"-fosfotransferase. A combinação destas duas atividades, além de eliminar o efeito sinérgico conhecido, promove resistência referente a CIM ≥ 500 μg/mL (Tsai *et al.*, 1998). A expressão desta enzima ainda confere resistência à amicacina, canamicina, tobramicina, netilmicina e sisomicina Em nosso estudo, todas as amostras apresentando o fenótipo HLR-GE eram portadoras do gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*.

Nenhuma das amostras obtidas de dietas hospitalares ou de manipuladores expressou tais características. Em relação as amostras de colonização e de infecção, os nossos dados estão de acordo com o que está descrito na literatura, que também vem apontando percentuais elevados de amostras de enterococos portadoras do fenótipo HLR. Estudos recentes, realizados em Portugal e na Polônia, destacaram percentuais de amostras clínicas resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos, particularmente gentamicina, de 15% e 54,6%, respectivamente (Piekarska *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2003). No Brasil, Stern, Carvalho & Teixeira (1994) observaram a presença deste fenótipo de resistência em 33% das amostras de enterococos avaliadas.

O surgimento de resistência à vancomicina em cepas de enterococos prejudica drasticamente a terapêutica das enterococcias. Por anos, a vancomicina vem sendo utilizada em pacientes alérgicos aos beta-lactâmicos ou infectados por cepas de enterococos resistentes. O aparecimento de cepas de VRE, muitas vezes, elimina qualquer esquema terapêutico eficaz, tornando estes microrganismos um dos principais problemas de resistência bacteriana a antimicrobianos na atualidade (Murray, 2000). Além disso, a possibilidade de transmissão dos genes responsáveis pela resistência à vancomicina para outros microrganismos com maior potencial de virulência, como para o *Staphylococcus aureus*, acentua a gravidade deste problema (Perl, 1999; Askarian *et al*., 2007). Muitos países, em todo mundo, já vêm convivendo com tal problemática desde a década de 80 (Murray, 1998). O surgimento de cepas de VRE neste estudo, aliado a outros relatos no Brasil (Dalla Costa *et al*., 1998; Sader, 1998; Zanella *et al*., 1999) parece um fenômeno ameaçador que vem a desafiar microbiologistas, farmacologistas, clínicos e profissionais de saúde frente à necessidade de evitar que se instale um quadro endêmico de difícil controle

Em nosso estudo, isolamos dez amostras de *Enterococcus* que se apresentaram resistentes ao antimicrobiano vancomicina. Oito destas amostras pertenciam à espécie *E.*

gallinarum e duas à espécie *E. faecium*. Nos enterococos móveis, além da resistência intrínseca, caracterizada pela presença do gene *vanC-1*, foi detectado a presença do gene *vanA*. Este genótipo é caracterizado como responsável pelo mecanismo transferível de resistência a níveis elevados de glicopeptídeos, incomum nas espécies de enterococos móveis. A resistência a níveis elevados de glicopeptídeos nessas amostras foi, primeiramente, evidenciada pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por teste-E, que caracterizou o fenótipo VanA e, posteriormente confirmada por PCR, que detectou o genótipo correspondente (*vanA*).

Cabe destacar que, o isolamento de amostras de *E. gallinarum* portadoras de *vanA* isoladas de colonização ocorreu ao acaso, e sugeriu tratar-se de uma situação peculiar da Instituição avaliada, durante o período de estudo. Entretanto, o isolamento de uma amostra proveniente de um quadro de bacteremia, passou a sugerir a possibilidade de uma transmissão dessas amostras na Instituição avaliada. A resistência intrínseca aos glicopeptídeos, aliada a habilidade que estes microrganismos possuem de adquirir outros determinantes de resistência aos antimicrobianos, favorece a permanência das amostras dessas espécies no ambiente hospitalar (Schooneveldt, Marriott & Nimmo, 2000). Entretanto, as normas de controle da disseminação de amostras portadoras do gene *vanA* ou *vanB*, indicadas pelo CDC (1999) não ressaltam a possibilidade da presença desses genes em outras espécies que não sejam *E. faecalis* ou *E. faecium*. Nossos achados chamam atenção para a ocorrência de outras espécies de enterococos que possam estar participando na manutenção e dispersão desses determinantes genéticos de resistência no ambiente hospitalar. Apesar dessas amostras não caracterizarem situações epidêmicas, certamente refletam a ampla veiculação desses genes, determinando a carência na implementação de práticas de contenção à disseminação.

O primeiro caso descrito de isolamento de amostras VRE no Rio de Janeiro ocorreu também no HUPE/UERJ, em janeiro de 2000, por amostras de *E. faecalis* que albergavam os genes *vanA*, *ermB* e *aac(6')-aph(2'')*, mas não apresentavam resistência a níveis elevados de estreptomicina (Albuquerque *et al.*, 2000). Ou seja, portavam o mesmo conjunto gênico de resistência detectado nas amostras de *E. gallinarum* avaliadas em nosso estudo. Tais "coincidências" precisam de uma investigação molecular mais aprofundada que possa evidenciar a possibilidade de transmissão e co-transferência de todos esses determinantes de resistência entre as espécies de *Enterococcus*. Lu *et al.* (2000) reportaram a capacidade de transferência *in vitro* do gene *vanA* de uma amostra de *E. gallinarum* para outra de *E. faecalis*, por ensaios de conjugação. Essa demonstração, mesmo que experimental, ressaltou a importância do controle estringente do uso de vancomicina no ambiente hospitalar e da

necessidade da inclusão de amostras VRE, independente da espécie, nos protocolos de controle e de rastreamento dos pacientes colonizados.

Tanto o setor de Clínica Médica, como o CTI, concentram vários fatores que favorecem à aquisição de cepas de microrganismos resistentes. Esses fatores incluem a presença de pacientes gravemente adoecidos, com patologias imunossupressoras, fazendo uso de uma série de procedimentos invasivos. Além disso, o uso corrente de antibioticoterapia de amplo espectro, proporcionando uma pressão seletiva considerável, contribui amplamente para o surgimento e manutenção de cepas portadoras de características de resistência. Nesses setores foram encontradas as maiores taxas de resistência observadas em nosso estudo.

Os achados deste estudo apontam a alta freqüência e variedade de fenótipos e genótipos de resistência, presentes tanto em cepas isoladas de infecção, como de colonização. Especificamente com relação ao controle de infecção por VRE, diversas instituições onde este microrganismo é endêmico vêm relatando aumento na freqüência de isolamento, apesar de medidas de controle adotadas. Baseado em estudos de epidemiologia molecular, Hayden (2000) chama a atenção para as redefinições quanto o fenômeno da disseminação intra-hospitalar de cepas de VRE. O autor refere que caso este microrganismo não seja controlado logo que surge em dada instituição, casos esporádicos de surtos monoclonais são substituídos por uma endemicidade policlonal. Novos antimicrobianos têm sido desenvolvidos na tentativa de oferecer novas opções terapêuticas para o tratamento de cepas de enterococos multirresistentes, porém os resultados não são muito animadores. A rápida disseminação da resistência bacteriana enfatiza a importância de um esforço multidisciplinar, incluindo microbiologistas, infectologistas, epidemiologistas, farmacologistas, médicos e enfermeiros, para implementação de um programa baseado no controle de infecções e no uso racional dos antimicrobianos. Programa este que deve ser incorporado nas metas de qualidade de qualquer instituição de saúde, para que seja seguido com rigor.

Possivelmente, o primeiro estudo sobre fatores de virulência em enterococos data de 1934 (Todd, 1934). O autor observou atividade beta-hemolítica nos sobrenadantes das culturas desses microrganismos. Alguns anos mais tarde, Kobayashi (1940) apontou a substrato-especificidade da beta-hemolisina enterocócica e descreveu que hemácias de cavalo, humanas e de coelho eram susceptíveis a ação deste exoproduto, mas o mesmo não era observado para eritrócitos de carneiros. Posteriormente, este fato pôde ser explicado pela descoberta de que eritrócitos apresentando elevados índices de fosfatidilcolina eram mais susceptíveis a ação da dessa hemolisina, o que sugeriu ser este o seu ligante específico nessas células (Miyazaki *et al,* 1993). Granato & Jackson, em 1969, foram os primeiros a sugerir que

a atividade beta-hemolítica em enterococos era decorrente da expressão de múltiplos componentes que atuariam de forma conjunta. Os autores relataram que zonas de beta-hemólise eram observadas no meio cultura apenas em regiões de interseção da semeadura de mutantes não hemolíticos, produzidos por exposição a nitroguanidina. Estes achados levaram aos autores a concluírem que a atividade hemolítica era dependente da ação complementar de produtos liberados por tais mutantes. Atualmente, sabe-se que esta atividade é decorrente da expressão de um conjunto de genes localizados em um único operon (designado como operon *cyl*). Este operon pode estar presente em plasmídios conjugativos ou transposons e, também, já foi encontrado associado a ilhas de patogenicidade localizadas no cromossomo de algumas amostras de *E. faecalis* (Shankar *et al*., 2002). Um outro fator de virulência, a gelatinase enterocócica, foi inicialmente identificada há mais de 40 anos (Bleiweis & Zimmerman, 1964), sendo caracterizada como uma zinco-metaloproteinase. Esta proteinase é ativa contra diversos substratos, particularmente o colágeno, e é produzida na fase exponencial tardia, quando há uma densidade elevada de células no meio. Sendo assim, foi observado que sua expressão é regulada por *Quorum sensing* (Haas *et al*., 2002; Nakayama *et al*., 2002).

Entretanto, os enterococos permanecem considerados como possuidores de características de virulência pouco expressivas. Até o momento, somente alguns exoprodutos vêm sendo considerados alvos de estudos, na tentativa de elucidar a patogênese das enterococcias graves. Considerando-se que ainda não foram totalmente esclarecidos quais fatores são realmente responsáveis pela patogenicidade de enterococos, a ausência fenotípica de alguns deles não implica necessariamente que se trata de uma amostra não patogênica.

Mais recentemente, esses microrganismos têm sido associados com a formação de biofilmes, principalmente em dispositivos médicos invasivos, como cateteres e sondas. Entretanto, a compreensão do processo de formação de biofilmes por enterococos ainda não está completamente esclarecida (Donlan & Costerton, 2002; Sandoe *et al.*, 2003; Seno *et al*., 2005; Di Rosa *et al.* 2006).

Em nosso estudo, todas as amostras foram avaliadas frente a capacidade de formação de biofilme. Do total de amostras estudadas, 70,2% apresentaram esta característica e dentre estas, 39,6% foram identificadas como produtoras na categoria "forte", de acordo com os padrões utilizados e referidos em Materiais e Métodos. A maior freqüência de amostras produtoras foi relacionada a espécie *E. faecalis*.

Em relação à expressão de gelatinase, 25,7% foram produtoras, e foi observado que apenas amostras pertencentes às espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, tanto de colonização quando de infecção, expressaram esse fator de virulência. Amostras provenientes das dietas

hospitalares e dos manipuladores de alimentos não foram produtoras de gelatinase. Poeta e colaboradores (2006) relataram a atividade de gelatinase em amostras de *E. faecalis* isoladas de aves, porém nas outras espécies analisadas essa atividade representou 2,5%, demonstrando que esta atividade não é muito freqüente nas outras espécies do gênero. Freqüências de produção de gelatinase (em valores bem mais expressivos do que os encontrados em nosso estudo) foram divulgadas por Roberts *et al*. (2004), avaliando amostras de origem humana, e por Lopes e colaboradores (2006), estudando enterococos isolados de laticínios (67% e 90%, respectivamente).

Neste estudo, avaliamos genotipicamente, quanto à presença dos fatores de virulência, somente amostras pertencentes às espécies *E. faecalis* e *E. faecium*. Estes dados estão em acordo com a literatura que considera que poucas são as amostras de enterococos, pertencentes as demais espécies, que sejam produtoras de fatores associados à virulência (Edwards, 2000). A presença de, pelo menos um fator de virulência foi detectada em 79,3% das amostras analisadas, sendo 16,5%, 51,4% e 48,6% para *cylA*, *esp* e *fsr*, respectivamente. Dentre a espécie *E. faecalis*, *fsr* foi o fator predominante com 58,8%, seguido de *esp* (54,1%) e *cylA* (20,0%). Já para a espécie *E. faecium*, a presença de *esp* foi encontrada em 41,7% das amostras investigadas.

Willems *et al.* (2001) associaram a presença do gene *esp* com *E. faecium* resistentes à vancomicina isolados em surtos nosocomiais, porém, mais tarde, outros pesquisadores encontraram o gene em enterococos sensíveis à vancomicina (Eaton & Gasson, 2001; Woodford *et al.*; 2001; Leavis *et al*, 2004). Vankerckoven *et al.* (2004) detectaram a presença do gene *esp* em 92% de amostras clínicas de *E. faecium* resistentes à vancomicina e 73% de amostras fecais. Além do mais, a presença de *esp* descrita por Vankerckoven *et al.* (2004) foi maior em *E. faecium* resistentes à vancomicina do quem em amostras sensíveis a este antimicrobiano (77% e 53%, respectivamente). Dupré *et al.* (2003) descreveram a presença de *esp* em 60% de amostras clínicas de *E. faecalis*. Creti *et al.* (2004) determinaram a presença de *esp* em 48% de amostras hospitalares, 20% de comensais e 50% de meio ambiente. Recentemente, Harrington *et al.* (2004) descreveram que 40% de 137 amostras de *E. faecalis* isoladas somente de bacteriemia eram *esp* positivas em um hospital nos Estados Unidos.

Adicionalmente, já foi relatado que, a produção de biofilme pode ser afetada por condições ambientais, atividade de gelatinase e presença do gene *esp*. Estudos apontaram para esta possível relação da presença de *esp* com uma forte formação de biofilme (Toledo-Arana *et al*., 2001). Estes autores observaram que 87 das 93 amostras de *E. faecalis* (93,5%) que possuíam o gene *esp*, foram capazes de produzir biofilme *in vitro*. A mesma associação não

foi observada para as 59 cepas que não possuíam este gene. Neste mesmo estudo, porém, duas amostras de *E. faecalis* tiveram uma forte produção de biofilme, entretanto não apresentavam o gene *esp*, sugerindo a existência de um mecanismo para desenvolvimento de biofilme *esp*-dependente e um *esp*-independente. Estudos independentes realizados em outros grupos têm confirmado a presença de uma via *esp*-independente na formação de biofilme em *E. faecalis* (Kristich *et al.*, 2004; Mohamed *et al*., 2004; Ramadhan & Hegedus, 2005; Di Rosa *et al.*2006). Em nosso estudo, observamos que os perfis de virulência mais freqüentemente encontrados em amostras de infecção corresponderam a presença concomitante do gene *esp* e a produção de biofilme. Entretanto, amostras apresentando apenas *esp* ou biofilme, também foram freqüentes, sugerindo tratar-se das vias de expressão descritas por outros autores.

A presença do gene *cylA*, que está relacionada a expressão de uma atividade hemolítica, foi detectada em apenas uma amostra de *E. faecium* (4,2%) e em 20,0% das amostras de *E. faecalis*. Como para os outros fatores avaliados, os dados da literatura são freqüentemente discordantes. Mundy *et al*. (2000) observaram que este gene é reconhecidamente prevalente em amostras de *E. faecium*. Entretanto, Vankerckhoven e colaboradores (2004), estudando amostras de *E. faecium* isoladas de um hospital europeu não detectaram a presença deste gene em nenhuma das amostras analisadas. Camargo *et al.* (2006) não obtiveram amostras portadoras de *cyl*, quando analisaram a ocorrência de marcadores de virulência em 56 isolados de *E. faecium* resistentes ou não a vancomicina e obtidos de amostras fecais e de infecções em pacientes no Brasil.

Em nosso estudo, não foi avaliado a presença do gene *gelE*, determinante da expressão de gelatinase. Porém investigamos a presença de *fsrB*, pertencente ao operon *fsr*, que vem sendo descrito como regulador da expressão de gelatinase e de serina-protease em um complexo sistema de *quorum sensing*. Bourgogne e colaboradores (2006) relataram que a presença do gene *fsr* foi diretamente relacionada com a expressão da gelatinase em amostras clínicas de *E. faecalis*. Porém, em nosso estudo, em seis amostras de *E. faecalis* (duas de infecção e quatro de colonização), foi observada a expressão de gelatinase, porém não foi detectada a presença do gene *fsr*. Esses achados permanecem inconclusivos e estudos adicionais serão necessários para o esclarecimento de tal questão.

Uma questão importante permanece por ser respondida e diz respeito a se enterococos originados de alimentos ou da comunidade possuem um potencial patogênico equivalente, ou se há diferença na patogenicidade existente entre as amostras isoladas de origens diversas. Teuber, Meile & Schwarz (1999), utilizando testes moleculares para definição de polimorfismos de amostras isoladas de produtos alimentares processados e de seus

determinantes de resistência e virulência, observaram uma extensa identidade genotípica com amostras clínicas e seus respectivos determinantes. Eaton & Gasson (2001) avaliaram a freqüência da expressão de fatores de virulência em amostras de *E. faecalis* isoladas de material clínico humano e de alimentos. Os autores observaram que as amostras isoladas de alimentos (leite, queijo e carne) expressaram vários desses fatores, comuns em enterococos, incluindo hemolisina e gelatinase. Entretanto, o percentual de amostras isoladas de alimentos, apresentando tais características, foi inferior ao encontrado para as obtidas de infecções humanas.

Os resultados obtidos com a técnica de PFGE revelaram uma heterogeneidade genética das amostras avaliadas. Não foi possível fazer uma correlação quanto a dispersão dessas amostras entre as origens estudadas. Dentre as amostras da espécie *E. faecium* obtidas de colonização, foram observados padrões de fragmentação idênticos em amostras obtidas de pacientes diferentes hospitalizados em mais de uma unidade hospitalar (uma amostra obtida do CTI e 5 de enfermaria de Clínica Médica). Adicionalmente, estas amostras apresentaram também perfis de resistência e de virulência idênticos. Entretanto, não foi possível determinar um perfil prevalente. As amostras de *E. faecium* resistentes à vancomicina, apresentaram um perfil de fragmentação idêntico entre si, porém distinto das demais amostras da espécie. Em relação as amostras pertencentes a espécie *E. faecalis* também não encontramos um perfil de fragmentação prevalente, onde das 15 amostras analisadas, encontramos 9 perfis distintos. Entretanto, em relação às amostras de *E. gallinarum* resistentes à vancomicina foi observada a presença de um único perfil de PFGE. Estas amostras foram obtidas de sítios anatômicos diversos (sangue, colonização retal e colonização de pele) e de pacientes atendidos em setores hospitalares diferentes, sugerindo a ocorrência de transmissão horizontal. A importância de amostras de *E. gallinarum-vanA* no ambiente hospitalar reside tanto na redução das alternativas terapêuticas para as eventuais infecções causadas por estes microrganismos, quanto no potencial de disseminação destas características.

Além disso, a detecção de enterococos intrinsecamente resistentes a baixos níveis de vancomicina que adquiriram genes adicionais de resistência aos glicopeptídeos suporta o argumento de que a identificação das espécies de enterococos e a determinação da susceptibilidade aos glicopeptídeos não predizem necessariamente o genótipo. A grande similaridade entre as amostras portadoras dos genes de resistência adquirida pesquisados, demonstrada pela técnica de PFGE, aponta para a disseminação de um clone multirresistente na Instituição analisada. Tal informação chama a atenção para que laboratórios clínicos de rotina estejam alertados quanto à possibilidade de enterococos móveis serem também

portadores de genes responsáveis principalmente por resistência a níveis elevados de glicopeptídeos e aminoglicosídeos. Diante disso, por considerar a emergência de amostras com essas características em nosso meio e a possibilidade dos enterococos móveis atuarem na manutenção e disseminação destes genes, principalmente *vanA*, sugerimos a inclusão desses microrganismos no monitoramento das infecções hospitalares.

Devido à importância crescente do gênero *Enterococcus*, particularmente a espécie *E. faecalis*, como patógenos nosocomiais, associada ao aumento da prevalência de amostras albergando mecanismos emergentes de resistência aos antimicrobianos (por exemplo, HLR para aminoglicosídeos e glicopeptídeos), considera-se que a identificação de fatores de virulência que estejam relacionados ao aumento da gravidade das infecções são importantes objetos de estudo. Visto que, a melhor caracterização desses fatores, que se encontram distribuídos em freqüência considerável nas amostras de *E. faecalis*, como foi observado em nosso estudo, pode auxiliar para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas diante da problemática da resistência aos antimicrobianos, atualmente relacionada a esse gênero. Tais achados, aliados a habilidade natural dos enterococos em adquirir, acumular e transferir elementos extracromossômicos, inter-espécies e até mesmo para outros gêneros bacterianos, estudos adicionais são necessários para avaliar corretamente a evolução da patogenicidade em *E. faecalis* e conseqüentes riscos para a saúde humana.

4. **CONCLUSÃO**

A importância dos enterococos como causadores de infecções vem crescendo, principalmente pela emergência de “novos” mecanismos de resistência aos antimicrobianos, especialmente aos glicopeptídeos e os novos estudos referentes ao seu potencial de virulência. Em conclusão, este estudo mostrou que amostras de enterococos isoladas de diferentes fontes, não só de quadros infecciosos, podem representar um risco para a população, principalmente em pacientes hospitalizados e imunocomprometidos, apontando para uma maior reflexão quanto ao papel desses microrganismos nas infecções humanas e no ambiente hospitalar. A elevada taxa de amostras multirresistentes garante a esses microrganismos uma atenção especial quanto ao seu monitoramento no ambiente hospitalar, pela possibilidade de transmissão desses genes inter e intra-espécies.

A grande diversidade de mecanismos de resistência e de perfis de virulência associados aos diferentes padrões encontrados com a técnica de PFGE sugere a ampla dispersão desses determinantes genéticos por amostras de origens clonais distintas, o que pode vir a ser um reflexo de processos contínuos de seleção, resultantes do extenso uso de antimicrobianos na Instituição avaliada. Esta hipótese pode também ser sustentada pela evidenciação da emergência de amostras de *E. gallinarum* resistentes a níveis elevados de glicopeptídeos e portadores do gene *vanA*.

Como foi possível evidenciar, estes microrganismos podem portar, manter e disseminar amostras resistentes e/ou elementos genéticos codificadores de atributos de resistência e virulência. E como esta veiculação ainda não está bem elucidada, os resultados obtidos neste estudo apontam para a imprescindível necessidade de uma abordagem continuada do problema das infecções nosocomiais, como reflexo de avaliações permanentes associadas aos sistemas de vigilância hospitalar.

REFERÊNCIAS

Aarestrup FM. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: principles and limitations. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2004; 51: 380-388.

Aiello AE, Marshall B, Levy SB, Della-Latta P, Larson E. Relationship between triclosan and susceptibilities of bacteria isolated from hands in the community. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2973-2979.

Albuquerque VS, Silva CMF, Marques EA, Teixeira LM & Merquior VLC. Occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Rio de Janeiro, Brazil: strains showed genetic relationship with a high-level gentamicin resistant (HLGR) endemic clone. *Abstracts of the 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000; Canadá, p.107.

Albuquerque VS, 2000. Tese de Mestrado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), RJ, Brasil.

Ambúr OH, Reynolds PE, Arias CA. D-Ala:D-Ala ligase gene flanking the vanC cluster: evidence for presence of three ligase genes in vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 95-100.

Amyes SG. Enterococci and streptococci. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29 Suppl 3: S43-52.

Antalek MD, Mylotte JM, Lesse AJ, Sellick JAJr. Clinical and molecular epidemiology of *Enterococcus faecalis* bacteremia, with special reference to strains with high-level resistance to gentamicin. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 103-109.

Archimbaud C, Shankar N, Forestier C, Baghdayan A, Gilmore MS, Charbonne F, Joly B. In vitro adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. *Res Microbiol* 2002; 153: 75-80.

Arias CA, Weisner J, Blackburn JM, Reynolds PE. Serine and alanine racemase activities of VanT: a protein necessary for vancomycin resistance in *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Microbiology* 2000; 146: 1727-1734.

Arpin C, Daube H, Tessier F & Quentin C. Presence of *mefA* and *mefE* genes in *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 944-946.

Arthur M & Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1563-1571.

Askarian M, Afkhamzadeh R, Monabbati A, Daxboeck F, Assadian O. Risk factors for rectal colonization with vancomycin-resistant enterococci in Shiraz, Iran. *Int J Infect Dis* 2007; 12: 171-175.

Atkinson BA, Abu-Al-Jaibat A & LeBlanc DJ. Antibiotic Resistance among Enterococci Isolated from Clinical Specimens between 1953 and 1954. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1598-1600.

Bantar CE, Micucci M, Fernández Canigia L, Smayevsky J, Bianchini HM. Synergy characterization for *Enterococcus faecalis* strains displaying moderately high-level gentamicin and streptomycin resistance. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1921-1923.

Barisic Z, Punda-Polic V. Antibiotic resistance among enterococcal strains isolated from clinical specimens. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16: 65-68.

Beall B, Facklam RR, Jackson DM, Starling HH. Rapid screening for penicillin susceptibility of systemic pneumococcal isolates by restriction enzyme profiling of the pbp2B gene. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2359-2362.

Beltrami EM, Singer DA, Fish L, Manning K, Young S, Banerjee SN, Baker R, Jarvis WR. Risk factors for acquisition of vancomycin-resistant enterococci among patients on a renal ward during a community hospital outbreak. *Am J Infect Control* 2000; 28: 282-285.

Bleiweis AS, Zimmerman LN. Properties of proteinase from *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*. *J Bacteriol* 1964; 88: 653-659.

Bonadio WA. Group D streptococcal bacteremia in children. A review of 72 cases in 12 years. *Clin Pediatr (Phila)* 1993; 32: 20-24.

Bonilla HF, Zervos MA, Lyons MJ, Bradley SF, Hedderwick SA, Ramsey MA, Paul LK, Kauffman CA. Colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: comparison of a long-term-care unit with an acute-care hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18: 333-339.

Bonten MJM, Willems R & Weinstein RA. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet* 2001; 1: 314-325.

Bourgogne A, Hilsenbeck SG, Dunny GM, Murray BE. Comparison of OG1RF and an isogenic fsrB deletion mutant by transcriptional analysis: the Fsr system of *Enterococcus faecalis* is more than the activator of gelatinase and serine protease. *J Bacteriol* 2006; 188: 2875-2884.

Burleson BS, Ritchie DJ, Micek ST, Dunne WM. *Enterococcus faecalis* resistant to linezolid: case series and review of the literature. *Pharmacotherapy* 2004; 24: 1225-1231.

Butaye P, Devriese LA & Haesebrouck F. Differences in antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from farm and pet animals. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1374-1378.

Callegan MC, Engelbert M, Parke DW 2nd, Jett BD, Gilmore MS. Bacterial endophthalmitis: epidemiology, therapeutics, and bacterium-host interactions. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 111-124.

Camargo IL, Dalla Costa LM, Woodford N, Gilmore MS, Darini AL. Sequence analysis of *Enterococcus faecium* strain 10/96A (VanD4), the original vancomycin-resistant *E. faecium* strain in Brazil. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2635-2637.

Cappelli EA. 1999. Tese de Mestrado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), RJ, Brasil.

Carias LL, Rudin SD, Donskey CJ, Rice LB. Genetic linkage and cotransfer of a novel, vanB-containing transposon (Tn5382) and a low-affinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolate. *J Bacteriol* 1998; 180: 4426-4434.

Carvalho MGS. 1998. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), RJ, Brasil.

Carvalho M da G, Shewmaker PL, Steigerwalt AG, Morey RE, Sampson AJ, Joyce K, Barrett TJ, Teixeira LM, Facklam RR. *Enterococcus caccae* sp. nov., isolated from human stools. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; 56: 1505-1508.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. *NNIS*, 1999.

Chenoweth C & Schaberg D. The epidemiology of enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9: 80-89.

Chirurgi VA, Oster SE, Goldberg AA, McCabe RE. Nosocomial acquisition of beta-lactamase--negative, ampicillin-resistant *Enterococcus*. *Arch Intern Med* 1992; 152: 1457-1461.

Chopra I & Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001; 65: 232-260.

Chow JW, Zervos MJ, Lerner SA, Thal LA, Donabedian SM, Jaworski DD *et al.* A novel gentamicin resistance gene in *Enterococcus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 511-514.

Clancy J, Dib-Hajj F, Petitpas JW, Yuan W. Cloning and characterization of a novel macrolide efflux gene, mreA, from *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2719-2723.

Clark NC, Cooksey RC, Hill BC, Swenson JM, Tenover FC. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2311-2317.

Clewell DB. Properties of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1, a member of a widely disseminated family of pheromone-responding, conjugative, virulence elements encoding cytolysin. *Plasmid* 2007; 58: 205-227.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005; M7-A6, vol. 23, N^{o} 2, Wayne, PA, EUA.

Coburn PS, Hancock LE, Booth MC, Gilmore MS. A novel means of self-protection, unrelated to toxin activation, confers immunity to the bactericidal effects of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Infect Immun* 1999; 67: 3339-3347.

Coque TM, Patterson JE, Steckelbelrg JM & Murray BE. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and others infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *J Infect Dis* 1995; 171: 1223-1229.

Coque TM, Willems RJ, Fortún J, Top J, Diz S, Loza E *et al*. Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish university hospital: setting the scene

for a future increase in vancomycin resistance? *Antimicrob Agent Chemother* 2005; 49: 2693-2700.

Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* 2006; 42 Suppl 1: S25-34.

Creti R, Imperi M, Bertuccini L, Fabretti F, Orefici G, Di Rosa R, Baldassarri L. Survey for virulence determinants among Enterococcus faecalis isolated from different sources. *J Med Microbiol* 2004; 53: 13-20.

d'Azevedo PA, Dias CA, Goncalves AL, Rowe F, Teixeira LM. Evaluation of an automated system for the identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 40: 157-161.

Dahl KH, Simonsen GS, Olsvik O, Sundsfjord A. Heterogeneity in the vanB gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother* 1999; 43: 1105-1110.

Dalla Costa LM, Souza DC, Martins LTF *et al*. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: First Case in Brazil. *J Infect Dis* 1998; 2:160-163.

De Graef EM, Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M, Collins MD, Lefebvre K, Swings J, Haesebrouck F. Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcinus* as a junior synonym of *Enterococcus villorum*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53: 1069-1074.

del Campo R, Ruiz-Garbajosa P, Sánchez-Moreno MP, Baquero F, Torres C, Cantón R, Coque TM. Antimicrobial resistance in recent fecal enterococci from healthy volunteers and food handlers in Spain: genes and phenotypes. *Microb Drug Resist* 2003; 9: 47-60.

Dennesen PJ, Bonten MJ, Weinstein RA. Multiresistant bacteria as a hospital epidemic problem. *Ann Med* 1998; 30: 176-185.

Di Rosa R, Creti R, Venditti M, D'Amelio R, Arciola CR, Montanaro L, Baldassarri L. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 256: 145-150.

Dobson SR, Baker CJ. Enterococcal sepsis in neonates: features by age at onset and occurrence of focal infection. *Pediatrics* 1990; 85: 165-171.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 167-193.

Donabedian SM, Thal LA, Hershberger E, Perri MB, Chow JW, Barlett P *et al*. Molecular characterization of gentamicin-resistant Enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1109-1113.

Dudley JP, Sercarz J. *Enterococcus faecalis* and otitis media with effusion. How to treat. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1990; 20: 123-126.

Dupont JM, Lebbar A, Dupuy O, Frydman N, Letessier D, Auvinet P, Rabineau D. Polymerase Chain reaction generated probes for fluorescence in situ hybridization. *Morphologie* 1998; 82: 21-24.

Duprè I, Zanetti S, Schito AM, Fadda G, Sechi LA. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J Med Microbiol* 2003; 52: 491-498.

Dutta I & Reynolds PE. Biochemical and genetic characterization of the vanC-2 vancomycin resistance gene cluster of *Enterococcus casseliflavus* ATCC 25788. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3125-3132.

Eaton TJ & Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environm Microbiol* 2001; 67:1628-1635.

Edwards DD. Enterococci attract attention of concerned microbiologist. *ASM News* 2000; 66: 540-545.

Ennahar S, Cai Y. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Enterococcus solitarius* Collins et al. 1989 to the genus *Tetragenococcus* as *Tetragenococcus solitarius* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*.2005; 55: 589-592.

Facklam RR. Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. *Appl Microbiol* 1972; 23: 1131-1139.

Facklam RR, Sahm DF & Teixeira LM. *Enterococcus*. In: Murray BE, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC & Yolken RH. (eds.) Manual of Clinical Microbiology. 7thed. *American Society for Microbiology Press*. Washington DC, EUA, 1999. pp. 297-305.

Fath MJ & Kolter R. ABC transporters: Bacterial exporters. *Microbiol Rev* 1993; 57: 995-1017.

Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahm DF, Courvalin P. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2161-2164.

Fontana R, Amalfitano G, Rossi L, Satta G. Mechanisms of resistance to growth inhibition and killing by beta-lactam antibiotics in enterococci. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 486-489.

Fortina MG, Ricci G, Borgo F, Manachini PL. Rapid identification of *Enterococcus italicus* by PCR with primers targeted to 16S rRNA gene. *Lett Appl Microbiol* 2007; 44: 443-446.

Franz CMAP, Holzapfel WH & Stiles ME. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int J Food Microbiol* 1999; 47: 1-24.

Franz CM, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. Enterococci in foods - a conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol* 2003; 88: 105-122.

Gambarotto K, Ploy MC, Dupron F, Giangiobbe M, Denis F. Occurrence of vancomycin-resistant enterococci in pork and poultry products from a cattle-rearing area of France. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2354-2355.

Garnier F, Taourit S, Glaser P, Courvalin P, Galimand M. Characterization of transposon Tn1549, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus* spp. *Microbiology* 2000; 146: 1481-1489.

Gentry-Weeks CR, Karkhoff-Schweizer R, Pikis A, Estay M, Keith JM. Survival of *Enterococcus faecalis* in mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* 1999; 67: 2160-2165.

Gilmore MS, Segarra RA, Booth MC, Bogie CP, Hall LR & Clewell DB. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolitic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J Bacteriol* 1994; 176: 7335-7344.

Gilmore MS. The molecular basis of antibiotic resistance: where Newton meets Darwin. *Int J Med Microbiol* 2002; 292: 65.

Goldmann DA, Huskins WC. Control of nosocomial antimicrobial-resistant bacteria: a strategic priority for hospitals worldwide. *Clin Infect Dis* 1997; 24 Suppl 1: S139-145.

Gonzales RD, Schreckenberger PC, Graham MB, Kelkar S, Den Bensten K, Quinn JP. Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet* 2001; 357:1179.

Goossens H. European status of resistance in nosocomial infections. *Chemotherapy* 2005; 51: 177-181.

Gordon S, Swenson JM, Hil BC *et al.* Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2373-2378.

Gordts B, Van Landuyt H, Ieven M, Vandamme P & Gossens H. Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tracts os hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2842-2846.

Granato PA, Jackson RW. Bicomponent nature of lysin from *Streptococcus zymogenes*. *J Bacteriol* 1969; 100: 865–868.

Graninger W & Ragette R. Nosocomial bacteremia due to *Enterococcus faecalis* without endocarditis. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 49-57.

Gray JW, Stewart D & Pedlar SJ. Fecal carriage of antibiotic-resistant enterococci in hospitalized and non-hospitalized individuals. *J Antimicrob Chemother* 1992; 30: 110-112.

Haas W, Shepard BD, Gilmore MS. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature* 2002; 415: 84-87.

Hall LMC, Duke B, Urwin G & Guiney, M. Epidemiology of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection in a teaching hospital in London, United Kingdom. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1953-1957.

Handwerger S, Raucher B, Altarac D *et al*. Nosocomial outbreak due to *Enterococcus faecium* highly resistant to vancomycin, penicillin, and gentamicin. *Cli Infect Dis* 1993; 16: 750-755.

Hanrahan J, Hoyen C, Rice LB. Geographic distribution of a large mobile element that transfers ampicillin and vancomycin resistance between *Enterococcus faecium* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1349-1351.

Harrington SM, Ross TL, Gebo KA, Merz WG. Vancomycin resistance, esp, and strain relatedness: a 1-year study of enterococcal bacteremia. J *Clin Microbiol* 2004; 42: 5895-5898.

Hartwell H, Edwards JS. A preliminary assessment of two hospital food service systems using parameters of food safety and consumer opinion. *J R Soc Health* 2001; 121: 236-242.

Hayden MK. Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 1058-1065.

HICPAC; Healthcare infection control practices advisory committee. Centers for Disease Control and Prevention, 2003. Atlanta, GA, EUA.

Hirt H, Schlievert PM, Dunny GM. In vivo induction of virulence and antibiotic resistance transfer in *Enterococcus faecalis* mediated by the sex pheromone-sensing system of pCF10. *Infect Immun* 2002; 70: 716-723.

Hughes JM, Tenover FC. Approaches to limiting emergence of antimicrobial resistance in bacteria in human populations. *Clin Infect Dis* 1997; 24 Suppl 1: S131-135.

Huycke MM, Spiegel CA, & Gilmore MS. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents Chemother* 1991; 35: 1626-1634.

Huys G, D'Haene K, Collard JM, Swings J. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 1555-1562.

Ieven M, Vercauteren E, Descheemaeker P, van Laer F, Goossens H. Comparison of direct plating and broth enrichment culture for the detection of intestinal colonization by glycopeptide-resistant enterococci among hospitalized patients. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 1436-1440.

Ike Y; Hashimoto H & Clewell DB. Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies zymogenes contributes to virulence in mice. *Infect Immunity* 1984; 45: 528-530.

Ike Y; Hashimoto H & Clewell DB. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus* (*Streptococcus*) *faecalis* strains associated with human parenteral infections. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1524-1528.

Isenmann R, Schwarz M, Rozdzinski E, Marre R, Beger HG. Aggregation substance promotes colonic mucosal invasion of *Enterococcus faecalis* in an ex vivo model. *J Surg Res* 2000; 89: 132-138.

Jarvis WR & Martone WJ. Predominant pathogens in hospital infections. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29 Suppl A: 19-24.

Jensen LB, Frimodt-Moller N, Aarestrup FM. Presence of erm gene classes in gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 170: 151-158.

Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 462-478.

Johnsen PJ, Osterhus JI, Sletvold H, Sorum M, Kruse H, Nielsen K, Simonsen GS, Sundsfjord A. Persistence of animal and human glycopeptide-resistant enterococci on two Norwegian poultry farms formerly exposed to avoparcin is associated with a widespread plasmid-mediated vanA element within a polyclonal *Enterococcus faecium* population. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 159-168.

Jureen R, Top J, Mohn SC, Harthug S, Langeland N, Willems RJ. Molecular characterization of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from hospitalized patients in Norway. *J Clin Microbiol* 2003; 41:2330-2336.

Jurkovic D, Krizková L, Sojka M, Belicová A, Dusinský R, Krajcovic J, Snauwaert C, Naser S, Vandamme P, Vancanneyt M. Molecular identification and diversity of enterococci isolated from Slovak Bryndza cheese. *J Gen Appl Microbiol* 2006; 52: 329-337.

Kayser FH. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int J Food Microbiol* 2003; 88: 255-262

Kanemitsu K, Nishino T, Kunishima H, Okamura N, Takemura H, Yamamoto H, Kaku M. Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. *J Microbiol Methods* 2001; 47: 11-16.

Kao SJ, Clewell DB, Donabedian SM, Zervos MJ, Petrin J, Shaw KJ, Chow JW. Detection of the high-level aminoglycoside resistance gene aph(2")-Ib in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2876-2879.

Kawalec M, Gniadkowski M, Zaleska M *et al*. 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: 1781-1787.

Ke D, Picard FJ, Martineau F, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3497-3503.

Klare I, Konstabel C, Badstübner D, Werner G, Witte W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol* 2003; 88: 269-290.

Klare I, Konstabel C, Mueller-Bertling S, Werner G, Strommenger B, Kettlitz C, Borgmann S, Schulte B, Jonas D, Serr A, Fahr AM, Eigner U, Witte W. Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes esp and hyl in German hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 815-825.

Klein G, Pack A & Reuter G. Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 1825-1830.

Knudston LM & Hartman PA. Antibiotic resistance among enterococci isolates from environmental and clinical sources. *J Food Protect* 1993; 56: 489-492.

Kobayashi R. Studies concerning hemolytic streptococci: typing of human hemolytic streptococci and their relation to diseases and their distribution on mucous membranes. *Arch Exp Med* 1940; 17: 218–241.

Koorevaar CT, Scherpenzeel PG, Neijens HJ, Derksen-Lubsen G, Dzoljic-Danilovic G, de Groot R. Childhood meningitis caused by enterococci and viridans streptococci. *Infection* 1992; 20: 118-121.

Kristich CJ, Li YH, Cvitkovitch DG, Dunny GM. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 2004; 186: 154-63.

Krupova Y, Novotny J, Sabo A, Mateicka F, Krcmery V Jr. Aetiology, cost of antimicrobial therapy and outcome in neutropenic patients who developed bacteraemia during antimicrobial prophylaxis: a case-control study. *Int J Antimicrob Agents* 1998;10: 313-316.

Lazazzera BA. The intracellular function of extracellular signaling peptides. *Peptides* 2001; 22: 1519-1527.

Leavis HL, Willems RJ, Top J, Spalburg E, Mascini EM, Fluit AC *et al*. Epidemic and nonepidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1108-1113.

Leavis HL, Willems RJ, Mascini EM, Vandenbroucke-Grauls CM, Bonten MJ. Vancomycin resistant enterococci in the Netherlands. *Ned Tijdschr Geneeskd* 2004; 148: 878-882.

LeClercq R. Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin Infect Dis* 1997; 24:80S-84S.

LeClercq R, Derlot E, Duval J & Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med* 1988; 319: 157-161.

Lemoine L & Hunter PR. Enterococcal urinary tract infections in a teaching hospital. *Eur J Clin Microbiol* 1987; 6: 574-575.

Lester CH, Frimodt-Moller N, Hammerum AM. Conjugal transfer of aminoglycoside and macrolide resistance between *Enterococcus faecium* isolates in the intestine of streptomycin-treated mice. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 235: 385-391.

Libertin CR, Dumitru R & Stein DS. The hemolysin/bacteriocin produced by enterococci is a marker of pathogenicity. *Diag Microbiol Infect Dis* 1992; 15: 115-120.

Levison ME. Pharmacodynamics of antibacterial drugs. *Infect Dis Clin North Am* 2000; 14: 281-291.

Livornese LL, Dias S, Samel C *et al*. Hospital-adquired infection with vancomycin resistant *Enterococcus faecium* transmited by eletronic thermometers. *Ann Intern Med* 1992; 117: 112-116.

Lopes MF, Ribeiro T, Martins MP, Tenreiro R, Crespo MT. Gentamycin resistance in dairy and clinical enterococcal isolates and in reference strains. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 214-219.

Lopes MF, Simoes AP, Tenreiro R, Marques JJ & Crespo MT. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *Int J Food Microbiol* 2006; 112: 208-214.

Lopardo H, Casimir L, Hernandez C & Rubeglio EA. Isolation of three strains of □-lactamase-producing *Enterococcus faecalis* in Argentina. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9: 402-405.

Lowe AM, Lambert PA, Smith AW. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect Immun* 1995; 63: 703–706.

Lu JJ, Wu JC, Chiueh TS, Perng CL, Chi WM, Lee WH. Characterization of a highly glycopeptide-resistant *Enterococcus gallinarum* isolate. *J Formos Med Assoc* 2000; 99: 305-310.

Luginbuhl LM, Rotbart HA, Facklam RR, Roe MH, Elliot JA. Neonatal enterococcal sepsis: case-control study and description of an outbreak. *Pediatr Infect Dis J* 1987; 6: 1022-1026.

Luna VA, Coates P, Eady EA, Cove JH, Nguyen TT, Roberts MC. A variety of gram-positive bacteria carry mobile mef genes. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 19-25.

Lynch C, Courvalin P, Nikaido H. Active efflux of antimicrobial agents in wild-type strains of enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 869-871.

Ma X, Kudo M, Takahashi A, Tanimoto K, Ike Y. Evidence of nosocomial infection in Japan caused by high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and identification of the pheromone-responsive conjugative plasmid encoding gentamicin resistance. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2460-2464.

Maki DG, Agger WA. Enterococcal bacteremia: clinical features, the risk of endocarditis, and management. *Medicine (Baltimore)* 1988; 67: 248-269.

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: 258-264.

Mannu L, Paba A, Daga E, Comunian R, Zanetti S, Duprè I, Sechi LA. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int J Food Microbiol* 2003; 88: 291-304.

Martel A, Devriese LA., Decostere A & Haesebrouck F. Presence of macrolide resistance genes in streptococci and enterococci isolated from pigs and pork carcasses. *Int J Food Microbiol* 2002; 2609: 1-6.

Mascini EM, Bonten MJ. Vancomycin-resistant enterococci: consequences for therapy and infection control. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11 Suppl 4: 43-56.

McBride SM, Fischetti VA, LeBlanc DJ, Moellering RC, Gilmore MS. Genetic Diversity among *Enterococcus faecalis*. *Plos One* 2007; 7: 1-22.

McGowan LL, Jackson CR, Barrett JB, Hiott LM, Fedorka-Cray PJ. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail fruits, vegetables, and meats. *J Food Prot* 2006; 69: 2976-2982.

McKessar SJ, Berry AM, Bell JM, Turnidge JD, Paton JC. Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3224-3228.

Mederski-Samoraj BD, Murray BE. High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of enterococci. *J Infect Dis* 1983; 147: 751-757.

Megran DW. Enterococcal endocarditis. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 63-71.

Mendonça CRV. 1998. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), RJ, Brasil.

Merquior VLC, Netz DJA, Camello TC, Teixeira LM. Characterization of enterococci isolated from nosocomial and community infections in Brazil. *Adv Exp Med Biol* 1997; 418: 281-283.

Merquior, VLC, Peralta, JM, Fackland RR, Teixeira LM. Analysis of Electrophoretic whole-cell protein profiles as a tool for characterization of *Enterococcus* species. *Curr. Microbiol* 1994; 28: 149-153.

Miyazaki S, Fujikawa T, Kobayashi I, Matsumoto T, Tateda K, Yamaguchi K. The in vitro and in vivo antibacterial characterization of vancomycin and linezolid against vancomycin-susceptible and resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 971-974.

Miyazaki S, Ohno A, Kobayashi I, Uji T, Yamaguchi K, Goto S. Cytotoxic effect of hemolytic culture supernatant from *Enterococcus faecalis* on mouse polymorphonuclear neutrophils and macrophages. *Microbiol Immunol* 1993; 37: 265–270.

Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F & Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 2004; 72: 3658-3663.

Mondino SS, Castro AC, Mondino PJ, Carvalho M da G, Silva KM, Teixeira LM. Phenotypic and genotypic characterization of clinical and intestinal enterococci isolated from inpatients and outpatients in two Brazilian hospitals. *Microb Drug Resist* 2003; 9: 167-174.

Monge R, Arias ML, Utzinger D & Antillon F. Calidad sanitaria de algunos alimentos distribuidos en servicios de alimentación hospitalarios de Costa Rica. *Arch Latinoam Nutr* 1994; 44: 164-167.

Monstein HJ, Quednau M, Samuelsson A, Ahrné S, Isaksson B, Jonasson J. Division of the genus *Enterococcus* into species groups using PCR-based molecular typing methods. *Microbiology* 1998; 144: 1171-1179.

Montecalvo MA, Jarvis WR, Uman J, Shay DK, Petrullo C, Rodney K, Gedris C, Horowitz HW, Wormser GP. Infection-control measures reduce transmission of vancomycin-resistant enterococci in an endemic setting. *Ann Intern Med* 1999; 131: 269-272.

Morrison D, Woodford N & Cookson B. Enterococci as emerging pathogens of humans. *J Appl Microbiol* 1997; 83: 89-99.

Morrison AJ Jr, Wenzel RP. Nosocomial urinary tract infections due to *Enterococcus*. Ten years experience at a university hospital. *Arch Intern Med* 1986; 146: 1549-1551.

Mundy LM, Sahm DF & Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 513-522.

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

Murray BE. New aspects of antimicrobial resistance and the resulting therapeutic dilemmas. *J Infect Dis* 1991; 163: 1185-1194.

Murray BE. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 37-47.

Murray BE. Problems and perils of vancomycin resistant enterococci. *Braz J Infect Dis* 2000; 4: 9-14.

Nakanishi N, Yoshida S, Wakebe H, Inoue M & Mitsuhashi S. Mechanisms of clinical resistance to fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1053-1059.

Nakayama J, Cao Y, Horii T, Sakuda S, Akkermans AD, de Vos WM, Nagasawa H. Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol* 2001; 41:145-154.

Nakayama J, Kariyama R, Kumon H. Description of a 23.9-kilobase chromosomal deletion containing a region encoding fsr genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in urine. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 3152-3155.

Nallapareddy SR, Weinstock GM, Murray BE. Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. *Mol Microbiol* 2003; 47: 1733-1747.

Naser S, Thompson FL, Hoste B, Gevers D, Vandemeulebroecke K, Cleenwerck I, Thompson CC, Vancanneyt M, Swings J. Phylogeny and identification of enterococci by *atpA* gene sequence analysis. *J Clinical Microbiol* 2005; 43: 2224–2230.

Naser SM, Vancanneyt M, Hoste B, Snauwaert C, Vandemeulebroecke K, Swings J. Reclassification of *Enterococcus flavescens* as a later synonym of *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus saccharominimus* as a later synonym of *Enterococcus italicus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; 56: 413-416.

Nauschuetz WF, Trevino SB, Harrison LS, Longfield RN, Fletcher L, Wortham WG. *Enterococcus casseliflavus* as an agent of nosocomial bloodstream infections. *Med Microbiol Lett* 1993; 2: 102-108.

Netz DJA. Tese de Mestrado. 1998. Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), RJ, Brasil.

Neves FPG. Tese de Mestrado. 2005. Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), RJ, Brasil.

Nichols RL, Muzik AC. Enterococcal infections in surgical patients: the mystery continues. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 72-76.

Noskin GA, Stosor V, Cooper I & Peterson LK. Recovery of vancomycin-resistance enterococci of fingertips and encironmental surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16: 577-581.

Novais C, Sousa JC, Coque TM, Peixe LV. In vitro activity of daptomycin against enterococci from nosocomial and community environments in Portugal. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 964-966.

Novais C, Vital C, Ribeiro G, Coque TM, Peixe LV. First characterization of vancomycin-resistant enterococci from a Portuguese hospital. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 215-224.

Ogier JC & Serror P. The *Enterococcus* genus. *Int J Food Microbiol* 2007; 22.

Panesso D, Abadia-Patino L, Vanegas N, Reynolds PE, Courvalin P, Arias CA. Transcriptional analysis of the vanC cluster from *Enterococcus gallinarum* strains with constitutive and inducible vancomycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1060-1066.

Pascual J, Sureda A, Lopez-San Roman A, Barcena R, De Rafael L, Hernandez-Cabrero J, Boixeda D. Spontaneous peritonitis caused by *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1484-1486.

Patel R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Steckelberg JM, Kline B, Cockerill FR. DNA sequence variation within vanA, vanB, vanC-1, and vanC-2/3 genes of clinical *Enterococcus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 202-205.

Patterson JE, Sweeney AH, Simms M, Carley N, Mangi R, Sabetta J, Lyons RW. An analysis of 110 serious enterococcal infections. Epidemiology, antibiotic susceptibility, and outcome. *Medicine (Baltimore)* 1995; 74: 191-200.

Patton WN, Bienz N, Franklin IM, Hastings JG. Enterococcal meningitis in an HIV positive haemophilic patient. *J Clin Pathol* 1991; 44: 608-609.

Paula GR. 2000. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), RJ, Brasil.

Pavia M, Nobile CG, Salpietro L & Angelillo IF. Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. *J Food Prot* 2000; 63: 912-915.

Perichon B, Reynolds P & Courvalin P. VanD type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2016-2018.

Perl TM, The threat of vancomycin resistance. *Am J Med* 1999; 106: 26S-37S.

Piekarska K, Lawrynowicz-Paciorek M, Magdziak A, Bareja E, Rudecka A, Wyrebiak A, Pietrzyk M, Kochman M. Drug sensitivity of *Enterococcus* sp. strains isolated from clinical material or from healthy persons. *Med Dosw Mikrobiol* 2002; 54: 305-315.

Pillar CM, Gilmore MS. Enterococcal virulence-pathogenicity island of *E. faecalis*. *Front Biosci* 2004; 9: 2335-2346.

Plessis P, Lamy T, Donnio PY *et al*. Epidemiologic analysis of glycopeptide-resistant Enterococcus strains in neutropenic patients receiving prolonged vancomycin administration. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 959-963.

Poeta P, Costa D, Klibi N, Rodrigues J, Torres C. Phenotypic and genotypic study of gelatinase and beta-haemolysis activities in faecal enterococci of poultry in Portugal. *J Vet Med* 2006; 53: 203-208.

Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martinez JL, Torres C. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 967-971.

Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. Effects of *Enterococcus faecalis* fsr genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect Immun* 2000; 68: 2579-2586.

Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. Characterization of fsr, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J Bacteriol* 2001; 183: 3372-3382.

Qu TT, Chen YG, Yu YS, Wei ZQ, Zhou ZH, Li LJ. Genotypic diversity and epidemiology of high-level gentamicin resistant *Enterococcus* in a Chinese hospital. *J Infect* 2005; 40: 1-7.

Qu TT, Chen YG, Yu YS, Wei ZQ, Zhou ZH, Li LJ. Genotypic diversity and epidemiology of high-level gentamicin resistant *Enterococcus* in a Chinese hospital. *J Infect* 2006; 52: 124-130.

Quintiliani R & Courvalin P. Characterization of Tn1547, a composite transposon flanked by the IS16 and IS256-like elements, that confers vancomycin resistance in *Enterococcus faecalis* BM4281. *Gene* 1996; 172: 1-8.

Ramadhan AA & Hegedus E. Biofilm formation and *esp* gene carriage in enterococci. *J Clin Pathol* 2005; 58: 685-6.

Rego JC, Pires EF & Medina GP. O treinamento como melhoria da qualidade higiênica, em unidade de alimentação e nutrição hospitalar. *Hig Alimen* 1999; 13: 81-87.

Reynolds PE, Snaith HA, Maguire AJ, Dutka-Malen S, Courvalin P. Analysis of peptidoglycan precursors in vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Biochem J* 1994; 301: 5-8.

Rhinehart E, Smith NE, Wennersten C *et al*. Rapid dissemination of β-lactamase-producing aminoglycosides-resistant *Enterococcus faecalis* among pacients and staff on an infant-toddler surgical ward. *N Engl J Med* 1990; 323: 1814-1818.

Ribas RM, Darini AL, Moreira TA, Freitas C, Gontijo Filho PP. Vancomycin-resistant VanA phenotype *Enterococcus faecalis*: first case in Minas Gerais state and epidemiological considerations. *Braz J Infect Dis* 2007; 11: 439-440.

Rice LB. Emergence of vancomycin-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 183-187.

Roberts JC, Singh KV, Okhuysen PC, Murray BE. Molecular epidemiology of the fsr locus and of gelatinase production among different subsets of *Enterococcus faecalis* isolates. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2317-2320.

Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J & Seppala H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2823-2830.

Robredo B, Torres C, Singh KV, Murray BE. Molecular analysis of Tn1546 in vanA-containing *Enterococcus* spp. isolated from humans and poultry. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2588.

Rozdzinski E, Marre R, Susa M, Wirth R, Muscholl-Silberhorn A. Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. *Microb Pathog* 2001; 30: 211-220.

Rybkine T, Mainardi JL, Sougakoff W, Collatz E, Gutmann L. Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of beta-lactam resistance. *J Infect Dis* 1998; 178: 159-163.

Sader HS, Watters AA, Fritsche TR, Jones RN. Daptomycin antimicrobial activity tested against methicillin-resistant staphylococci and vancomycin-resistant enterococci isolated in European medical centers (2005). *BMC Infect Dis* 2007; 7: 29.

Sandoe JA, Witherden IR, Cove JH, Heritage J, Wilcox MH. Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medical-device-related infection potential in vivo. *J Med Microbiol* 2003; 52: 547-50.

Santos BHC, Souza EL, Oddi IC, Presenta de *Enterococcus* sp. em alimento enteral e perfil de resistência a antimicrobianos. Revista Brasileira de Análises Clínicas 2004; 36: 47-49.

Schooneveldt JM, Marriott RK, Nimmo GR. Detection of a vanB determinant in *Enterococcus gallinarum* in Australia. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3902.

Seno Y, Kariyama R, Mitsuhata R, Monden K & Kumon H. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta Med Okayama* 2005; 59: 79-87.

Sepúlveda AM, Bello TH, Domínguez YM, Mella MS, Zemelman ZR, González RG. Molecular identification of aminoglycoside-modifying enzymes among strains of *Enterococcus* spp. isolated in hospitals of the VIII Region of Chile. *Rev Med Chil* 2007; 135: 566-572.

Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 1999; 67: 193-200.

Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore MS. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* 2002; 417: 746-50.

Shlaes DM, Levy J, Wolinsky E. Enterococcal bacteremia without endocarditis. *Arch Intern Med* 1981; 141: 578-81.

Sifri CD, Mylonakis E, Singh KV, Qin X, Garsin DA, Murray BE *et al*. Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus fsr in *Caenorhabditis elegans* and mice. *Infect Immun* 2002; 70: 5647-5650.

Simonsen GS, Smabrekke L, Monnet DL, Sorensen TL, Moller JK, Kristinsson KG *et al*. Prevalence of resistance to ampicillin, gentamicin and vancomycin in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from clinical specimens and use of antimicrobials in five Nordic hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 323-331.

Smith DW Decreased antimicrobial resistance after changes in antibiotic use. *Pharmacotherapy* 1999; 19 (8 Pt 2): 129S-132S.

Soltani M, Beighton D, Philpott-Howard J, Woodford N. Mechanisms of resistance to quinupristin-dalfopristin among isolates of *Enterococcus faecium* from animals, raw meat, and hospital patients in Western Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 433-436.

Sorensen TL, Blom M, Monnet DL, Frimodt-Moller N, Poulsen RL & Espersen F. Transient intestinal carriage after ingestion of antibiotic resistant *Enterococcus faecium* from chicken and pork. *N Engl J Med* 2001; 345: 1161-1166.

Stern CS, Carvalho MGS, Teixeira LM. Characterization of enterococci isolated from human and nonhuman sources in Brazil. *Diag Microbiol Infect Dis* 1994; 20: 61-67.

Sukontasing S, Tanasupawat S, Moonmangmee S, Lee JS, Suzuki K. *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007; 57: 2151-2154.

Suntharam N, Lankford MG, Trick WE, Peterson LR, Noskin GA. Risk factors for acquisition of vancomycin-resistant enterococci among hematology-oncology patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 43: 183-188.

Sussmuth SD, Muscholl-Silberhorn A, Wirth R, Susa M, Marre R, Rozdzinski E. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infect Immun* 2000; 68: 4900-4906.

Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kanradt A & Wondrack L. Detection of erythromycin-resistance determinantes by PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2562-2565.

Svec P, Vancanneyt M, Sedlácek I, Naser SM, Snauwaert C, Lefebvre K, Hoste B, Swings J. *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; 56: 577-581.

Svec P, Devriese LA, Sedlácek I, Baele M, Vancanneyt M, Haesebrouck F, Swings J, Doskar J. *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 1567-1574.

Swenson JM, Ferraro MJ, Sahn DF *et al.* Multilaboratory evaluation of screening methods for detection of high-level aminoglycoside resisntace in enterococci. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3008-3018.

Teixeira LM, Carvalho MG, Espinola MM, Steigerwalt AG, Douglas MP, Brenner DJ, Facklam RR. *Enterococcus porcinus* sp. nov. and *Enterococcus ratti* sp. nov., associated with enteric disorders in animals. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 1737-1743.

Teixeira LM, Carvalho MG, Facklam RR. *Enterococcus*. *In*: Murray BE, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH (eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed. ASMPress. Washington DC, EUA, 2007; p. 430-442.

Teixeira LM & Facklam RR. *Enterococcus*. *In*: Murray BE, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH (eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. ASMPress. Washington DC, EUA, 2003; p. 422-433.

Teixeira LM, Facklam RR, Steigerwalt AG, Pigott NE, Merquior VL, Brenner DJ. Correlation between phenotypic characteristics and DNA relatedness within *Enterococcus faecium* strains. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1520-1523.

Teixeira LM, Merquior VL, Vianni MC, Carvalho MG, Fracalanzza SE, Steigerwalt AG, Brenner DJ, Facklam RR. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46: 664-668.

Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 2004; 72: 6032-6039.

Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 2622-2636.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-2239.

Tenover FC, McDonald LC. Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. *Curr Opin Infect Dis* 2005; 18: 300-305.

Teuber M, Meile L & Schwarz F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1999; 76: 115-137.

Todd EW. A comparative serological study of estreptolysins derived from human and from animal infections, with notes on pneumococcal haemolysin, tetanolysin and *Staphylococcus* toxin. *J Pathol Bacteriol* 1934; 39: 299–321.

Togneri A, Lopardo H, Corso A. Bacteremia caused by *Enterococcus gallinarum* with a high level of glycopeptide resistance: 1st documented cases in Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2003; 35: 96-99.

Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M *et al*. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 4538-4545.

Toye B, Shymanski J, Bobrowska M, Woods W, Ramotar K. Clinical and epidemiological significance of enterococci intrinsically resistant to vancomycin (possessing the vanC genotype). *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3166-3170.

Tsai SF, Zervos MJ, Clewell DB, Donabedian SM, Sahm DF, Chow JW. A new high-level gentamicin resistance gene, aph(2")-Id, in *Enterococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1229-1232.

Turtura GC & Lorenzelli P. Gram-positive cocci isolated from slaughtered poultry. *Microbiol Res* 1994; 149: 203-213.

Uchio E, Inamura M, Okada K, Hatano H, Saeki K, Ohno S. A case of endogenous *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Jpn J Ophthalmol* 1992; 36: 215-221.

Vancanneyt M, Lombardi A, Andrighetto C, Knijff E, Torriani S, Bjorkroth KJ, et al. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 1381-91.

Vandamme P, Vercauteren E, Lammens C, Pensart N, Ieven M, Pot B, *et al*. Survey of enterococcal susceptibility patterns in Belgium. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2572-2576.

Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, Jabes D, Goossens H. Development of a multiplex PCR for the detection of asa1, gelE, cylA, esp, and hyl genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4473-4479.

Watanakunakorn C. Rapid increase in the prevalence of high-level aminoglycoside resistance among enterococci isolated from blood cultures during 1989-1991. *J Antimicrob Chemother* 1992; 30: 289-293.

Weinbren MJ, Johnson AP, Woodford N. Defining high-level gentamicin resistance in enterococci. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 404-405.

Whiteside M, Moore J, Ratzan K. An investigation of enterococcal bacteremia. *Am J Infect Control* 1983; 11: 125-129.

Willems RJ, Bonten MJ. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20: 384-90.

Willems RJL, Homan W, Top J, Santen-Verheuvel M, Tribe D, Manzioros X, Gaillard C, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Mascini EM, Kregten E, Embden JDA & Bonten MJ. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *The Lancet* 2001; 357: 853-855.

Wirth R. Sex pheromones and gene transfer in *Enterococcus faecalis*. *Res Microbiol* 2000; 151: 493-496.

Woodford N, Soltani M & Hardy KJ. Frequency of *esp* in *Enterococcus faecium* isolates. *Lancet* 2001; 358: 584.

Zareba TW, Pascu C, Hryniewicz W, Wadstrom T. Binding of extracellular matrix proteins by enterococci. *Curr Microbiol* 1997; 34: 6-11.

Zarrilli R, Tripodi MF, Di Popolo A, Fortunato R, Bagattini M, Crispino M, Florio A, Triassi M, Utili R. Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 827-835.