UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Caracterização molecular de *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina em amostras clínicas, ambientes aquáticos e alimentos

Andrey Guimarães Sacramento

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Caracterização molecular de *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina em amostras clínicas, ambientes aquáticos e alimentos

Andrey Guimarães Sacramento

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka

São Paulo
2015

Andrey Guimarães Sacramento

Caracterização molecular de *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina em amostras clínicas, ambientes aquáticos e alimentos

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka
orientadora/presidenta

Profa. Dra. Marinês Dalla Valle Martino
1o. examinador

Profa. Dra. Doroti de Oliveira Garcia
2o. examinador

Profa. Dra. Carla Taddei de Castro Neves
3o. examinador

Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman
4o. examinador

São Paulo, 11 de setembro de 2015.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Sacramento, Andrey Guimarães
S123c Caracterização molecular de Enterococcus spp. resistentes à vancomicina em amostras clínicas, ambientes aquáticos e alimentos / Andrey Guimarães Sacramento. -- São Paulo, 2015.
112p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Mamizuka, Elsa Masae

1. Análise clínica : Medicina 2. Enterococcus 3. Resistência microbiana às drogas I. T. II. Mamizuka, Elsa Masae, orientador.

616.0756-9 CDD

Agradecimentos

Em especial à minha família Emanuela... Raul... Iraci... e Igor...

À Profa. Elsa Mamizuka pelo voto de confiança e por ceder o espaço para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Nilton Lincopan pelos grandes ensinamentos fundamentais que me foram passados nos últimos meses.

À Dra. Louise Cerdeira por me auxiliar nas análises de bioinformática e por ter me recebido tão bem no Laboratório Fleury e no Centro de Facilidades para Pesquisa (CEFAP-ICB-USP).

À Dra. Rosemeire Zanella por estar sempre à disposição para me esclarecer dúvidas.

A Lara de Ameida, Carlos Pires e Artemir Brito pelo grande apoio e incentivo.

Às alunas Natasha Piola Roberto e Cecília Popazoglo pelo auxílio na execução deste trabalho.

À banca de qualificação e defesa composta pelo Prof. Jorge Sampaio, Dra. Ana Gales, Dra. Marinês Martino, Dra. Doroti Garcia e Dra. Carla Neves pelas sugestões dadas.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e aos funcionários do Programa de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, principalmente, ao Jorge de Lima, Sueli Duarte e Irineu de Oliveira.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro concedido.

RESUMO

SACRAMENTO, A. G. **Caracterização molecular de *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina em amostras clínicas, ambientes aquáticos e alimento**s. 2015. 122f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Enterococos são ubíquos no ambiente e fazem parte da microbiota do trato gastrintestinal de humanos e animais. A importância dessas bactérias tem sido associada com infecções hospitalares e resistência a múltiplas drogas, principalmente à vancomicina. O objetivo do presente estudo foi realizar a caracterização molecular de cepas de *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina (VRE) isoladas a partir de amostras coletadas de pacientes hospitalizados, água superficial de rios urbanos e carne de frango comercializada no Brasil. A presença do gene *vanA* foi confirmada em 20 cepas multirresitentes isoladas durante 1997-2011. Dentre os isolados VRE, 12 cepas foram identificadas como *E. faecium* e oito como *E. faecalis*. Cepas de *E. faecium* isoladas de amostras clínicas e águas foram classificadas como clonalmente relacionadas pelo PFGE, com perfil virulência predominante (acm^+, esp^+). Adicionalmente, enquanto cepas de *E. faecium* isoladas dos rios pertenceram aos ST203, ST412 e ST478 (previamente caracterizados como endêmicos em hospitais brasileiros), novos STs foram identificados entre as cepas de *E. faecalis* (ST614, ST615 e ST616) e *E. faecium* (ST953 e ST954) isoladas de alimentos. Sequências completas do transposon Tn*1546* das cepas clínicas VREfm 320/07 (ST478) e ambiental VREfm 11 (ST412) mostraram Tn*1546-like element* de ~12800 pb, com um ponto de mutação no gene *vanA* na posição 7.698 (substituição do nucleotídeo T pelo C) e uma no gene *vanX* na posição 8.234 (G pelo T). Além disso, uma deleção na extremidade esquerda do Tn*1546*, e as sequências IS*1251* e IS*1216E* na região intergênica *vanHS* e *vanYX*, respectivamente, também foram detectados. A este respeito, a IS*1216E* na região intergênica *vanXY* constitui um conjunto de genes previamente relatado em cepas clínicas de VREfm no Brasil, denotando uma característica regional. IS*1216E* tem sido associada com os genes *tcrB* e *aadE* que conferem resistência ao cobre e aminoglicosídeos, em *E. faecium* e *Streptococcus agalactiae*, respectivamente. Portanto, essa IS pode contribuir para a rápida aquisição de resistência antimicrobiana entre as espécies de cocos Gram-positivos clinicamente importantes. Os tipos de Tn*1546* indistiguíveis que foram identificados no atual estudo isolados de humano e ambientes aquáticos sugerem uma comum partilha de um *pool* de genes de resistência à vancomicina.

Palavras-chaves: *Enterococcus*, multirresitentes, MLST, *vanA*, IS*1216E*.

ABSTRACT

SACRAMENTO, A. G. **Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. in clinical samples, aquatic environments and foods** 2015. 122f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Enterococci are ubiquitous in the environment and in the intestinal tract of humans and animals. The importance of these bacteria has been associated with nosocomial infection and multiple resistance to antimicrobial agents, mainly vancomycin. The aim of the present study was to perform molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. strains (VRE) isolated from hospitalized patients, surface water of urban rivers and retail chicken meat in Brazil. The presence of the *vanA* gene was confirmed in 20 multidrug-resistant strains isolated in 1997-2011. Among these VRE isolates, (n = 12) were identified as *E. faecium* and (n = 8) as *E. faecalis*. *E. faecium* strains isolated from water and clinical samples were classified as clonally related by PFGE, the predominant virulence profile being (acm^+, esp^+). Additionally, while *E. faecium* strains isolated from rivers belonging to ST203, ST412 and ST478 (previously characterized as endemic in Brazilian hospitals), new STs were identified among strains of *E. faecalis* (ST614, ST615 and ST616) and *E. faecium* (ST953 and ST954) isolated from food. Complete sequences of transposon Tn*1546* from VREfm clinical strain 320/07 (ST478) and environmental strain VREfm 11 (ST412) showed a Tn*1546*-like element of ~12800 bp, with T7698C *vanA* and G8234T *vanX* mutations. Moreover, deletion of the Tn*1546* left extremity, and the IS*1251* and IS*1216E* sequence inside the *vanHS* and *vanYX* intergenic region, respectively, were also detected. In this regard, the IS*1216E* sequence inside the *vanXY* intergenic region constitutes a gene array previously reported for Brazilian VREfm clinical strains alone, denoting a regional characteristic. IS*1216E* has been associated with *tcrB* and *aadE* genes, which confer resistance to copper and aminoglycosides, in *E. faecium* and *Streptococcus agalactiae*, respectively. Therefore, IS*1216E* should contribute to rapid acquisition of antimicrobial resistance among species of the clinically important Gram-positive cocci. On the other hand, Tn*1546*-like elements were identical among clinical and environmental VREfm isolates, suggesting sharing of a common vancomycin resistance gene pool.

Keywords: *Enterococcus*, multidrug-resistant, MLST, *vanA*, IS*1216E*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de ação de glicopeptídeos 18

Figura 2 - Cluster do gene *vanA* conferindo resistência à vancomicina 21

Figura 3 - Representação esquemática do protótipo Tn*1546*, mostrando o conjunto de genes *vanA* que conferem resistência aos glicopeptídeos 22

Figura 4 - Localização dos rios Tietê e Pinheiros no Estado de São Paulo e distribuição de pontos de coleta de amostras de água 33

Figura 5 - Dendrogramas mostrando a similaridade genética dos pulsotipos dos 20 VRE 54

Figura 6 - Diagrama e-BURST mostrando todos os STs de *E. faecium* do banco de dados do MLST 57

Figura 7 - Diagrama e-BURST mostrando todos os STs de *E. faecalis* do banco de dados do MLST 58

Figura 8 - Representação esquemática do protótipo Tn*1546* (acima), as deleções, mutações pontuais e as sequencias de inserções identificadas no Tn*1546* de *E. faecium* isoladas da clínica e do rio em comparação com o protótipo (abaixo) 61

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Tipos de resistência aos glicopeptídeos em enterococos 20

Quadro 2 - Descrição dos pontos de coleta de águas que constituem a amostragem 33

Quadro 3 - Conjuntos de iniciadores utilizados nos ensaios de PCR convencional para a detecção de genes *ddl* de *Enterococcus* spp 38

Quadro 4 - Conjuntos de iniciadores utilizados nos ensaios de PCR convencional para a detecção de genes de resistência de *Enterococcus* spp 39

Quadro 5 - Conjuntos de iniciadores e condições de ciclagem utilizados nos ensaios de PCR convencional para a detecção de genes de virulência de *Enterococcus* spp 42

Quadro 6 - Conjuntos de iniciadores utilizados no ensaio de tipagem por sequenciamento de multilocus de *Enterococcus faecalis* 45

Quadro 7 - Conjuntos de iniciadores utilizados no ensaio de tipagem por sequenciamento de multilocus de *Enterococcus faecium* 46

Tabela 1 - Identificação e fonte de isolamento das 20 cepas de enterococos estudadas 49

Tabela 2 - Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de *E. faecalis* e *E. faecium vanA* isolados da clínica, ambiente e alimento 51

Tabela 3 - Distribuição dos principais genes de virulência entre as cepas estudadas 53

Tabela 4 - Perfis de MLST de *E. faecium vanA* isolados de humanos, ambientes e alimentos 56

Tabela 5 - Perfis de MLST de *E. faecalis vanA* isolados de humanos, ambientes e alimentos 56

Tabela 6 - Distribuição dos tipos de PFGE e MLST, e genes de virulência em isolados de *E. faecalis* de diferentes fontes no Brasil (1998-2011) 60

Tabela 7 - Distribuição dos tipos de PFGE e MLST e genes de virulência em isolados de *E. faecium* de diferentes fontes no Brasil (1997-2011) 60

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI	*Heart Infusion Broth*
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CIM	Concentração inibitória mínima
Cyl	citolisina-hemolisina
CC	Complexos clonais
DLV	*double-locus variant*
D-ala-D-ala	D-alanina-D-alanina
D-Lac	D-lactato
D-Ser	D-serina
Esp	Proteínas de superfície de enterococos
EPA	*Environmental Protection Agency*
GelE	gelatinase protease
GI	gastrointestinal
HLAR	Alto nível de resistência aos aminoglicosídeos
hyl_{Efm}	hialuronidase
IS	Sequências de inserção
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ITU	Infecções do trato urinário
MHII	Mueller-Hinton II
MLST	Sequenciamento de múltiplos locus
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	*Open reading frame*
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado
PREBAF	Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos
SLV	*Single-locus variant*
ST	*Sequence type*
SNP	*Single nucleotide polymorphism*
UE	União Europeia
VRE	*Enterococcus* spp resistentes à vancomicina

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 13

1.1 Gênero *Enterococcus* spp 13

1.2 Origem da resistência à vancomicina 14

1.3 Início da resistência dos enterococos à vancomicina 15

1.4 Mecanismo de resistência aos glicopeptídeos 18

1.5 Tranposon Tn*1546* 22

1.6 Fatores de virulência de *Enterococcus* spp 23

1.7 Genética da população dos enterococos 25

1.8 Enterococos em ambientes aquáticos 26

1.9 VRE em isolados de carne de frango 28

2. JUSTIFICATIVA 30

3. OBJETIVOS 31

3.1. Objetivo geral 31

3.2. Objetivos específicos 31

4. MATERIAIS E MÉTODOS 32

4.1 Isolamento e identificação de VRE em amostras clínicas 32

4.2 Isolamento e identificação de VRE em amostras ambientais 32

4.3 Isolamento e identificação de VRE em amostras de alimentos 34

4.4 Identificação bioquímica 35

4.5 Teste para determinação do alto nível de resistência (HLR) aos aminoglicosídeos 35

4.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) 36

4.7 Identificação genotípicas das espécies *E. faecalis* e *E. faecium* 37

4.8 Detecção dos genes de resistência à vancomicina (*vanA, vanB, vanC-1* e *vanC-2/3*) 39

4.9 Extração de DNA genômico 40

4.10 Detecção de genes de virulência 41

4.11 Tipagem molecular por PFGE 43

4.12 Caracterização molecular pelo MLST 44

4.13 Sequenciamento do DNA genômico utilizando sequenciamento de nova geração 47

4.14 Montagem, anotação e depósito do Tn*1546* utilizando sequências de DNA genômico 47

5. RESULTADOS ....., ... 49

5.1 Identificação das espécies de *Enterococcus* spp. e do gene *van* 49

5.2 Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos 50

5.3 Detecção dos genes de virulência 52

5.4 Determinação da similaridade genômica por PFGE 53

5.5 Linhagens clonais identificadas por MLST 55

5.6 Análise do ambiente genético dos Transposons Tn*1546* 61

6. DISCUSSÃO 62

7. CONCLUSÕES 75

8. REFERÊNCIAS 77

9. ANEXOS 105

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Enterococcus* spp

Os enterococos são bactérias Gram-positivas, cocos ovais anaeróbios facultativos que formam cadeias de vários comprimentos. Resistentes e versáteis, com uma habilidade especial para resistir a condições adversas, incluindo altas concentrações de sal e a uma vasta gama de temperaturas (10 °C a > 45 °C). Dessa forma, estão amplamente distribuídos na natureza com capacidade para sobreviver e se desenvolver em vários ambientes, principalmente no solo e na água (MURRAY, 1990).

Essas bactérias foram frequentemente relatadas por causar uma série de infecções pélvicas, neonatais, do trato urinário, bem como endocardites infecciosas. No entanto, apesar do seu potencial patogênico, os enterococos geralmente apresentam moderados níveis de virulência, devido à sua presença como colonizadores naturais do trato gastrointestinal (GI) da maior parte dos seres humanos e animais, e ainda, pelo fato de terem sido utilizados com segurança por décadas como probióticos em seres humanos e animais de fazenda (AGUIRRE & COLLINS, 1993; MURRAY *et al*., 2007).

Algumas características dos enterococos têm contribuído para torná-los importantes patógenos humanos, tais como: i) a capacidade inerente de resistir aos antimicrobianos (clindamicina, cefalosporinas e aminoglicosídeos), ii) de adquirir e disseminar determinantes de resistência a antibióticos (*clusters* de genes de resistência vancomicina), e por fim, iii) ao seu genoma maleável, que pode contribuir a sua adaptação ao ambiente hospitalar e para a capacidade de certas linhagens de colonizar o trato GI e/ou disseminar fora do intestino (MURRAY *et al*., 2000).

Atualmente, 54 espécies e duas subespécies estão descritas no gênero *Enterococcus*

(EUZÉBY, 2015), sendo que, o *Enterococcus faecium*, seguido do *Enterococcus faecalis* são as espécies mais frequentemente isoladas de casos de infecção humana (CATTOIR & LECLERCQ, 2013). Outras espécies, tais como *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. avium*, e *E.raffinosis* são isoladas com muito menos frequência e representam menos do que 5% dos isolados clínicos (PATTERSON *et al*., 1995; CETINKAYA *et al*., 2000).

1.2 Origem da resistência à vancomicina

Com a descoberta dos antibióticos a mais de 70 anos atrás iniciou-se um período de inovação e implementação de drogas na saúde de humanos e animais e na agricultura. Contudo, após essa descoberta, o surgimento de microrganismos resistentes também passou a ser relatado (WRIGHT, 2007; LIVERMORE, 2009). Essas evidências têm justificado a ocorrência de resistência aos antibióticos em bactérias patogênicas nas últimas décadas, reforçadas pelo fato de que as coleções de microrganismos anteriores à era antibiótica foram altamente suscetíveis aos antimicrobianos (HUGHES & DATTA, 1983).

A origem da resistência à vancomicina, antibiótico da classe dos glicopeptídeos, ainda não está elucidado. Estudos sugerem que possa ter surgido de microrganismos que produzem vancomicina, tais como *Streptomyces toyocaensis* e *Amycolatopsis orientalis*, os quais possuem os genes *vanH, vanA* e *vanX* (*vanHAX*), cassete de resistência à vancomicina relacionado com o dos enterococos (MARSHALL *et al*., 1997; MARSHALL *et al*., 1998). Tanto os microrganismos produtores de glicopeptídeos quanto as bactérias ácido lático intrinsecamente resistentes à vancomicina, tais como dos gêneros *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactobacillus*, provavelmente são potenciais reservatórios (DARTOIS *et al*., 1995; ELISHA *et al*., 1995; PARK *et al*., 1997; MARSHALL *et al*., 1998). Assim, os genes de resistência à vancomicina podem ter surgido em decorrência de mutações em genes homólogos dos enterococos ou de outros microrganismos (MARSHALL *et al*., 1998).

O *Paenibacillus popilliae* (anteriormente denominado *Bacillus popilliae*) é uma bactéria utilizada como biopesticida em práticas agrícolas. O *P. popilliae* é resistente à vancomicina [concentração inibitória mínima (CIM) de 800 ug/ml] e sensível teicoplanina (CIM <1 ug/ml) e apresenta o gene ligase com 77% de identidade com o gene *vanA* (RIPPERE *et al*., 1998). Esses biopesticidas foram usados nos Estados Unidos há mais de 50 anos para a supressão de populações de besouros. Um outro estudo mostrou que o *P. popilliae* tem os genes *vanY, vanZ, vanH, vanA* e *vanX* do operon *van* com alta homologia com a sequência do operon *van* enterocócico (PATEL *et al*., 2000).

A origem de resistência à vancomicina é, sem dúvida, antiga. Sequências relacionadas ao *vanHAX* foram recuperados a partir de amostras de 30.000 anos atrás obtidos de solo formado por terra, rochas e gelo, recolhidos em Yukon, um dos três territórios do Canadá (D'COSTA *et al*., 2011). Esse trabalho estabeleceu que os genes de resistência surgiram antes do uso de antibióticos e ainda, oferecendo evidências de que essa resistência é um fenômeno antigo, que ocorre naturalmente no ambiente genético dos microrganismos. Isto é consistente com a rápida emergência de resistência na clínica que prevê que os novos antibióticos selecionam determinantes de resistência pré-existentes que circulam dentro do pangenoma microbiano por milênios. Essa realidade serve como base para a conduta clínica na administração de antibióticos novos e existentes (D'COSTA *et al*., 2011).

1.3 Início da resistência dos enterococos à vancomicina

Os primeiros isolados VRE relatados em 1988 no Reino Unido e na França pertenciam à espécie *E. faecium* (VREfm) (UTTLEY *et al*., 1988; LECLERCQ *et al*., 1988). A princípio, verificou-se uma elevada prevalência de VREfm na comunidade em alguns países da Europa, como o observado na Bélgica (30%), em contraste com os raros casos ocorridos em hospitais

(VAN DER AUWERA *et al*., 1996). A avoparcina, antibiótico da classe dos glicopeptídeos utilizado como promotor de crescimento em animais de produção, foi apontado como agente seletivo de cepas resistentes, que pode ter favorecido a transmissão de VRE para os humanos através da cadeia alimentar (BATES *et al*., 1993). Embora ainda não comprovada, essa transmissão parece muito provável.

A proibição do uso da avoparcina pela União Europeia (UE) em 1997, seguida de todos os outros agentes antimicrobianos utilizados como promotores de crescimento, foi a precursora de muitas controvérsias geradas pela ausência de análises mais detalhadas sobre os riscos do uso desses promotores (ACAR *et al*., 2000; HAMMERUM *et al*., 2010). Como resultado, houve um declínio de isolados de VRE a partir de frangos na Dinamarca e França (BAGER *et al*., 1999; KEMPF *et al*., 2008). No entanto, apesar dessa redução, os determinantes de resistência ainda persistem anos após a cessação completa do consumo de glicopeptídeos por animais de criação (JOHNSEN *et al*., 2011). Portanto, um reservatório animal de genes de resistência ainda pode estar presente, e potencialmente, persistir pelos próximos anos. Durante a década de 2000 na Europa, enquanto a disseminação de VRE por animais diminuía, alguns países da UE registravam aumento de VRE e grandes surtos hospitalares, semelhante ao observado nos EUA (EARSS, 2012). Além disso, as cepas isoladas de hospitais diferiram daquelas isoladas de animais, principalmente por serem altamente resistentes à ampicilina.

Nos EUA, onde a avoparcina nunca foi legalmente disponível para uso em animais e onde a vancomicina oral e intravenosa foi maciçamente utilizada contra doenças humanas, a identificação de VREfm em hospitais foi relatada pela primeira vez em 1989 na cidade de Nova York (FRIEDEN *et al*., 1993). Desde então, a proporção de VRE em hospitais dos EUA aumentou rapidamente, tanto dentro como fora de unidades de terapia intensiva (UTIs), atingindo cerca de 28% dos isolados de enterococos em 1993 (CDC, 1993). De fato, o número de infecções por VRE em hospitais norte-americanos aumentou de 9.820 em 2000 para 21.352 em 2006 (RAMSEY *et al*., 2009). Nos anos seguintes, o *E. faecium* tornou-se a causa mais

comum de infecções hospitalares quando comparado ao *E. faecalis* (HIDRON *et al*., 2008). Essa mudança na espécie é de grande importância clínica, uma vez que infecções por *E. faecium* tem sido mais difícil de tratar por apresentarem alto nível de resistência à ampicilina e aminoglicosídeos (ARIAS & MURRAY, 2008; HIDRON *et al*., 2008; ARIAS & MURRAY, 2011). Diferentemente, nos EUA, cepas de VRE não foram identificadas em indivíduos da comunidade e em animais destinados à produção de alimentos, embora apenas alguns levantamentos epidemiológicos têm sido conduzidos (COQUE *et al*., 2006).

No Brasil, a utilização da avoparcina na alimentação animal foi proibida desde 1998. No entanto, outros antimicrobianos, tais como a avilamicina, bacitracina de zinco, enramicina, flavomicina, lincomicina, colistina, tilosina e virginiamicina ainda são permitidos como aditivos na alimentação animal (BRASIL, 2015). No país, poucos estudos com o objetivo de avaliar a presença de enterococos em frangos foram conduzidos, sem relatos de *Enterococcus* spp. tipos *vanA* (LEME *et al*., 2000; BATISTA XAVIER *et al*., 2006; FRACALANZZA *et al*., 2007). Seguindo a tendência dos EUA, no Brasil, a grande fonte de VRE tem sido proveniente do ambiente hospitalar. Após o primeiro relato de identificação de VRE em 1996, no Estado do Paraná (COSTA *et al*, 1998), vários estudos confirmando a disseminação de clones de VRE multirresistentes em hospitais brasileiros (ZANELLA *et al*., 1999; ZANELLA *et al*., 2003; PALAZZO *et al*., 2011; BATISTÃO *et al*., 2012; RESENDE *et al*., 2014; DA SILVA *et al*., 2014; CAMPOS *et al*., 2014; CORREA *et al*., 2015). Segundo dados do Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY no Brasil, a resistência à vancomicina entre os enterococos aumentou de 4,4% em 2003 para 12,2% em 2008 (GALES *et al*, 2009). Em 2011, um relatório de um programa de vigilância da resistência em países da América Latina mostrou que a taxa de VRE no Brasil foi a maior entre esses países (27%) (JONES *et al*., 2013).

1.4 Mecanismo de resistência aos glicopeptídeos

A síntese do peptidoglicano, principal componente da parede das células bacterianas, é composta por diversas etapas conforme o descrito por REYNOLDS, 1989 e MAINARDI *et al*., 2008. Os antimicrobianos da classe dos glicopeptídeos não atravessam para o citoplasma bacteriano, uma vez que atuam na superfície externa da membrana citoplasmática, inibindo a síntese do peptidoglicano. Esses antimicrobianos se ligam com elevada afinidade na região C terminal D-alanina-D-alanina (D-ala-D-ala) do pentapeptídeo (precursor do peptidoglicano) por meio de cinco pontes de hidrogênio, e devido ao seu alto peso molecular (cerca de 1500-2000 Da), bloqueiam a ação das enzimas envolvidas nas reações de transglicosilação e transpeptidação na síntese da parede celular (**Figura 1**) (COURVALIN, 2006).

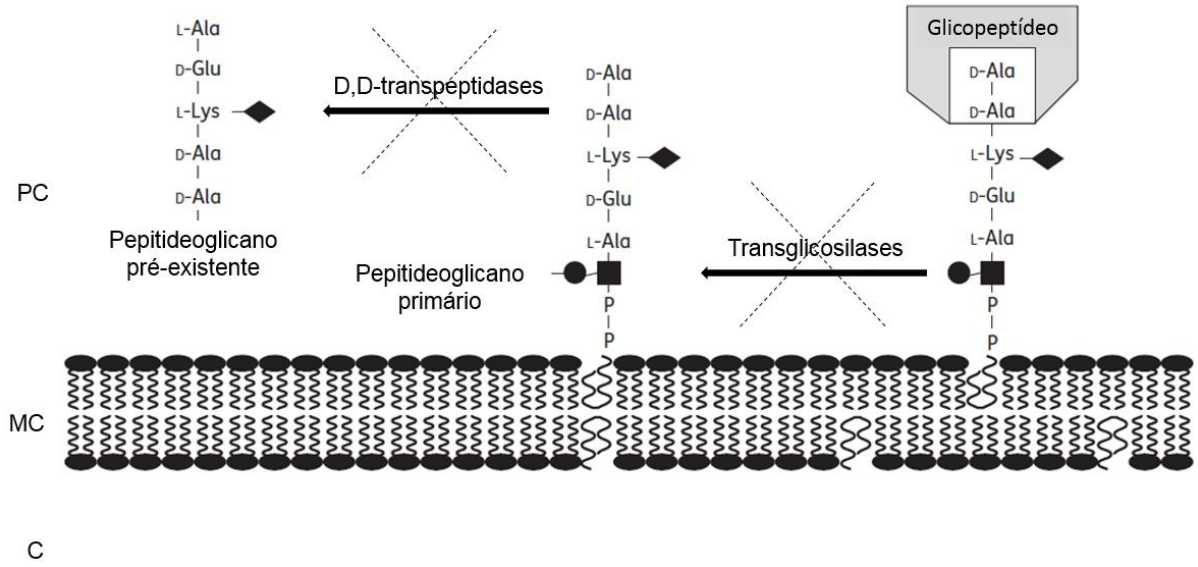


Figura 1 - Mecanismo de ação de glicopeptídeos.
Legenda: PC: Parede celular; MC: Membrana citoplasmática; C: Citoplasma
Fonte: Adaptado de CATTOIR & LECLERCQ (2013).

A resistência aos glicopeptídeos ocorre devido a produção de precursores pentapeptídicos de baixa afinidade que terminam em D-lactato (D-Lac) ou D-serina (D-Ser) e pela eliminação dos precursores de afinidade elevada (D-Ala-D-Ala). Essa modificação do alvo resulta na cooperação de várias enzimas codificadas por genes organizados em um operon, as quais são necessárias para a reprogramação da síntese do peptidoglicano. A mudança do D-Ala para o D-Lac na região terminal do precursor, leva à quebra de uma ligação essencial de hidrogênio, que resulta, por sua vez, em uma diminuição de 1000 vezes na afinidade da vancomicina com os precursores que terminam em D-Ala-D-Ala, resultando em alto nível resistência à vancomicina. Em contrapartida, a mudança do D-Ala para o D-Ser leva apenas a redução de sete vezes na afinidade, e assim, a um nível mais baixo de resistência à vancomicina (COURVALIN, 2009).

Até o presente momento, oito tipos de resistência adquirida aos glicopeptídeos foram relatados com base em critérios fenotípicos e genotípicos (VanA, VanB, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM e VanN) e um outro tipo de resistência (VanC), sendo uma característica intrínseca do *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus casseliflavus* (**Quadro 1**) (Lebreton *et al*., 2011). Os tipos VanA e VanB são os mais frequentemente detectados nos enterococos, sendo ocasionalmente, identificados em bactérias corineformes e estreptocócicas (KRCMÉRY, 2000), e raramente, o operon *vanA* também tem sido detectado em *S. aureus* (SIEVERT *et al*., 2008). Isolados VanA positivos apresentam altos níveis resistentes indutíveis à vancomicina e à teicoplanina (CIM > 64 mg/L), enquanto que os isolados VanB exibem vários níveis de resistência indutíveis à vancomicina (CIM geralmente igual a 16-32 mg/L), mas permanecem sensíveis à teicoplanina.

Quadro 1 - Tipos de resistência aos glicopeptídeos em enterococos.

	Resistência adquirida								Resistência intrínseca
	Alto nível		Variável	Moderado	Baixo nível				Baixo nível
	VanA	VanM	VanB	VanD	VanE	VanG	VanL	VanN	VanC1/C2/C3
Suscetibilidade									
Vancomicina	R	R	r-R	R	r	r	r	r	r
Teicoplanina	R	R	S	r-R	S	S	S	S	S
Transferibilidade	+	+	+	-	-	+	-	+	-
Espécies	A/B*	A	A/B	A/B	B	B	B	A	G/D
Expressão	I	?	I	C	I/C	I	I	C	C/I
Localização	Plasmídeo (Cromossomo)	Plasmídeo (Cromossomo)	Cromossomo (Plasmídeo)	Cromossomo (Plasmídeo)	Cromossomo	Cromossomo	?	Cromossomo	Cromossomo
Precursores finais	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser

Legenda: R, elevado nível de resistência (MIC > 16 mg/L); r, baixo nível de resistência (MIC=8-16 mg/L); S, suscetível; A, *E. faecium*; B, *E. faecalis*; G, *E. gallinarum*; D, *E. casseliflavus*; I, indutível; C, constitutiva. * também outras espécies de *Enterococcus*.

Fonte: Adaptado de CATTOIR & LECLERCQ (2013).

O operon *vanA* é normalmente carreado por um transposon denominado Tn*1546*, que é composto por cinco genes envolvidos na resistência aos glicopeptídeos (*vanHAXYZ*) e dois genes reguladores (*vanRS*). O gene *vanA* codifica uma ligase que catalisa a formação de um depsipeptídeo D-Ala-D-Lac. Por si só, esse gene não confere resistência, uma vez que o substrato de D-Lac é raro na natureza e tem que ser sintetizado. É esse o papel da desidrogenase codificada por *vanH* que reduz piruvato, comumente encontrado na natureza, à D-Lac, proporcionando assim, o substrato para a ligase. Nas etapas seguintes, esse depsipeptídeo é finalmente incorporado como uma forma de pentadepsipeptídeo para a síntese do peptidoglicano. No entanto, a resistência ainda não é expressa, visto que a síntese de precursores do tipo selvagem persiste e permite que a ligação de vancomicina ocorra, e subsequentemente, a ruptura da parede celular. A eliminação desses precursores "sensíveis" é tarefa do gene *vanX,* que codifica uma D, D-dipeptidase capaz de hidrolisar o dipeptídeo D-Ala-D-Ala formado pela ligase natural (Ddl). Além disso, os genes *vanY* codificam uma D, D-carboxipeptidase que elimina o terminal D-Ala de precursores, caso haja eliminação incompleta do dipeptídeo pelo *vanX* (COURVALIN, 2006) (**Figura 2**).

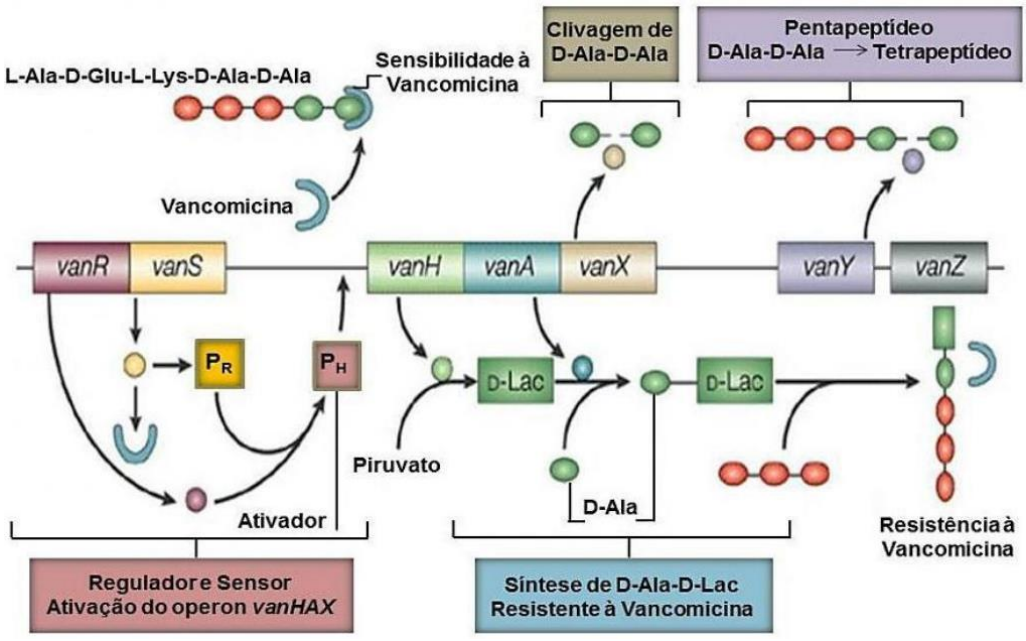


Figura 2 - *Cluster* do gene *vanA* conferindo resistência à vancomicina.
Fonte: Adaptado de HUGHES, 2003.

1.5 Tranposon Tn*1546*

Os primeiros estudos conduzidos na França com isolados de VRE mostraram que o *cluster* de genes *van* reside em um transposon da família Tn*3* de 10.851 pb denominado Tn*1546* (ARTHUR *et al*., 1993). Esse transposon possui duas *open reading frame* (ORF) *upstream* dos genes *vanRSHAXYZ*, denominadas ORF1 e ORF2, mostrando homologia para transposase e resolvase, respectivamente (**Figura 3**). Essas ORFs são transcritas em direções opostas e ambas estão associadas à função de transposição. O Tn*1546* é flanqueado por repetições invertidas imperfeitas que variam de 36-38 pb. Apresenta-se estruturalmente relacionado a transposons da família Tn*3*, não conjugativo e *in vitro*, transpõe em baixa frequência (10^{-8} por doador), conforme o observado em experimentos realizados com plasmídeos (HANDWERGER *et al*., 1995). A maioria dos estudos tem identificado *cluster* de genes *van* em vários plasmídeos diferentes (CLARK *et al*., 1993; MATO *et al*., 1996; THAL *et al*., 1998; WERNER *et al*., 1999; MERLO *et al*., 2015) e mais raramente, no cromossomo (HANDWERGER & SKOBLE, 1995).

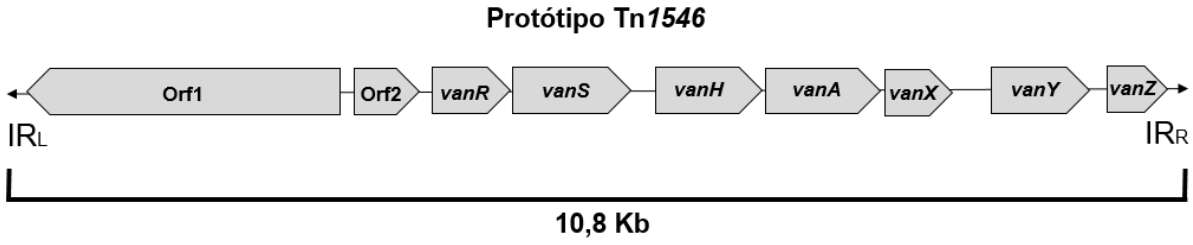


Figura 3 - Representação esquemática do protótipo Tn*1546*, mostrando o conjunto de genes *vanA* que conferem resistência aos glicopeptídeos.

A heterogeneidade genética de elementos relacionados ao Tn*1546* tem sido bem documentada (HANDWERGER *et al*., 1995; ARTHUR *et al*., 1997; MACKINNON *et al*., 1997; WERNER *et al*., 1997; WOODFORD *et al*., 1998; JENSEN *et al*., 1998; VAN DEN BRAAK *et al*., 1998; MERLO *et al*., 2015). Os polimorfismos descritos até o presente

momento, incluem a detecção de sequências de inserções (IS) IS*1216V*, IS*1251*, IS*1542*, IS*1476*, IS*1478*, IS*1485*, IS*1297*, IS*3*, IS*Efl1*, IS*Efa4*, IS*Efa5* e de deleções, tanto na extremidade esquerda (sentido da ORF1) e direita (sentido do *vanZ*), onde termina o transposon. Mutações pontuais na ORF1, *vanR*, *vanS*, *vanA*, *vanX* e *vanY* têm sido descritas (WILLEMS *et al*., 1999; LAUDERDALE *et al*., 2002; CAMARGO *et al*., 2004; HARADA *et al*., 2012). Dentre esses elementos, a IS*1216V* é a mais descrita e disseminada, seguida pelas IS*1251* e IS*1542*, podendo estar presente em diversas regiões do transposon (PALEPOU *et al*., 1998; LEE *et al*., 2004; TALEBI *et al*., 2008; ZHU *et al*., 2009; PARK *et al*., 2011; CHA *et al*., 2013; MERLO *et al*., 2015).

A presença da IS*Efa5* na região intergênica *vanX-vanY* pode resultar na expressão de suscetibilidade à teicoplanina, alterando o fenótipo VanA (HENRIQUE *et al*., 2008). Da mesma maneira, a supressão dos genes *vanX-vanY* pela inserção da IS*1216V* nessa região intergênica está diretamente associada com a incongruência do fenótipo-VanB e genótipo-vanA (OH *et al*., 2007). Discrepâncias do tipo *vanA/VanD* também foram observadas em amostras com transposons que apresentavam alterações nos genes *vanS*, *vanY* e/ou *vanZ* (HASHIMOTO *et al*., 2000; CHA *et al*., 2013). Outros elementos de inserção também podem interromper a porção inicial de Tn*1546*, tais como, a IS*1297* (inserida na IS*1542*) e a IS*1485* (SONG *et al*., 2006; KHAN *et al*., 2008). Os vários locais de inserção indicam que esses elementos são ativamente móveis, alterando o rearranjo do Tn*1546*, modificando sua transmissibilidade e o fenótipo VanA em isolados de humanos, animais e ambientais (PARK *et al*., 2007; NOVAIS *et al*., 2008).

1.6 Fatores de virulência de *Enterococcus* spp

A ascensão dos enterococos como patógenos nosocomiais foi inicialmente o resultado da seletiva vantagem proporcionada pela sua resistência aos antibióticos. No entanto, é provável que outros determinantes de virulência também estejam envolvidos no sucesso desses

microrganismos em ambiente hospitalar. Grandes plasmídeos transmissíveis com de tamanho 150-250 kb são comuns entre os *E. faecium* isolados da clínica e têm um importante papel na sua virulência (ARIAS *et al*., 2009). O gene da hialuronidase (hyl_{Efm}) (que codifica uma família 84 da Glicosiltransferase) tem sido frequentemente referido como um dos mediadores do aumento da virulência que lhe é conferida por esses megaplasmídeos (FREITAS *et al*., 2010).

Em relação aos determinantes da superfície celular, as proteínas de superfície de enterococos (Esp) são codificadas por genes que parecem ter sido adquiridos dentro de uma ilha de patogenicidade, são comumente encontradas em isolados clínicos, apresentando-se ancoradas à parede celular, favorecem a formação de biofilme e possuem um papel nas infecções do trato urinário (ITU) e/ou endocardite em modelos experimentais (SHANKAR *et al*., 2001; HEIKENS *et al*., 2007; HEIKENS *et al*., 2011). Outro fator de virulência importante é a adesina (Acm) de *E. faecium*, que tem a função de se ligar ao colágeno. Essa proteína tem um papel no aumento da capacidade dos membros do clado de *E. faecium* associado ao hospital para causar doença, principalmente em endocardite experimental (NALLAPAREDDY *et al*., 2008).

Ao contrário dos estreptococos e estafilococos, a maioria dos enterococos não produzem um conjunto de toxinas pró-inflamatórias, mas, no entanto, são constituídos por diversos genes que codificam proteínas de adesão que podem mediar a sua ligação aos tecidos do hospedeiro, o que é coerente com a seu papel patogênico na endocardite infecciosa (ARIAS & MURRAY, 2012). Várias proteínas que são secretadas para o meio extracelular têm sido implicadas na virulência enterocócicas. A citolisina-hemolisina (Cyl) é uma toxina que é codificada em plasmídeos ou ilhas de patogenicidade de *E. faecalis*. É secretada no meio extracelular e possui atividade proteolítica em células sanguíneas (SEGARRA *et al*., 1991; BOOTH *et al*., 1996). Outro importante fator secretado é a gelatinase protease (GelE), que participa da ativação de autolisina, uma enzima que degrada o peptidoglicano, levando à liberação de DNA extracelular e a formação de biofilme (THOMAS *et al*., 2009). Em modelos

animais, cepas que não possuem GelE têm mostrado diminuição na translocação através células intestinais T84, virulência atenuada em peritonite, endocardite, endoftalmite e reduzida aderência às raízes dentárias (SINGH *et al*., 1998; HUBBLE *et al*., 2003; ENGELBERT *et al*., 2004; ZENG *et al*., 2005).

1.7 Genética da população dos enterococos

Os primeiros estudos sobre a epidemiologia molecular de VRE no Brasil utilizando eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) mostraram uma disseminação clonal intra e inter-hospitalar (REIS *et al*., 2001; CEREDA *et al*., 2002). Em São Paulo, desde 1997 quando pesquisadores da Instituto Adolfo Lutz (IAL) relataram o primeiro isolado de *E. faecium* tipo *vanA* (ZANELLA *et al*, 1999) e documentaram o primeiro surto nosocomial no país (ZANELLA *et al*, 2003), outros estudos sobre a tipagem por PFGE de *E. faecalis* e *E. faecium* resistentes à vancomicina vêm mostrando a propagação de novos clones em diferentes hospitais das regiões sul e sudeste (D'AZEVEDO *et al*., 2008; PALAZZO *et al*., 2011).

A tipagem por sequenciamento de múltiplos locus (MLST) é baseada em diferenças alélicas de sete genes conservados e tem sido bastante utilizada para análises de relações de ancestralidades. Essa técnica tem permitido identificar que isolados de enterococos recuperados de pacientes hospitalizados, muitas vezes, se agrupam em *cluters* específicos (complexos clonais - CC), os quais são diferentes dos grupos dos isolados comensais ou dos recuperados de animais (GETACHEW *et al*., 2013). Estudos no Brasil e no mundo tem demonstrado que a maioria dos isolados de *E. faecalis* derivados de hospitais pertence a dois complexos clonais: CC2 e CC9 (RUIZ-GARBAJOSA *et al*., 2006; PENAS *et al*., 2013; CONCEIÇÃO *et al*., 2014). O aumento da frequência de isolamento de *E. faecium* deve-se à presença de uma subpopulação policlonal, como os *Sequence types* 17 (ST17), ST18, ST78, ST192, ST412 e ST478, todos

pertencentes ao (CC17) (WILLEMS & VAN SCHAIK *et al*., 2009; PALAZZO *et al*., 2011; DA SILVA *et al*., 2012).

Análises de sequenciamento de nova geração dos enterococos, têm comparado várias sequências dos seus genomas [ex. *single nucleotide polymorphism* (SNP), 16S rRNA, IS*16*] e demonstrado que o clado associado ao hospital é geneticamente diferente da maioria dos isolados comensais de humanos e animais (VAN SCHAIK *et al*., 2010; WERNER *et al*., 2011; GALLOWAY-PENA *et al*., 2012).

1.8 Enterococos em ambientes aquáticos

Os enterococos estão amplamente distribuídos em diversos habitats ambientais, mesmo quando há pouca ou nenhuma entrada de humano e/ou fontes de fezes de animais. Esses habitats extra entéricos incluem solo e sedimentos, areia da praia, vegetação aquática (ex. algas) e terrestre, e ambiente aquáticos (rios, córregos e água do mar), podendo também serem considerados habitats heterotérmicos, uma vez que apresentam temperaturas variáveis, diferentemente da do trato GI de animais de sangue quente, onde a temperatura é relativamente constante (BYAPPANAHALLI *et al*., 2012).

A sua abundância nas fezes de humano e animais, a facilidade com que são cultivados, e a sua correlação com os resultados da saúde humana em água doce e marinha, levaram os enterococos a serem utilizados como ferramentas para avaliar qualidade da água recreacional em todo o mundo. Dada a sua distribuição ubíqua nas fezes de animais e humanos, são usados como bactérias indicadoras de contaminação fecal ou associados a outros para patógenos, em análises de qualidade da água (WOLF, 1972; SADOWSKY & WHITMAN, 2010).

A capacidade dos enterococos em crescer na presença de sal (6,5% de NaCl) é uma das características que distinguem o gênero. A maior tolerância ao sal dos enterococos quando

comparados a outros coliformes fecais (ex. *Escherichia coli*), provavelmente contribui para o seu melhor desempenho como indicadores de risco para a saúde humana em águas recreacionais marinhas (OSTROLENK *et al*., 1947; CABELLI *et al.,* 1979). Atualmente, os enterococos são as únicas bactérias indicadoras de contaminação fecal recomendada pela *Environmental Protection Agency* (EPA) dos EUA para águas salobras e marinhas, uma vez que se correlacionam melhor com os resultados da saúde humana do que os de outras bactérias indicadoras de contaminação fecal (WADE *et al*., 2010). Outros estudos também têm observado a sobrevivência prolongada de enterococos em água doce (ANDERSON *et al*., 2005; HALLER *et al*., 2009) e estuários (JENG *et al*., 2005).

A vegetação aquática e terrestre, areia da praia, sedimentos de água doce e marinha, e do solo foram identificadas como algumas das principais fontes ambientais de enterococos e de outras bactérias indicadoras de contaminação fecal. Essas bactérias derivadas dessas fontes podem, potencialmente, impactar a qualidade da água das praias e bacias hidrográficas associados, e assim, existe a necessidade de uma melhor compreensão do seu destino nesses ecossistemas (BYAPPANAHALLI *et al*., 2012). Vários estudos têm mostrado uma correlação entre a elevada concentrações de enterococos e os riscos de doença GI, respiratória e de pele em humanos durante o uso recreacional da água (KAY, *et al*., 1994; PRÜSS, 1998; SINCLAIR *et al*., 2012).

As características associadas à bactéria "ideal" indicadora de contaminação incluem: baixa virulência; a existência de uma metodologia simples e rápida para contagem; características de sobrevivência que são semelhantes às de patógenos de ambientes extra entérico; e uma grande associação com a presença de agentes patogênicos (CABELLI *et al*., 1979). A concentração de enterococos por método de filtração por membrana e cultivo em meios seletivos (mEI ou M-Enterococcus) são atualmente considerados "padrão ouro" para a avaliação da qualidade da água (EPA, 2002).

Estudos epidemiológicos adicionais de águas impactadas pela poluição incluem a

identificação de enterococos ao nível de espécie e a quantificação de outros patógenos necessários para compreender melhor os riscos à saúde humana. Quando analisados em conjunto com resultados do emprego de tecnologias de sequenciamento de última geração, podem elucidar a compreensão da ecologia de enterococos multirresistentes e a sua continuada utilidade como bactérias indicadoras de contaminação fecal em águas para consumo e recreacionais em todo o mundo (BYAPPANAHALLI *et al*., 2012).

1.9 VRE em isolados de carne de frango

Vários estudos têm identificado a presença de *Enterococcus* tipo *vanA* em animais de corte, carne e produtos de carne no mundo (ROBREDO *et al*., 2000; JUNG *et al*., 2007; HARADA *et al*., 2012; TALEBI *et al*., 2015). A disseminação dessas bactérias multirresistentes fora do ambiente hospitalar tem acarretado sérios problemas ao longo dos últimos anos, e com o uso extensivo de antibióticos em animais de produção, essa se tornou uma provável fonte para a seleção de bactérias. Como consequência, foi estabelecida uma possível rota de transmissão dessas bactérias multirresistentes do animal para o homem através do alimento, especialmente carnes e derivados (GHIDAN *et al*., 2008; CARATTOLI *et al*., 2008).

Baixas doses de agentes antimicrobianos em animais utilizados na alimentação podem em certas condições aumentar a sua produtividade, melhorando a sua alimentação e diminuindo a morbidade e mortalidade causadas por infecções clínicas e subclínicas (BUTAYE & DEVRIESE, 2003). O efeito dos antimicrobianos na promoção do crescimento foi descoberto pela primeira vez quando frangos foram alimentados com produtos de fermentação do *Streptomyces aureofaciens* após a produção de antimicrobianos (STOKSTAD & JUKES, 1950). A avoparcina, um glicopeptídeos, foi introduzido pela primeira vez como promotor de crescimento em 1975 (HAMMERUM *et al*., 2010), sendo usado em frangos e suínos, como

também em perus, bezerros e outros animais (MCDONALD *et al*., 1997; WEGENER, 1998).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define que zoonose é qualquer doença ou infecção naturalmente transmissível de animais vertebrados para o homem e vice-versa (WHO, 2012). A transmissão dessas infecções dos animais para os seres humanos pode ser de forma direta ou indireta. A via de transmissão indireta ocorre por meio de produtos de alimentos animais ou vegetais contaminados (GIRAFFA, 2002; SCHJORRING *et al*., 2011). Os produtos à base de carne podem ser contaminados por matéria fecal nos frigoríficos, enquanto que vegetais podem ser contaminados no campo por estrume ou água de esgoto utilizada para fertilização e irrigação.

Em relação às bactérias resistentes aos antimicrobianos, sabe-se que não são apenas os agentes patogênicos que possuem um potencial zoonótico, uma vez que os genes que codificam a resistência antimicrobiana em comensais, tais como *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp., podem ser transferidos para outros microrganismos patogênicos (EFSA, 2008; SCHJORRING & KROGFELT, 2011). No intestino humano, essas bactérias podem colonizar de forma persistente ou transitória, podendo ser suficiente para os genes de resistência serem transferidos para outras cepas mais adaptadas a colonizar os humanos (BERCHIERI, 1999; LESTER *et al*., 2006; TROBOS *et al*., 2009). O potencial zoonótico de alguns genes de resistência antimicrobiana significa a presença de algumas bactérias resistentes em animais de produção, podendo ser um reservatório e uma fonte de propagação de resistência, afetando a medicina humana e veterinária (WITTE, 2000).

2. JUSTIFICATIVA

Até o momento, não existem dados sobre a relação epidemiológica de *Enterococcus* spp. tipo *vanA* isolados de humanos, ambientes aquáticos e alimentos no Brasil. Como é de conhecimento que os VRE são predominantes em hospitais brasileiros, torna-se oportuno um estudo que vise identificar as principais espécies, perfil de suscetibilidade aos antibacterianos, genes de resistência e virulência dessas bactérias isoladas de outras fontes. Além disso, a tipagem molecular de cepas de VRE permite a identificação de clones e suas possíveis formas de disseminação, podendo auxiliar no monitoramento de novos clones e possibilitar a comparação destes com os identificados no Brasil e em outros países. Por fim, a análise do ambiente genético do *cluster* do gene *vanA*, faz-se importante para a identificação e caracterização das funções dos elementos que medeiam a resistência à vancomicina em isolados de diferentes ambientes ecológicos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar isolados de *Enterococcus* spp., com perfil de resistência aos glicopeptídeos isoladas de amostras clínicas, ambientes aquáticos e alimentos no Brasil, quanto ao perfil de suscetibilidade aos antibacterianos, elemento genético móvel, virulência e a sua relação clonal.

3.2. Objetivos específicos

1. Identificar espécies de *Enterococcus* resistentes aos glicopeptídeos em amostras clínicas, alimentos e amostras de água superficial coletada de rios urbanos.
2. Avaliar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana aos demais antimicrobianos das cepas resistentes aos glicopeptídeos.
3. Identificar o gene de resistência aos glicopeptídeos relacionado à presença do gene *vanA*, *vanB* e/ou *vanC*.
4. Identificar os principais genes de virulência das cepas de *Enterococcus* resistentes aos glicopeptídeos.
5. Avaliar a similaridade genética e presença de clones endêmicos das cepas estudadas.
6. Investigar o ambiente genético do transposon contendo o gene *vanA* em cepas de *Enterococcus faecium* isoladas de diferentes origens.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolamento e identificação de VRE em amostras clínicas

Para o presente estudo, foram identificadas oito cepas clínicas de VRE, as quais foram isoladas durante o período de 1997 a 2011. As cepas de VRE foram selecionadas a partir de um total de 239 isolados de *Enterococcus* spp resistentes à vancomicina recuperados de casos clínicos durante surtos de infecção hospitalar diagnosticados em 26 centros médicos distribuídos na cidade de São Paulo (SACRAMENTO, 2010). As amostras clínicas (sangue, líquor, urina e swab retal) foram processadas e semeadas em ágar sangue à 5% para o isolamento e posterior identificação de *Enterococcus* spp, seguindo o Manual de Microbiologia Clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde (BRASIL, 2013).

4.2 Isolamento e identificação de VRE em amostras ambientais

Foram analisadas 42 amostras de águas superficiais coletadas de oito pontos dos Rios Tietê e Pinheiros próximos de Hospitais de São Paulo nos anos de 2010 a 2011, com colaboração da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) (**Figura 4** e **Quadro 2**). Destas, 31 (75%) foram positivas para enterococos, sendo que foram isoladas seis cepas de VRE em cinco dos oito pontos dos rios que foram coletados (SACRAMENTO *et al*., 2015a). As alíquotas de água utilizadas no presente estudo foram oriundas de projeto temático que investigou a biodiversidade microbiana nas águas dos Rios Tietê e Pinheiros (LINCOPAN, 2010).

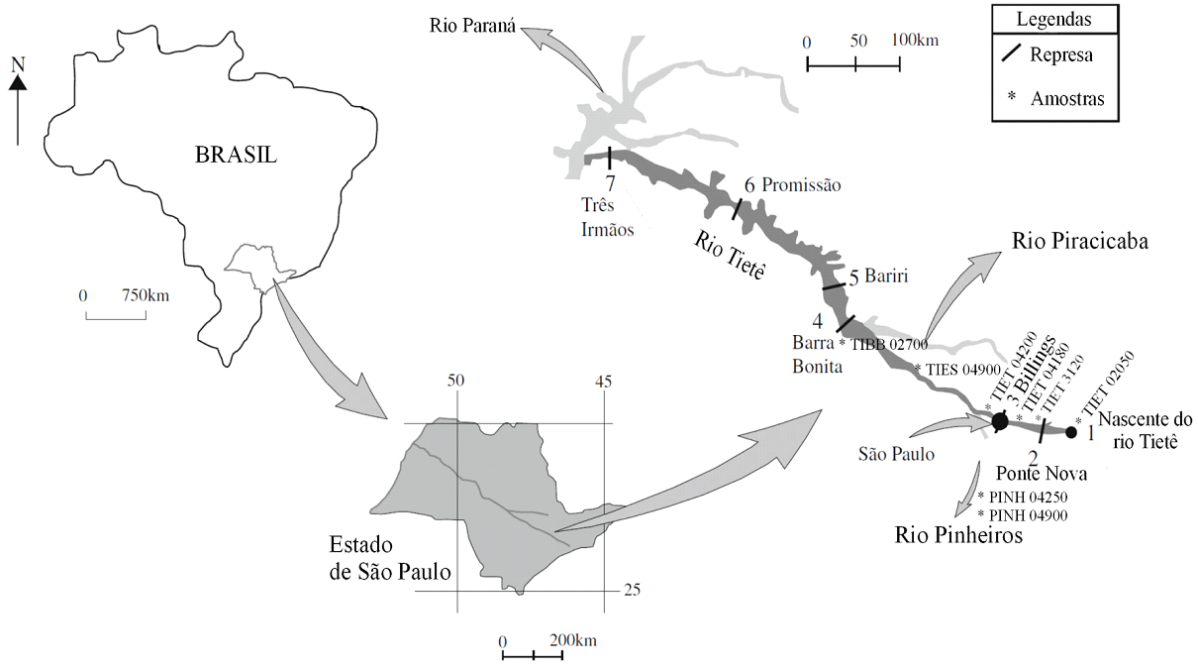


Figura 4 - Localização dos rios Tietê e Pinheiros no Estado de São Paulo e distribuição de pontos de coleta de amostras de água.

Fonte: Modificado de LINCOPAN (2010) e SUARES ROCHA *et al*. (2010).

Quadro 2 - Descrição dos pontos de coleta de águas que constituem a amostragem.

UGRHI	Corpo Hídrico	Código CETESB	Local de Amostragem	Latitude S	Longitude W	Município
6	Rio Tietê	TIET2050	Ponte na Rodovia que liga Mogi das Cruzes a Salesópolis (SP-88)	23 33 54	46 00 57	Biritiba Mirim
	Rio Tietê	TIET3120	À jusante da ETE de Suzano	23 30 11	46 20 13	Suzano
	Rio Tietê	TIET4180	Ponte das Bandeiras, na Avenida Santos Dumont	23 31 18	46 37 52	São Paulo
	Rio Tietê	TIET4200	Ponte dos Remédios, na Avenida Marginal (Rodovia Presidente Castelo Branco)	23 31 11	46 44 47	São Paulo
	Reservatório Edgard de Souza	TIES4900	Próximo às comportas da barragem do reservatório, após a Rede de Retenção de Aguapés	23 27 16	46 54 36	Santana do Parnaíba
	Rio Pinheiros	PINH4250	Na Ponte do Socorro	23 39 53	46 42 35	São Paulo
	Rio Pinheiros	PINH4900	Próximo à sua Foz no Rio Tietê, na estrutura de Retiro	23 31 52	46 44 54	São Paulo
10	Reservatório de Barra Bonita	TIBB2700	No meio do Corpo Central, na direção do Córrego Araquazinho	22 32 39	48 26 48	São Manuel

UGRHI: Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos. Fonte: LICOPAN (2010)

Seguindo métodos padronizados para o exame de água e de águas residuais, alíquotas de 500 ml de água de superfície foram coletadas em frascos de vidro esterilizados (http: //www.standard methods.org). As alíquotas foram armazenadas em frascos de vidro esterilizados, etiquetadas e transportadas em gelo para o laboratório. A partir de cada amostra de água, 100 mL, foi concentrada por filtração através de filtros de membrana esterilizados (tamanho de poro de 0,45 μm). Os filtros foram colocados em placas de ágar base M-Enterococcus e incubada a 37 °C por 24 h. Os filtros de membrana foram removidos assepticamente e colocados separadamente em caldos *Brain Heart Infusion* (BHI). Após o tratamento de vórtice, uma alíquota de 100 uL de cada cultura foi semeada em ágar M-Enterococcus com e sem vancomicina (6 ug/ml).

4.3 Isolamento e identificação de VRE em amostras de alimentos

Seis isolados de VRE foram recuperados de amostras de frango congeladas, destinados à venda em mercados em quatro estados brasileiros. Essas amostras foram isoladas nos anos de 2004 a 2006, durante o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos (PREBAF) (ANVISA, 2008, SACRAMENTO *et al*., 2015b).

As amostras de frango de varejo foram descongeladas a 5°C, por até 24 horas, em seguida, as vísceras de frango foram removidas e cada carcaça foi lavado em água peptonada a 1%, tamponada. Para cada 1 g de amostra, 1 mL de água peptonada foi adicionado (1:1). Depois de enxaguar a superfície inteira das carcaças de frangos, duas alíquotas de 25 mL foram removidas assepticamente e colocadas separadamente em frascos estéreis que tinham anteriormente sido cheio com 225 mL de caldo de Enterococcosel estéril com e sem vancomicina (6ug/ml), respectivamente. Os frascos foram incubados a 35 °C durante 48 horas, e as culturas de caldos Enterococcosel que transformaram para preto foram semeadas em ágar Enterococcosel com e sem vancomicina, respectivamente (ANDREWS & HAMMACK, 2003).

4.4 Identificação bioquímica

A identificação das amostras em gênero e espécie segue as provas bioquímicas padronizadas internacionalmente por FACKLAM & TEIXEIRA (2003). Primeiramente, foi observada a morfologia celular por meio da coloração de Gram. Posteriormente, provas presuntivas para identificação do gênero foram realizadas, como a capacidade de crescimento em meio de cultura líquido acrescido de 6,5% de NaCl, capacidade de crescimento na presença da bile e de hidrolisar a esculina e a hidrólise enzimática da L-pyrrolidonyl-beta-naphtylamide (Teste PYR).

A fermentação dos carboidratos manitol, sorbitol, sorbose, arabinose e rafinose foi avaliada em meio de cultura líquido, tendo como base o caldo de infusão de coração (*Heart Infusion Broth* - BHI), esterilizado por autoclavação a 121ºC por 15 minutos. Ao caldo acrescentou-se o carboidrato e o indicador azul de bromocresol para uma concentração final de 1%.

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

4.5 Teste para determinação do alto nível de resistência aos aminoglicosídeos (HLAR)

A determinação do HLAR foi realizada pelo método de difusão em ágar, conforme técnica descrita pelo manual CLSI (2014). Com o auxílio de uma micropipeta automática o volume de 10 µL de uma suspensão bacteriana com 10^8 UFC/ml, preparada com o auxílio da escala 0,5 de McFaland foi semeado em duas placas de ágar BHI contendo 500 µg/mL de gentamicina ou 2.000 µg/mL de estreptomicina. Após incubação da placa por 24h a 37ºC em

aerobiose procedeu-se a leitura. O crescimento de mais do que uma colônia foi considerada teste positivo para resistência ao antimicrobiano, com exceção da placa com gentamicina, que quando o resultado foi negativo, esta foi incubada por mais 24h.

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

4.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para os ensaios de determinação da CIM, utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo, conforme recomendações do CLSI (2014) e EUCAST (2014). As cepas foram avaliadas frente aos antimicrobianos: vancomicina (VAN), teicoplanina (TEI), ampicilina (AMP), ciprofloxacina (CIP), tetraciclina (TET), clorofenicol (CLO), eritromicina (ERI), linezolida (LNZ), quinupristina/dalfopristina (Q/D), tigeciclina (TIG) e daptomicina (DAP).

Os sais dos antimicrobianos foram estocados a - 20ºC. As soluções concentradas dos antimicrobianos foram feitas em água destilada esterilizada ou em outro solvente adequado ao antimicrobiano, levando-se em consideração a potência de cada antimicrobiano fornecida pelo fabricante.

Como meio de cultura, utilizou-se o caldo Mueller-Hinton II (MHII) cátions ajustados. Neste caldo, prepararam-se as diluições de uso dos antimicrobianos seguidas de diluições seriadas de 1:2. Após a dispensa de 50 µL das diferentes diluições dos antimicrobianos nas placas de microdiluição estéreis com 96 poços, estas foram mantidas a - 20ºC devidamente lacradas e acondicionadas até a realização dos testes de determinação da CIM.

Para a determinação da CIM, o inóculo bacteriano foi preparado em solução fisiológica esterilizada, a partir de um crescimento de 18h em placas de ágar sangue. Com auxílio de um "swab" e de um espectrofotômetro (A625nm = 0,8–1,3), preparou-se uma suspensão bacteriana

ajustada para uma concentração de 10^8 UFC/mL. Desta suspensão, preparou-se o inóculo em caldo MHII para uma concentração final de 10^6 UFC/mL. Um volume de 50 µL foi adicionado por poço das placas de microdiluição e foram incubadas a 37ºC por 24h em condições de aerobiose.

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

A leitura da CIM foi a menor concentração de antibiótico na qual não se observou visualmente o crescimento bacteriano. Os critérios de suscetibilidade e resistência adotados para cada antimicrobiano foram os recomendados pelo CLSI (2014).

4.7 Identificação genotípicas das espécies *E. faecalis* e *E. faecium*

Para confirmação das espécies, foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação dos genes *ddl* que codificam as ligases D-alanina, espécie-específicos para *E. faecalis* e *E. faecium* (DUTKA-MALEN *et al*., 1995). O conjunto de iniciadores que foram utilizados encontra-se descrito no **Quadro 3**.

Quadro 3 - Conjuntos de iniciadores utilizados nos ensaios de PCR convencional para a detecção de genes *ddl* de *Enterococcus* spp.

Genes e nomes dos *primers*	Sequência de *primers*	Tamanhos do amplificados
ddl ***E. faecalis***		
E1	5' ATC AAG TAC AGT TAG TCT 3'	941 pb
E2	3' ACG ATT CAA AGC TAA CTG 5'	
ddl ***E. faecium***		
F1	5' TAG AGA CAT TGA ATA TGC C 3'	550 pb
F2	3' TCG AAT GTG CTA CAA TC 5'	

pb: pares de bases

Para cada 25 µL de reação foram utilizados: tampão da PCR 10X [TRIS-HCl 20 mM, pH8,4; KCl 50 mM (Gibco, BRL) na concentração final de 1X; 3mM de solução de $MgCl_2$ (Gibco, BRL); desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) 100 mM (Gibco, BRL) na concentração final de 200 µM; iniciadores *ddl E. faecalis* em sentido sense e antisense e *ddl E. faecium* em sentido sense e antisense na concentração final de 50 ng (cada), conforme sequências publicadas por DUTKA-MALEN *et al*. (1995). A enzima Taq DNA Polimerase (Gibco, BRL) foi adicionada na concentração final de 1U para cada reação e água destilada, esterilizada, para um volume final de 25 µL. Duas a quatro colônias isoladas, a partir de uma cultura pura em ágar sangue, foram adicionadas em cada tubo de reação (FREE & SHAM, 1996).

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

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

Após o término da reação, o produto de amplificação foi mantido a 4ºC, para posterior análise pela eletroforese em gel de agarose (Sigma) a 1,5% em TBE 1X. A corrida eletroforética foi feita durante 90 minutos a 100 volts. Utilizou-se um marcador de peso molecular para os fragmentos de DNA, 100 pb DNA Ladder (Gibco BRL). A coloração do gel foi realizada com GelRed por 30 minutos e fotografado pelo sistema de fotodocumentação do equipamento Gel Doc EQ (Bio-Rad).

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

Para confirmação dos genes de resistência *vanA, vanB, vanC*-1 e *vanC*-2/3 foram utilizadas as mesmas sequências de nucleotídeos publicados por ZANELLA *et al*., 2003 (**Quadro 4**).

Quadro 4 - Conjuntos de iniciadores utilizados nos ensaios de PCR convencional para a detecção de genes de resistência de *Enterococcus* spp.

Genes e nomes dos *primers*	Sequências de *primers*	Tamanhos do amplificados
vanA		
A1	5' AAA TGT GCG AAA AAC CT 3'	600 pb
A2	3' TCC TGA TGA ATA CGA AAG AT 5'	
vanB		
B1	5' ACC TAC CCT GTC TTT GTG AA 3'	300 pb
B2	3' AAT GTC TGC TGG AAC GAT A 5'	
***vanC*-1**		
C-1_1	5' GGT ATC AAG GAA ACC TC 3'	822 pb
C-1_2	3' CTT CCG CCA TCA TAG CT 5'	
***vanC*-2/3**		
C-2_1	5' CTC CTA CGA TTC TCT TG 3'	439 pb
C-2_2	3' CGA GCA AGA CCT TTA AG 5'	

pb: pares de bases

O preparo das amostras para a reação da PCR foi o mesmo utilizado no item 4.3.1. Cepas de *E. faecium* - *van*A 228, *E. faecalis* - *van*B ATCC 51299, *E. gallinarum* NCTC 12359 e *E. casseliflavus* NCTC 1261 foram usadas como controles positivos, e a cepa *E. faecalis* ATCC 29212 como controle negativo. As amostras e os controles foram incubados no termociclador e submetidos aos seguintes ciclos, conforme protocolo de WOODFORD *et al*. (1995):

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

4.9 Extração de DNA genômico

O DNA genômico das bactérias foi extraído pelo método previamente descrito por BOLANO *et al* (2001). Para a extração do DNA, as amostras de VRE foram cultivadas em ágar sangue a 37ºC por 18-24h. Uma colônia do crescimento bacteriano foi semeada em 5mL de caldo BHI e incubada a 37ºC por 18h.

Após incubação, o caldo BHI com bactérias foi centrifugado por 5 minutos a 2.655g a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento bacteriano foi lavado com 5mL de solução fisiológica (0,85g NaCl em 100mL de água destilada) e centrifugados sob as mesmas condições citadas acima e o sobrenadante foi desprezado.

Em seguida, foi adicionada, ao sedimento bacteriano, a mesma quantidade de pérolas de vidro (proporção 1:1), previamente tratadas com ácido nítrico. Este ácido tem a função de remover metais pesados que atuam como co-fatores para nucleases (DNAses e RNAses). Então, foi adicionada solução tamponante de extração (Tris HCl pH 8,5-0,5M; NaCl; EDTA pH 8-0,5M; SDS e água deionizada) na proporção 2:1, sendo assim, para 300µL do sedimento bacteriano foram adicionados 600µL da solução tamponante e logo após, foram agitados

vigorosamente por 10 minutos.

Foram transferidos 500µL da mistura (mistura do sedimento bacteriano e da solução tamponante) para tubo de 1,5mL. A seguir, foram adicionados ao tubo, 500µL de fenolclorofórmio (1:1), homogeneizando cuidadosamente por 15 segundos. Posteriormente, o tubo foi centrifugado por 20 minutos a 15.300g a 4°C. O sobrenadante (400µL) foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado isopropanol absoluto (armazenado a -20°C) na proporção 1:1 e o tubo foi mantido a -20°C por 18-20 horas.

Após incubação, o tubo foi centrifugado a 15.300g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado 1 mL de etanol 70% (armazenado a -20°C), procedimento seguido por homogeneização por inversão. Em seguida, o tubo foi submetido a uma nova centrifugação sob as mesmas condições descritas anteriormente. Finalmente, após o sobrenadante ter sido desprezado, todo o líquido remanescente foi desprezado em papel absorvente e o tubo contendo o DNA permaneceu aberto no fluxo até a evaporação total do etanol. Em seguida, foi suspenso em 100µL água ultra-pura e armazenado a -20°C.

4.10 Detecção de genes de virulência

A PCR para detecção dos genes de virulência foi realizado com base no mesmo utilizados por (CAMARGO *et al*., 2006; CAMARGO *et al*., 2008). Para cada 25 µL de reação foram utilizados: solução tamponante de reação 10X diluída para a concentração final 1X (Tris 20mM e KCl 50mM), 2mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), 0,625 U de Taq DNA polimerase, 0,2mM de cada um dos quatro nucleotídeos (dNTP), 21 pmol dos *primers* para amplificação dos genes de virulência, 2µL de DNA na concentração de 30 ng/µL e água ultra pura q.s.p. Foram utilizadas as mesmas sequências de nucleotídeos publicados por (CAMARGO *et al*., 2006; CAMARGO *et al*., 2008) (**Quadro 5**).

Quadro 5 - Conjuntos de iniciadores e condições de ciclagem utilizados nos ensaios de PCR convencional para a detecção de genes de virulência de *Enterococcus* spp.

Genes	*Primers*	Sequências de *primers*	Tamanhos do amplificados	Temperatura de hibridização
acm	*acm* F	GGCCAGAAACGTAACCGATA	353 pb	58ºC
	acm R	CGCTGGGGAAATCTTGTAAA		
cyl	*cylL*$_L$ F	AACTAAGTGTTGAGGAAATG	159 pb	48,5ºC
	cylL$_L$ R	AAAGACACAACTACAGTTAC		
	CylLs F	AGAACTTGTTGGTCCTTC	134 pb	50ºC
	CylLs R	GCTGAAAATAATGCACCTAC		
	*Cyl*A F	ACAGGTTATGCATCAGATCT	507 pb	52ºC
	*Cyl*A R	AATTCACTCTTGGAGCAATC		
esp	*esp* F	AGATTTCATCTTTGATTCTTGG	500 pb	56ºC
	esp R	AATTGATTCTTTAGCATCTGG		
*gel*E	*gel*E F	AATTGCTTTACACGGAACGG	548 pb	60ºC
	*gel*E R	GAGCCATGGTTTCTGGTTGT		
hyl	*hyl* F	CGATGCGCAAGAATTAGACA	308 pb	54,4ºC
	hyl R	CATGATTGGACAACCGAGTG		

pb: pares de bases

As condições para a PCR foram: 94°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, temperatura de hibridação para cada par de *primer* por 1 minuto, 72°C por 1 minutos e extensão final a 72°C por minutos. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1%. Após o término da eletroforese, o gel foi corado no GelRed e observado sob luz ultravioleta com o auxílio do fotodocumentador. As cepas controle para as reações foram: *E. faecalis* MMH594 (asc10$^+$, cylLILsABM$^+$, esp$^+$, IPA$^+$) , *E. faecalis* OG1RF (gelE$^+$), *E. faecium* TX0016 (hylefm$^+$, acm$^+$) e *E. faecalis* JH2-2 (controle negativo de todos os genes de virulência) (CAMARGO *et al*., 2006; CAMARGO *et al*., 2008).

4.11 Tipagem molecular por PFGE

A caracterização genética das cepas de VRE foi realizada pela metodologia de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), segundo o protocolo utilizado por Zanella e colaboradores (2003).

Uma colônia do crescimento bacteriano em ágar BHI foi semeada em 5mL de caldo *Toddy Hewitt* e incubada a 37ºC por 18h. Um volume de 1,5mL do crescimento foi centrifugado por 2 minutos a 12.000 rpm a 11ºC. O sedimento foi lavado com 500 µL de tampão PIV (TRIS 10mM , NaCl 1M, pH 8,0) e centrifugado, descartando o sobrenadante para obter o sedimento. A partir desse sedimento foi preparada uma suspensão bacteriana em 200µL de PIV. Um volume de 150µL desta suspensão foi diluído em 150µL de agarose de baixo ponto de fusão a 1,5%. Gotas de 20µL foram dispensadas sobre uma placa de vidro recoberta com parafilme, formando discos de agarose contendo as células bacterianas foram formados.

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

Os discos de agarose contendo DNA bacteriano foram equilibrados com 50 µL de tampão de enzima de restrição (TRIS 6mM, pH 8, KCl 20mM, MgCl2 6mM) por no mínimo 30 minutos a temperatura ambiente. Após a retirada deste tampão, adicionou-se 45 µL do

mesmo tampão acrescido de 2-mercaptoetanol a 6mM, 10 µl/mL de BSA e enzima de restrição *Sma*I na concentração final de 0,6 U/µL. Esta reação foi mantida a 25ºC por 4-18h para a digestão do DNA.

A separação dos fragmentos de DNA foi realizada pela eletroforese em gel de agarose para PFGE a 1% em tampão TBE 0,5X. O padrão de peso molecular Lambda S340 (New England, Biolabs) foi utilizado para comparação das bandas. A corrida eletroforética foi realizada no sistema CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA) e nas seguintes condições: tensão de 200 volts, temperatura de 11ºC, tempo inicial de 5 segundos, tempo final de 35 segundos e tempo de corrida de 24h. Após a corrida, o gel foi corado com GelRel por 30 minutos e fotografado pelo sistema de fotodocumentação do equipamento Gel Doc EQ (Bio-Rad).

A análise dos perfis genéticos foi realizada por meio do programa BioNumerics (Version 5.0; Applied Maths NV, Keistraat 120, 9830 Sint-Martens-Latem, Belgium). Para esta análise, foi aplicado o coeficiente de Dice e o método de pareamento das bandas (UPGMA) para gerar os dendrogamas de relações genéticas entre os perfis, comparando-os entre si. Foi utilizada tolerância de 1% e otimização de 0,5% e os tipos de PFGE foram atribuídos com base nos padrões similaridade > 90% conforme WERNER *et al*. (2007).

4.12 Caracterização molecular pelo MLST

A tipagem por sequenciamento de múltiplos locus (MLST - *Multilocus Sequence Typing*) em amostras de *E. faecium* e *E. faecalis* foi realizada segundo o esquema proposto por HOMAN *et al*. (2002) e GARBAJOSA *et al*. (2006).

Para a amplificação de cada um desses genes foi preparada uma mistura contendo: 4µL de DNA a uma concentração de 10 ng/µL; 0,5 µL de *Taq* polimerase (Fermentas 0,5U); 5 µL do tampão concentrado; 5 µL de $MgCl_2$ a 2,5mM; 5 µL de dNTP (cada um a 200µM); 2 µL de

cada iniciador a 250nM e água deionizada para completar o volume final de 50 μL. As reações foram amplificadas no termociclador Veriti Thermal Cycler 6.5 (Applied Biosystems) com as seguintes condições: um ciclo de 5 minutos a 94°C seguido de trinta ciclos de amplificação, cada uma consistindo de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C. A reação foi concluída com um ciclo de 5 minutos a 72°C. O conjunto de iniciadores que foram utilizados encontra-se descrito no **Quadros 6** e **7.**

Quadro 6 - Conjuntos de iniciadores utilizados no ensaio de tipagem por sequenciamento de multilocus de *Enterococcus faecalis.*

Genes	**Funções**	**Sequências de *primers***	**Tamanhos dos produtos**
gyd-1	Desidrogenase gliceraldeido-3-fosfato	CAAACTGCTTAGCTCCAATGGC	395 pb
gyd-2		CATTTCGTTGTCATACCAAGC	
pstS-1	Transportador cassete ligado a ATP fosfato	CGGAACAGGACTTTCGC	583 pb
pstS-2		ATTTACATCACGTTCTACTTGC	
gki-1	Glicocinase	GATTTTGTGGGAATTGGTATGG	438 pb
gki-2		ACCATTAAAGCAAAATGATCGC	
aroE-1	Chiquimato 5-desidrogenase	TGGAAAACTTTACGGAGACAGC	459 pb
aroE-2		GTCCTGTCCATTGTTCAAAAGC	
xpt-1	Xantina fosforibosiltransferase	AAAATGATGGCCGTGTATTAGG	456 pb
xpt-2		AACGTCACCGTTCCTTCACTTA	
yiqL-1	Acetil-CoA acetiltransferase	CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG	436 pb
yiqL-2		GAATATCCCTTCTGCTTGTGCT	
gdh-1	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	GGCGCACTAAAAGATATGGT	530 pb
gdh-2		CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	

Quadro 7 - Conjuntos de iniciadores utilizados no ensaio de tipagem por sequenciamento de multilocus de *Enterococcus faecium.*

Genes	Funções	Sequências de *primers*	Tamanhos dos produtos
adk1	Adenilato quinase	TATGAACCTCATTTTAATGGG	437 pb
adk2		GTTGACTGCCAAACGATTTT	
atpA1	Subunidade alfa ATP sintetase	CGGTTCATACGGAATGGCACA	556 pb
atpA2		AAGTTCACGATAAGCCACGG	
ddl1	D-alanina-D-alanina	GAGACATTGAATATGCCTTATG	465 pb
ddl2		AAAAAGAAATCGCACCG	
gdh1	Desidrogenase glicose-6-fosfato	GGCGCACTAAAAGATATGGT	530 pb
gdh2		CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	
gyd1	Desidrogenase gliceraldeido-3-fosfato	CAAACTGCTTAGCTCCAATGGC	395 pb
gyd2		CATTTCGTTGTCATACCAAGC	
purK1	Fosforibosil aminoimidazol carboxilase	GCAGATTGGCACATTGAAAGT	492 pb
purK2		TACATAAATCCCGCCTGTTTC/T	
pstS1	Transportador cassete ligado a ATP fosfato	TTGAGCCAAGTCGAAGCTGGAG	583 pb
pstS2		CGTGATCACGTTCTACTTCC	

Os produtos da PCR foram purificados com a utilização do *kit* de purificação GE Healthcare, segundo as recomendações do fabricante, e enviados ao Centro de Estudos do Genoma Humano para sequenciamento. Foi utilizado um sistema de análise de DNA de 48 capilares, no ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram feitas usando o *Kit* BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing (código 4337456). As sequências genéticas foram analisadas e comparadas com as sequências publicadas na base de dados www.mlst.net por meio do programa Bioedit. Para cada cepa foi obtido um conjunto de sete números, um para cada gene estudado, e este conjunto de números, foi representado por um outro número denominado Tipo de Sequência (*Sequence Type*, ST).

Utilizando os programas eBURSTv3, um diagrama foi construído com base no ST de cada cepa e do banco de dados, para demonstrar a relação entre as cepas e também para separá-las em grupos representando complexos clonais, quando existentes.

4.13 Sequenciamento do DNA genômico utilizando sequenciamento de nova geração

O DNA genômico de duas cepas de *E. faecium* isolados de diferentes fontes pertencentes aos clones (ST412 e ST478) endêmicos no Brasil (PALAZZO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2012; MERLO *et al*., 2015), foram extraídos conforme o item 3.9 e sequenciados na plataforma *Ion Torrent Personal Genome Machine*™ (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Para a preparação da biblioteca foi o utilizado um kit para fragmentação enzimática e em seguida para preparação do template foi utilizado o kit OT2 400 bp e este fora submetido no *one touch* 2. Por fim foi utilizado o *Ion PGM™ 400 Sequencing Kit* para o sequenciamento juntamente com um *Ion 318 Chip v2*.

4.14 Montagem, anotação e depósito do Tn*1546* utilizando sequências de DNA genômico

Após o sequenciamento, as sequências com qualidade PHRED ≥ 20 foram submetidas a uma montagem *de novo* ou *ab initio*, utilizando dois montadores *SPAdes 3.5* (BANKEVICH *et al*., 2012) e *Mira v4* (CHEVREUX *et al*., 1999), respectivamente. Os *contigs* obtidos das duas montagens foram alinhados utilizando o programa *Blast* (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL *et al*., 1990) contra o banco de dados de nucleotídeos do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Para identificar em quais sequências o transposon Tn*1546* estava contido, os resultados do *Blast* foram filtrados, ou seja, *contigs* que apresentaram melhor *hit* contra plasmídeos foram separados e alinhados par a par (*pairwise*), uns contra os outros, gerando *supercontigs*.

Para a montagem das sequências completas dos transposons Tn*1546* das duas cepas, foi realizada uma montagem por referência, alinhando os transposons pesquisados com sequência referência do Tn*1546* de número de acesso M97297.

As sequências finais dos transposons foram anotadas pela ferramenta RAST (*Rapid Annotations Subsystem Technology*) (AZIZ *et al*., 2008) e feita uma curadoria manual utilizando o programa *Artemis* (RUTHERFORD *et al*., 2000). As regiões contendo repetições invertidas, repetições diretas e duplicações de sítio alvo e sequência de inserção foram identificadas usando o programa *ISFinder* (SIGUIER *et al*., 2006). Por fim, as sequências dos transposons foram depositadas no NCBI com os números de acesso KR349520 e KR047792.

5. RESULTADOS

5.1 Identificação das espécies de *Enterococcus* spp. e do gene *van*

Das 20 cepas de *Enterococcus* spp. isoladas de amostras clínicas, de carne de frango e água superficial coletada de rios urbanos em São Paulo, foram identificadas 12 cepas de *E. faecium* e oito cepas de *E. faecalis*, todas contendo o gene de resistência aos glicopeptídeos *vanA* (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Identificação e fonte de isolamento das 20 cepas de enterococos estudadas.

N° da cepa	Ano	Origem	Estado	Amostra	Identificação
98A	1997	Hospital 1	SP	Líquor	*E. faecium*
378	1998	Hospital 1	SP	Sangue	*E. faecium*
470	1998	Hospital 1	SP	Swab retal	*E. faecalis*
82	2000	Hospital 1	SP	Sangue	*E. faecalis*
55	2004	Frango	SC	Carne	*E. faecium*
92	2004	Frango	RS	Carne	*E. faecalis*
96	2004	Frango	RS	Carne	*E. faecalis*
154	2005	Frango	ES	Carne	*E. faecalis*
402	2005	Frango	SP	Carne	*E. faecium*
438	2005	Frango	SP	Carne	*E. faecalis*
320	2007	Hospital 2	SP	Sangue	*E. faecium*
57	2008	Hospital 3	SP	Urina	*E. faecium*
106	2010	Hospital 3	SP	Swab retal	*E. faecalis*
09	2011	Hospital 3	SP	Swab retal	*E. faecium*
38	2011	Rio Tietê (TIET 4180)	SP	Água	*E. faecium*
29	2011	Rio Tietê (TIET 4200)	SP	Água	*E. faecalis*
9	2011	Rio Tietê (TIES 4900)	SP	Água	*E. faecium*
11	2011	Rio Tietê (TIES 4900)	SP	Água	*E. faecium*
28	2011	Rio Pinheiro (PINH 4250)	SP	Água	*E. faecium*
21	2011	Rio Pinheiro (PINH 4900)	SP	Água	*E. faecium*

Legenda: Número (N°); Rio Tietê localizado na Ponte dos Remédios, na Avenida Marginal, São Paulo (TIET 4200); Rio Tietê no Reservatório Edgard de Souza, Santana do Parnaíba (TIES 4900); Rio Pinheiro na Ponte do Socorro, São Paulo (PINH 4250); Rio Pinheiro próximo à sua Foz no Rio Tietê, na estrutura de Retiro, São

Paulo (PINH 4900); Rio Tietê na Ponte das Bandeiras, na Avenida Santos Dumont, São Paulo (TIET 4180); Rio Grande do Sul (RS); Espírito Santo (ES); São Paulo (SP) e Santa Catarina (SC).

As figuras dos géis de agarose demonstrando a amplificação dos genes que codificam a ligase D-alanina D-alanina (*ddl*) utilizada na confirmação das espécies *E. faecalis* e *E. faecium* e do gene *vanA* de algumas amostras representativas encontra-se nos **Anexos 1** e **2**, respectivamente.

5.2 Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos

A **Tabela 2** mostra a concentração inibitória mínima das cepas de VRE testadas com 13 antimicrobianos utilizados no seu monitoramento. As cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* resistentes aos glicopeptídeos mostraram um perfil de multirresistência. As cepas clínicas apresentaram resistência aos glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina), quinolonas (ciprofloxacina), macrolídeos (eritromicina); as isoladas dos rios foram resistentes aos glicopeptídeos, penicilinas (ampicilina), quinolonas (ciprofloxacina), macrolídeos (eritromicina) e as de alimentos, além dos glicopeptídeos foram resistentes a tetraciclina e as estreptograminas (quinupristina/dalfopristina). Os isolados foram resistentes a no mínimo cinco e no máximo nove antimicrobianos diferentes. As drogas mais eficazes contra o *E. faecalis* e *E. faecium* foram linezolida, daptomicina e tigeciclina. Foi detectada resistência intermediária a linezolida na cepa *E. faecium* 28 isolada do rio Tietê.

Tabela 2 - Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de *E. faecalis* e *E. faecium vanA* isolados da clínica, ambiente e alimento.

Cepa	N°[a]	Origem	HLAR[b]		Perfil de resistência CIM (ug/ml)[c]										
			GEN	EST	VAC	TEI	AMP	TET	CIP	ERI	CLO	LIN	Q/D	DAP	TIG
E. faecium	98A	Clínica	**R**	S	**>64**	**>32**	**>32**	**>64**	**>64**	**>256**	8	2	1	0,5	0,01
	378		**R**	S	**>64**	**>32**	**>32**	1	**>64**	**>256**	16	2	1	0,5	0,12
	57		S	**R**	**>64**	**>32**	**>32**	1	**>64**	**>256**	16	2	1	1	0,06
	320		S	**R**	**>64**	**>32**	**>32**	1	**>64**	**>256**	16	2	1	1	0,01
	09		S	S	**>64**	**>32**	**>32**	**>64**	**32**	**>256**	8	2	**8**	2	0,06
E. faecalis	470		**R**	S	**>64**	**>32**	**128**	**>64**	**>64**	**>256**	16	2	**32**	0,5	0,06
	82		**R**	S	**>64**	**>32**	2	**>64**	**>64**	**>256**	**>64**	2	**32**	1	0,06
	106		**R**	**R**	**>64**	**>32**	8	**64**	**32**	**>256**	**64**	2	**16**	0,5	0,25
E. faecium	38	Rios urbanos	S	**R**	**>64**	**>32**	**>32**	1	**>32**	**>256**	**>64**	2	**16**	1	0,03
	9		S	**R**	**>64**	**>32**	**>32**	0,5	**>32**	**>256**	16	2	2	1	0,03
	11		S	**R**	**>64**	**>32**	**>32**	0,5	**>32**	**>256**	4	1	1	1	0,06
	28		S	**R**	**>64**	**32**	**>32**	1	**>32**	**>256**	16	4	2	1	0,03
	21		S	S	**>64**	**32**	**>32**	**>64**	**4**	**>256**	8	2	1	1	0,03
E. faecalis	29		S	**R**	**>64**	**>32**	**>32**	1	**>32**	**>256**	**64**	2	**16**	2	0,06
E. faecium	55	Alimento	S	**R**	**>64**	**64**	0,25	**>64**	**4**	0,25	8	1	**>32**	2	0,12
	402		S	S	**64**	**>64**	1	**>64**	0,25	**8**	8	2	**16**	1	0,06
E. faecalis	96		**R**	**R**	**64**	**>32**	4	**64**	**>64**	**>64**	**64**	2	**32**	1	0,12
	154		**R**	**R**	**64**	**32**	4	8	**64**	**64**	**64**	2	**16**	2	0,12
	438		S	**R**	**64**	**32**	2	**64**	0,5	0,5	16	1	**16**	0,5	0,12
	92		**R**	**R**	**64**	**>32**	2	**>64**	**>64**	**>64**	**64**	2	**>32**	2	0,03

Legenda: [a] Número da cepa. [b] Alto nível de resistência aos aminoglicosídeos (HLAR) foi determinada pelo método de diluição em ágar. Gentamicina (GEN) e estreptomicina (EST). [c] A concentração inibitória mínima (CIM) foram determinadas pela técnica de microdiluição em caldo. O negrito

indica a resistência e o sombreamento cinza, o intermediário. Vancomicina (VAN), teicoplanina (TEI), ampicilina (AMP), tetraciclina (TET), ciprofloxacina (CIP), eritromicina (ERI), cloranfenicol (CLO), linezolida (LIN), quinopristina/dalfopristina (Q/D), daptomicina (DAP) e tigeciclina (TIG). O CLSI (2013) foi usado para interpretar os resultados de CIM, exceto para a tigeciclina, que foi utilizado o EUCAST (2014)

5.3 Detecção dos genes de virulência

A **Tabela 3** mostra a presença dos principais genes de virulência de *E. faecalis* e *E. faecium* entre as diferentes fontes de isolamento. Todas as espécies de *E. faecium* apresentaram o gene *acm* (adesina de colágeno) (**Anexo 3**). Os genes de virulência entre *E. faecium* isolados da clínica e do ambiente foram mais frequentemente detectados do que nos do alimento com destaque para *acm*, *esp* (proteína de superfície enterocócica). Todas as cepas de *E. faecalis* apresentaram o gene que codifica a gelatinase (*gelE*). Os genes codificadores da citolisina-hemolisina (*cylLL, cylLs* e *cylA*) foram detectados apenas na cepa *E. faecalis* 29 isolada do Rio Tietê.

Tabela 3 – Distribuição dos principais genes de virulência entre as cepas estudadas.

Cepa	N°[a]	Origem	Genes de virulência[b]
E. faecium	98A	Clínica	*acm, esp*
	378		*acm, esp*
	57		*acm, esp*
	320		*acm, esp,* hyl_{efm}
	09		*acm, esp,* hyl_{efm}
E. faecium	38	Rios urbanos	*acm, esp,* hyl_{efm}
	9		*acm, esp,* hyl_{efm}
	11		*acm, esp,* hyl_{efm}
	28		*acm, esp,*
	21		*acm, esp,*
E. faecium	55	Alimento	*acm*
	402		*acm, esp*
E. faecalis	470	Clínica	*gelE, esp*
	82		*gelE, esp*
	106		*gelE*
E. faecalis	29	Rios urbanos	*gelE, esp,* $cylL_L$, $cylL_S$, *cyl*A
E. faecalis	96	Alimento	*gelE*
	154		*gelE*
	438		*gelE*
	92		*gelE*

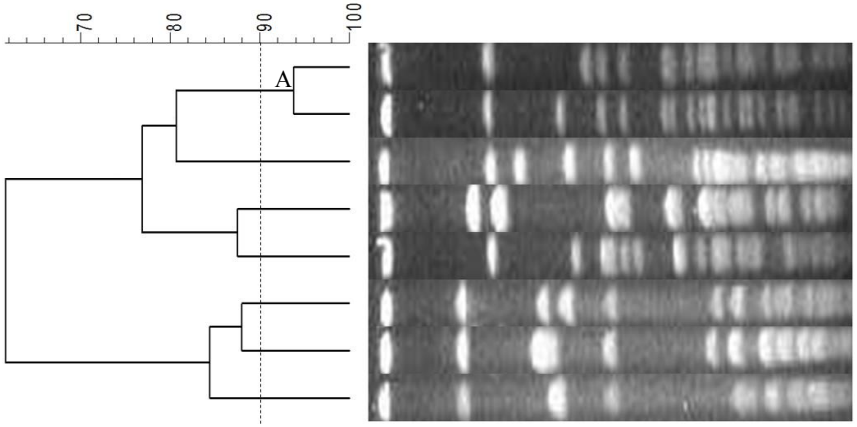
Legenda: [a] Número da cepa. [b] Genes de virulência: *acm* (adesina de colágeno), *esp* (proteína de superfície enterocócica), hyl_{efm} (hialuronidase), *gelE* (gelatinase) e citolisina-hemolisina (*cylLL, cylLs, cylA*).

5.4 Determinação da similaridade genômica por PFGE

Os dados obtidos pelo PFGE foram analisados utilizando dendrogramas, que incluíram pulsotipos obtidos a partir de cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* (**Figuras 5A** e **B**). As cepas de *E. faecalis* 470 e 82 foram pertencentes ao mesmo *cluster* A com similaridade maior do que 90%, enquanto que as demais isoladas de diferentes fontes apresentaram não relacionadas clonalmente.

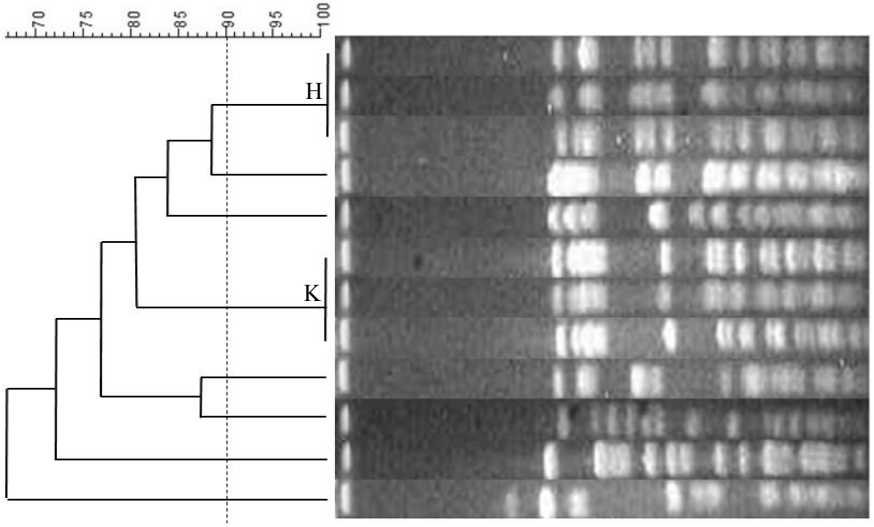
As cepas de *E. faecium* 11, 28 e 320 isoladas dos Rios Tietê e Pinheiros e do Hospital 2, respectivamente, foram indistinguíveis pelo PFGE e classificados como pertencentes ao *cluster* H. Além disso, três *E. faecium* isolados de dois pontos distintos do Rio Tietê e do Hospital 1 (38, 9 e 378, respectivamente) apresentaram o mesmo pulsotipo K.

A) *E. faecalis*



% de similaridade/*clusters*	Perfil de PFGE	Cepas	Origem	Pulsotipo
		470	Hospital 1	A
		82	Hospital 1	A
		92	Frango	B
		29	Rio Tietê	C
		106	Hospital 3	D
		96	Frango (RS)	E
		154	Frango (ES)	F
		438	Frango (SP)	G

B) *E. faecium*



% de similaridade/*clusters*	Perfil de PFGE	Cepas	Origem	Pulsotipo
		11	Rio Tietê	H
		28	Rio Pinheiros	H
		320	Hospital 2	H
		57	Hospital 3	I
		21	Rio Pinheiros	J
		38	Rio Tietê	K
		9	Rio Tietê	K
		378	Hospital 1	K
		09	Hospital 3	L
		402	Frango (SP)	M
		55	Frango (SC)	N
		98A	Hospital 1	O

Figura 5 - Dendrogramas mostrando a similaridade genética dos pulsotipos dos 20 VRE.

5.5 Linhagens clonais identificadas por MLST

Os **Anexos 4** e **5** mostram a amplificação dos fragmentos internos de sete genes *housekeeping* do *E. faecalis* 470 e *E. faecium* 11, respectivamente, que foram purificados e sequenciados.

As linhagens clonais dos 12 *E. faecium* apresentaram oito STs diferentes (ST114, ST203, ST412, ST478, ST858, ST896, ST953 e ST954) e oito *E. faecalis* foram distribuídos em sete STs diferentes (ST4, ST6, ST9, ST59, ST614, ST615 e ST616) (**Tabelas 4** e **5**).

Dentre as cepas caracterizadas, cinco novos STs foram identificados nos isolados de frango (*E. faecium* ST953 e ST954, e *E. faecalis* ST614, ST615 e ST616) e um novo ST858 isolado da clínica, sendo registrados no banco de dados do MLST (http://pubmlst.org/efaecium/; http://pubmlst.org/efaecalis/). Os ST953 e ST954 foram detectados devido à presença de alelos novos para os genes *atpA*, *gdh* e *gyd*, identificados como 77, 67 e 44, respectivamente. Os demais STs apresentaram os seguintes alelos: ST614 *pstS* = 75; ST615 *xpt* = 67; ST616 *gki* = 78 e *aroE* = 81, reportados pela primeira vez neste estudo. O ST858 apresentou uma nova combinação de alelos (*atpA* = 45, *ddl* = 43, *gdh* = 22, *purK* = 44, *gyd* = 16, *pstS* = 20, *adk* = 18) (**Tabelas 4** e **5**).

Entre as cepas de *E. faecium*, o ST478 foi o mais frequente (quatro isolados - um da clínica e três do ambiente) e apresentou-se estreitamente relacionado com os ST412 e ST896, compartilhando todos os alelos, com exceção do gene *ddl*. Além disso, ST478 partilhou com todos os genes alelos do ST203, exceto para os genes *ddl* e *purK* (**Tabela 4**). O ST478 é SLV (do inglês, *single-locus variant*) do ST412 e DLV (do inglês, *double-locus variant*) dos ST896 e ST203, todos pertencentes ao CC17. As cepas de *E. faecium* também apresentaram os ST953 e ST954, que não possuem complexo clonal atribuído, e os ST114 e ST858, que foram denominados *singletons* (**Figura 6**).

O *clustering* dos oitos STs de *E. faecalis* pelo eBURST revelou a presença do CC9 (ST9), CC2 (ST6), CC4 (ST4), CC21 (ST615), CC59 (ST59), ST614 (sem complexo clonal atribuído) e o ST616 (*singleton*) (**Figura 7**).

Tabela 4 – Perfis de MLST de *E. faecium vanA* isolados de humanos, ambientes e alimentos.

			Perfil alélico							MLST	
Cepa	Ano	Origem	*atpA*	*ddl*	*gdh*	*purK*	*gyd*	*pstS*	*adk*	ST	CC
E. faecium 98A	1997	Clínica	5	3	21	18	6	32	3	114	S
378	1998		5	3	21	18	6	32	3	114	S
57	2008		45	43	22	44	16	20	18	858	S
320	2007		15	43	1	44	1	20	1	478	17
09	2011		15	2	1	44	1	20	1	896	17
38	2011	Rios urbanos	15	43	1	44	1	20	1	478	17
9	2011		15	43	1	44	1	20	1	478	17
28	2011		15	43	1	44	1	20	1	478	17
11	2011		15	1	1	44	1	20	1	412	17
21	2011		15	1	1	1	1	20	1	203	17
55	2004	Alimento	77	2	67	6	44	1	31	953	N
402	2005		77	2	67	6	44	16	31	954	N

Legenda: CC: complexo clonal; ST: *Sequence type*; S: *singleton*

Tabela 5 – Perfis de MLST de *E. faecalis vanA* isolados de humanos, ambientes e alimentos.

			Perfil alélico							MLST	
Cepa	Ano	Origem	*gdh*	*gyd*	*pstS*	*gki*	*aroE*	*xpt*	*yqil*	ST	CC
E. faecalis 470	1998	Hospitalar	4	6	16	4	1	1	4	9	9
82	2000		4	6	16	4	1	1	4	9	9
106	2010		12	7	3	7	6	1	5	6	2
29	2011	Rios urbanos	8	7	7	5	4	4	1	4	4
96	2004	Alimento	1	7	10	1	1	67	1	615	21
154	2005		14	2	18	10	16	2	12	59	59
438	2005		35	2	41	78	81	1	9	616	S
92	2004		9	6	75	49	11	15	61	614	N

Legenda: CC: Complexo clonal; ST: *Sequence type*; S: *singleton*

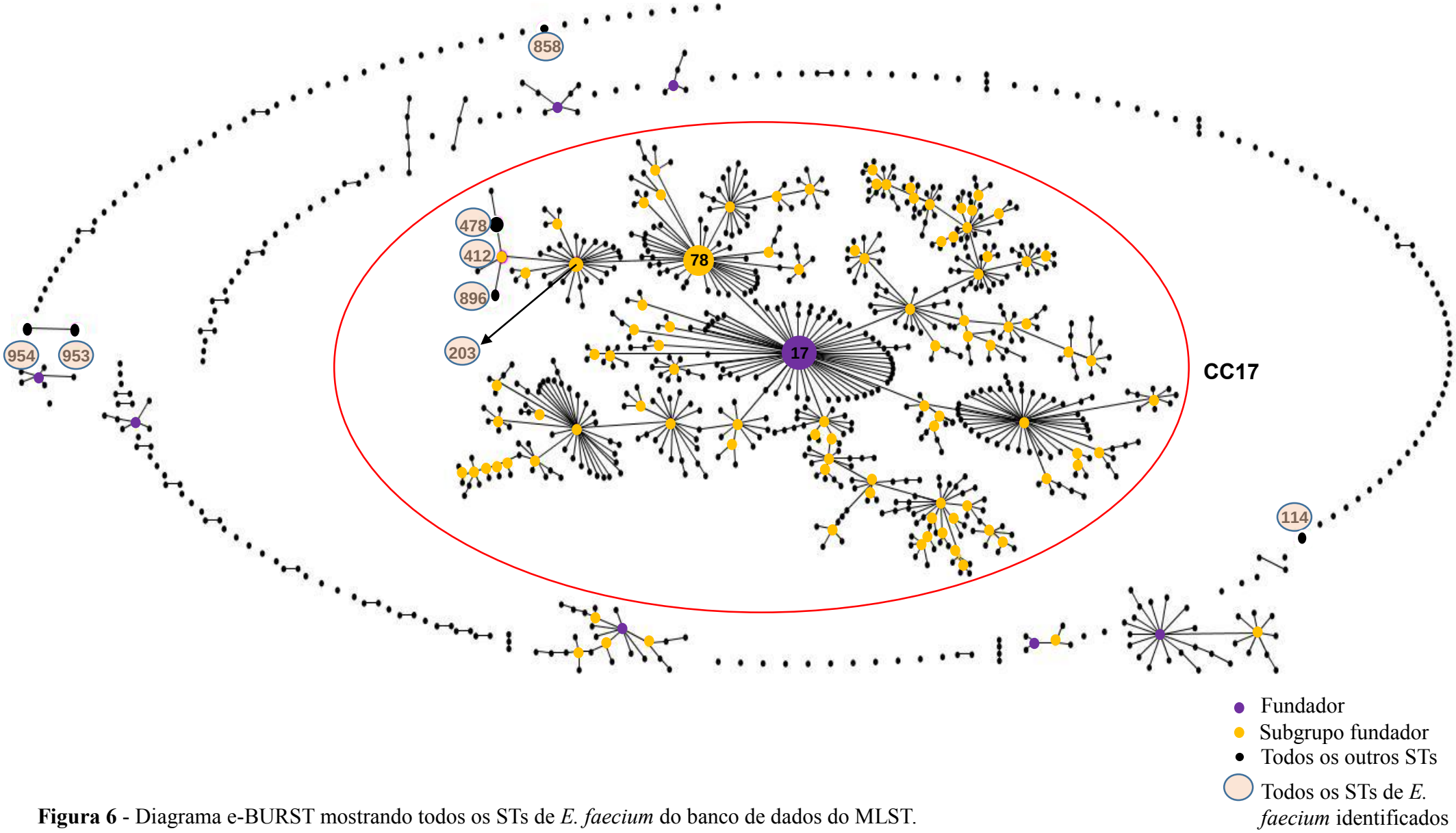


Figura 6 - Diagrama e-BURST mostrando todos os STs de *E. faecium* do banco de dados do MLST.

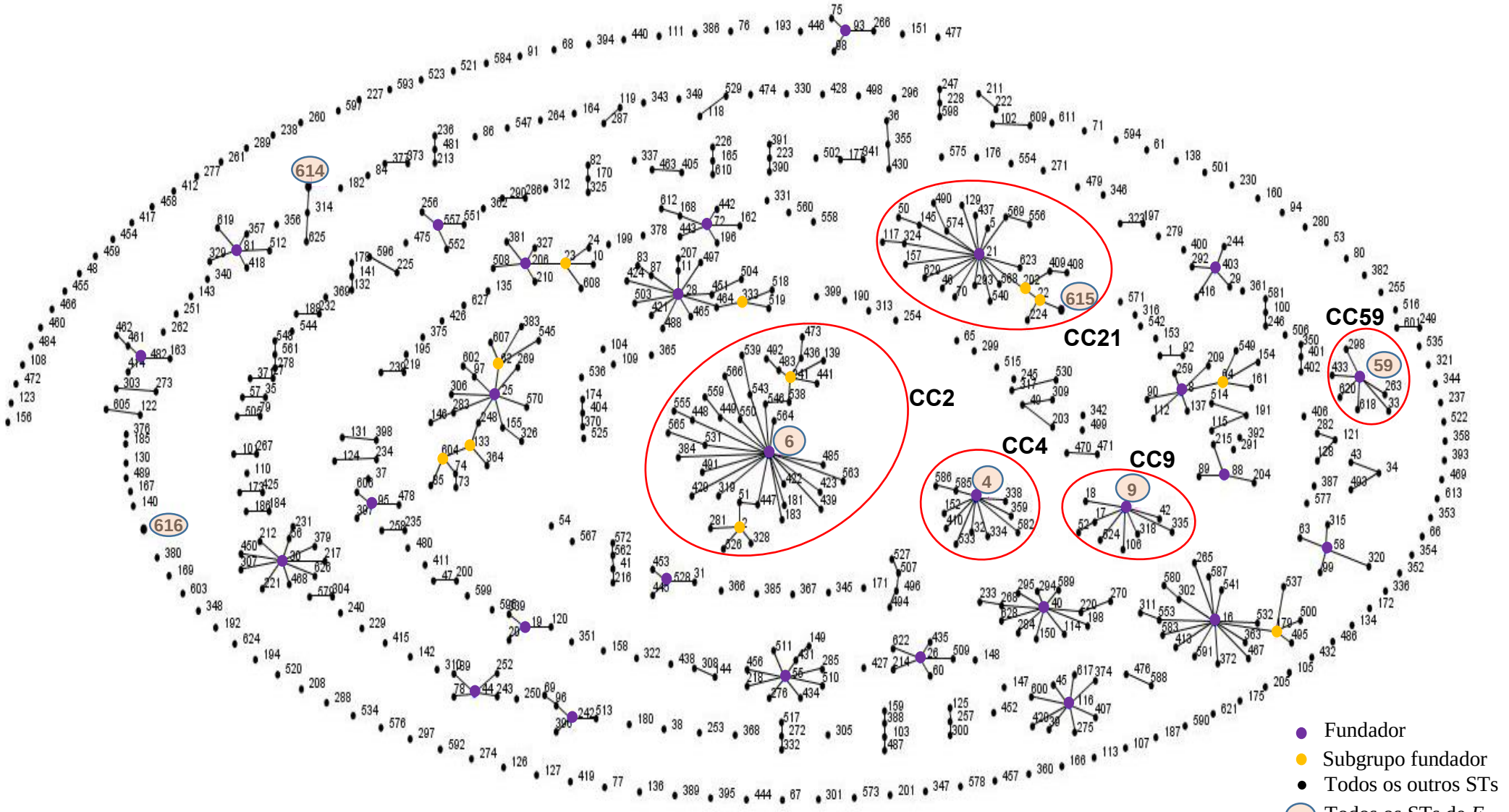


Figura 7 - Diagrama e-BURST mostrando todos os STs de *E. faecalis* do banco de dados do MLST.

As **Tabelas 6** e **7** mostram a distribuição dos tipos de PFGE e MLST e os principais genes de virulência em cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* de diferentes fontes de isolamento no Brasil durante os anos de 1997 a 2011. Os padrões de PFGE foram concordantes com os resultados de MLST para os oitos isolados de *E. faecalis.* A maioria dos *E. faecalis* isolados das três diferentes fontes apresentou diferentes pulsotipos e STs, com exceção dos *E. faecalis* 470 e 82 isolados da clínica que foram identificados com o mesmo pulsotipo (A), tipo de sequência (ST9), complexo clonal (CC9) e perfil de virulência (*gelE*$^{+}$*, esp*$^{+}$). Dentre as cepas de *E. faecium* isolados da clínica e dos rios, a maioria apresentou clones geneticamente relacionados, pertencentes ao CC17 e perfil de virulência (*acm*$^{+}$*, esp*$^{+}$).

Tabela 6 – Distribuição dos tipos de PFGE e MLST, e genes de virulência em isolados de *E. faecalis* de diferentes fontes no Brasil (1998-2011).

Epidemiologia	Nº cepa	Fonte	Amostra	Ano	Estado	Pulsotipos	ST	CC	Virulência
Clínica	470	Hospital	Swab retal	1998	SP	A	9	9	*gelE*$^+$, *esp*$^+$
	82		Sangue	2000	SP	A	9	9	*gelE*$^+$, *esp*$^+$
	106		Swab retal	2010	SP	D	6	2	*gelE*$^+$
Rio	29	Tietê	Água	2011	SP	C	4	4	*gelE*$^+$, *esp*$^+$, *cylL*$^+$
Alimento	92	Frango	Carne	2004	RS	B	614	N	*gelE*$^+$
	96		Carne	2004	RS	E	615	21	*gelE*$^+$
	154		Carne	2005	ES	F	59	59	*gelE*$^+$
	438		Carne	2005	SP	G	616	S	*gelE*$^+$

Tabela 7 - Distribuição dos tipos de PFGE e MLST e genes de virulência em isolados de *E. faecium* de diferentes fontes no Brasil (1997-2011).

Epidemiologia	Nº cepa	Fonte	Amostra	Ano	Estado	Pulsotipos	ST	CC	Virulência
Clínica	98A	Hospital	Líquor	1997	SP	O	114	S	*acm*$^+$, *esp*$^+$
	378		Sangue	1998	SP	K	114	S	*acm*$^+$, *esp*$^+$
	320		Sangue	2007	SP	H	478	17	*acm*$^+$, *esp*$^+$, *hyl*$_{efm}$$^+$
	57		Urina	2008	SP	I	858	S	*acm*$^+$, *esp*$^+$
	09		Swab retal	2011	SP	L	896	17	*acm*$^+$, *esp*$^+$, *hyl*$_{efm}$$^+$
Rios	38	Tietê	Água	2011	SP	K	478	17	*acm*$^+$, *esp*$^+$, *hyl*$_{efm}$$^+$
	9		Água	2011	SP	K	478	17	*acm*$^+$, *esp*$^+$, *hyl*$_{efm}$$^+$
	11		Água	2011	SP	H	412	17	*acm*$^+$, *esp*$^+$, *hyl*$_{efm}$$^+$
	28	Pinheiros	Água	2011	SP	H	478	17	*acm*$^+$, *esp*$^+$
	21		Água	2011	SP	J	203	17	*acm*$^+$, *esp*$^+$
Alimento	55	Frango	Carne	2004	SC	N	953	N	*acm*$^+$
	402		Carne	2005	SP	M	954	N	*acm*$^+$, *esp*$^+$

5.6 Análise do ambiente genético dos Transposons Tn*1546*

As sequências completas dos dois transposons Tn*1546* de: (*E. faecium* 320, ST478 isolados da clínica) e (*E. faecium* 11, ST412 isolado do rio) foram depositados no *DDBJ/ENA/GenBank* com os números de acesso KR349520 e KR047792, respectivamente. A análise das sequencias dos dois Tn*1546* mostrou que eles têm cerca de 12.800pb, com dois pontos de mutação: a) gene *vanA* na posição 7.698 (substituição do nucleotídeo T pelo C); e b) gene *vanX* na posição 8.234 (G pelo T). Foi detectada uma deleção de 868 pares de bases na extremidade esquerda do transposon, uma IS*1251* inserida entre os genes *vanS* e *vanH* e uma IS*1216E* entre os genes *vanX* e *vanY*. Os transposons foram comparados com o protótipo Tn*1546*, um transposon de 10.841pb (GenBank número de acesso M97297) do *Enterococcus faecium* BM4147 (**Figura 8**).

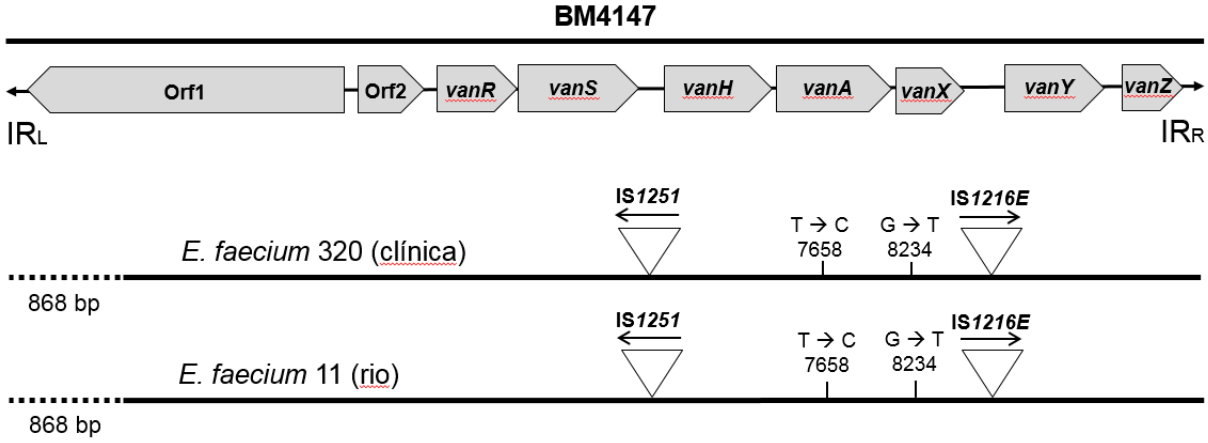


Figura 8 - Representação esquemática do protótipo Tn*1546* (acima), as deleções, mutações pontuais e as sequencias de inserções identificadas no Tn*1546* de *E. faecium* isoladas da clínica e do rio em comparação com o protótipo (abaixo).

6. DISCUSSÃO

Devido à resistência dos enterococos aos antibióticos da classe dos aminoglicosídeos e β-lactâmicos, a vancomicina foi considerada como um dos últimos recursos terapêuticos para tratar infecções enterocócicas. No entanto, no final da década de 1980 na Europa e de 90 no Brasil foram identificadas as primeiras cepas de VRE (LECLERCQ *et al*., 1988; ZANELLA *et al*., 1999). Desde então, os VRE tornaram-se endêmicos em vários hospitais brasileiros e no mundo, principalmente pelos *E. faecium* (PALAZZO *et al*., 2011; CATTOIR & LECLERCQ, 2013), embora essas bactérias também possam causar infecções humanas na comunidade (TEIXEIRA *et al*., 2007).

Dada a sua característica ubíqua, os enterococos podem sobreviver em vários ambientes, principalmente na água. Nos humanos e aves, essas bactérias são encontradas principalmente no trato gastrointestinal como comensais, mas podem se tornar sérios patógenos oportunistas. A sua transmissão em humanos pode ocorrer de forma endógena ou exógena, sendo que esta última, pode se dá, principalmente, por meio do consumo de alimentos e água contaminada, podendo se tornar uma via comum de transmissão, especialmente nos países em desenvolvimento (DEVRIESE *et al*., 1987; IVERSEN *et al*., 2004; CASTILLO-ROJAS *et al*., 2013)

A região metropolitana da cidade de São Paulo é uma área crítica do ponto de vista ambiental, bem como devido à disponibilidade de água limpa nessa região. Os Rios Tietê e Pinheiros cruzam o Estado de São Paulo e apresentam diversos reservatórios ao longo de seus cursos (**Figura 4**). Esses reservatórios são intensamente utilizados para o fornecimento de água potável, como fonte para irrigação agrícola e como locais de recreação da população (ROCHA *et al*., 2009; SUARES ROCHA *et al*., 2010). Com isso, o isolamento e identificação de cepas de VRE em cinco dos oito pontos de coleta desses rios urbanos no atual estudo, coloca-os como

potenciais fontes de colonização e/ou infecção humana, assim como para outros animais pertencentes a esse ecossistema. Outros estudos também têm identificados *Enterococcus* spp. multirresistentes em águas superficiais de rios e baías na Europa, América do Norte e Central, sugerindo grande risco à população (GRAMMENOU *et al*., 2006; ZDRAGAS *et al*., 2008; VARELA *et al*., 2013; CASTILLO-ROJAS *et al*., 2013; BESSA *et al*., 2014).

Os animais, especialmente o frango de corte, têm sido consistentemente relatados como um dos reservatórios de VRE, uma vez que o isolamento de bactérias que têm características genéticas de resistência semelhantes às cepas encontradas em humanos tem sido reportado (STOBBERINGH *et al*., 1999; TEUBER, 2001; VAN DEN BOGAARD *et al*., 2002; LEAVIS *et al*., 2006; VIGNAROLI *et al*., 2011). Esses estudos têm aumentado a hipótese de que os animais, de fato, desempenham um papel fundamental na transmissão e dispersão de VRE para a comunidade. Diante disso, este estudo identificou e caracterizou, fenotipicamente e genotipicamente, seis cepas de VRE isolados de carnes de frangos comercializados em mercados brasileiros (SACRAMENTO *et al*., 2015a), objetivando estabelecer sua relação com isolados clínicos e ambientais no Brasil.

Haja vista, a capacidade dos enterococos de se adaptar a vários ambientes e de adquirir vários determinantes de resistência a antibióticos, e aliada ao aumento da sua prevalência e de sua disseminação de multirresistência em todo o mundo, resultou na redução de drogas efetivas contra essas bactérias (ARIAS *et al*., 2010). No presente estudo, a avaliação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos mostrou resistência a três ou mais classes de antimicrobianos e a detecção do gene de resistência à vancomicina das cepas de *E. faecium* e *E. faecalis* confirmou a presença do gene *vanA*. Além dos altos níveis resistência aos glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina), as cepas isoladas de carne de frango foram resistentes a tetraciclina e as estreptograminas (quinupristina/dalfopristina). A origem de *Enterococcus* spp. contendo *vanA* pode ser justificada pelo uso maciço de macrolídeos (tilosina e espiramicina) em frangos de corte, que são utilizados para o controle de doenças respiratórias crônicas

causadas por micoplasmas e como agentes não terapêuticos para melhorar as taxas de crescimento e eficiência alimentar. Sugere-se que, o uso desses antimicrobianos poderia co-selecionar a resistência à vancomicina entre os enterococos, uma vez que os genes que codificam resistência a essas drogas têm sido localizados no mesmo plasmídeo (AARESTRUP, 2000; NILSSON, 2012).

No Brasil, o uso indiscriminado de antibióticos tem atingido áreas além da clínica humana e veterinária, tais como agronegócio e aquicultura (TEOPHILO *et al*., 2002; PAVEZ *et al*., 2009; CASELLA *et al*., 2015), culminando na emergência de bactérias resistentes amplamente disseminadas na comunidade e nos hospitais brasileiros, assim como, no estabelecimento de novos mecanismos de resistência, tendo o ambiente como uma possível fonte de disseminação (LINCOPAN *et al*., 2009; PAVEZ *et al*., 2009; DE ALMEIDA *et al*., 2014).

Os Rios Tietê e Pinheiros representam um dos principais recursos hídricos para as atividades humanas no Estado de São Paulo e constituem o habitat de diversos ecossistemas. Dessa forma, fica evidente que a principal via pela qual os antimicrobianos de uso humano e veterinário atingem as águas superficiais é mediante o esgoto proveniente das descargas de efluentes (ALEXY *et al*., 2006; KÜMMERER, 2009) ou diretamente pelos resíduos de produção (HIRSCH *et al*., 1999). De fato, um estudo conduzido por LOCATELLI e colaboradores 2010 sobre a presença de antibióticos no rio Atibaia localizado no estado de São Paulo detectou uma frequência maior do que 50% de ciprofloxacina, cefalexina, norfloxacina, trimetoprim, amoxicilina, ampicilina e sulfametoxazol em suas águas superficiais.

Sendo então, os Rios Tietê e Pinheiros suscetíveis a receber grandes cargas de antimicrobianos e compostos análogos, o atual estudo isolou e identificou cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* com altos níveis de resistência aos glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina), quinolonas (ciprofloxacina), macrolídeos (eritromicina) e penicilinas (ampicilina) em ambos os rios (SACRAMENTO *et al*., 2015a). Algumas cepas também apresentaram altos níveis de

resistência aos aminoglicosídeos (estreptomicina), tetraciclina, fenicóis (cloranfenicol), oxazolidinonas (linezolida) e estreptograminas (quinupristina/dalfopristina), semelhantes aos encontrados em alguns isolados da clínica. Neste estudo, sugere-se que ambos os rios são um *hotspot* de disseminação de genes e bactérias resistentes a antibióticos no ambiente.

Antibióticos mais recentes, como a linezolida, daptomicina e tigeciclina tiveram uma boa atividade *in vitro* contra isolados de enterococos da clínica, ambiente e alimentos, embora outros estudos reportem que a sua utilização pode ser limitada em determinados cenários clínicos e também, pelo aparecimento de resistência (ARIAS *et al*., 2007; ARIAS *et al*., 2010; DE ALMEIDA *et al*., 2014). O agente experimental oritavancina vem emergindo como uma nova alternativa para o tratamento de VRE, mas ainda carecem de ensaios clínicos. Assim, as terapias mais adequadas para o tratamento de infecções por enterococos multirresistentes continuam a se basear em observações empíricas e em resultados de estudos *in vitro* e em animais. Estudos clínicos avaliando novas estratégias, incluindo a combinação de terapias para tratar grave infecções por *E. faecium* resistente à vancomicina se fazem necessários (ARIAS *et al*., 2010).

Além da notoriedade de que os membros desse gênero têm em relação à resistência aos antibióticos, os enterococos possuem fatores de virulência que estão associados com a gravidade e duração de infecções causadas em humanos. Muitos fatores de virulência são responsáveis, por exemplo: i) pela capacidade de colonizar o trato gastrointestinal, que é o habitat normal; ii) capacidade de aderir a diversas proteínas da matriz extracelular; e iii) capacidade de aderir aos epitélios do trato urinário e da cavidade oral, e às células de rim de embrião humano (FISHER & PHILLIPS, 2009). No entanto, é provável que essas características estejam envolvidas na disseminação desses microrganismos em ambiente hospitalar, causando principalmente infecções urinárias e bacteremias. A ocorrência de marcadores moleculares de virulência foi extensivamente estudada entre enterococos da clínica (ARIAS & MURRAY, 2012), quando comparados com enterococos recuperados de alimentos

e ambientes aquáticos (SANTIAGO-RODRIGUEZ, 2013; CAMARGO *et al*., 2014). No presente estudo, os genes *acm* e *esp* estiveram presentes em todas as cepas de *E. faecium* isolados da clínica e dos rios. Estes genes são conhecidos por contribuir para a colonização do tecido do hospedeiro e para a formação de biofilme, respectivamente (ARIAS & MURRAY, 2012). Estudos sobre VRE no Brasil têm detectado o predomínio dos genes *acm* e *esp* em espécies de *E. faecium* (CAMARGO *et al*., 2006; MERLO *et al*., 2015). Em estudos conduzidos no Brasil e nos EUA, o gene hyl_{efm} foi raro entre isolados de *E. faecium vanA*, sendo encontrado em apenas 17% (CAMARGO *et al*., 2006) e em 33% (RICE *et al*., 2003), respectivamente. Estudos reportam a relação desse gene como um dos mediadores do aumento da virulência de megaplasmídeos de cepas de *E. faecium* com maior capacidade de colonizar o trato gastrointestinal de camundongos (RICE *et al*., 2009; FREITAS *et al*., 2010).

No atual estudo, o gene *gelE* (protease gelatinase) foi detectado apenas nas cepas de *E. faecalis*, corroborando com achados de outros estudos (DUPRE *et al*., 2003; CAMARGO *et al*., 2006). Sugere-se que o *gelE* media virulência por meio de mecanismos, tais como, a degradação de tecidos do hospedeiro, modulação da resposta imune do hospedeiro e formação de biofilme (PARK *et al*., 2008; THOMAS *et al*., 2009). A citolisina-hemolisina (*cyl*) é uma toxina produzida por aproximadamente 30% das cepas de *E. faecalis*, que pode lisar as células vermelhas e brancas do sangue de humanos (ARIAS & MURRAY, 2012). Isolados de *E. faecalis* que expressam *cyl* são mais virulentas em vários modelos animais do que cepas sem este gene (IKE *et al*., 1984). Esse gene foi detectado em apenas uma cepa *E. faecalis* isolada do Rio Tietê. Um estudo realizado na Malásia detectou predominantemente o gene *cyl* em enterococos isolados de rios (AHMAD *et al*., 2014). O atual estudo identificou importantes genes de virulência de cepas de enterococos isolados de diferentes fontes. No entanto, novos estudos pesquisando outros genes de virulência e suas expressões se fazem necessários para melhor compreensão da virulência destes patógenos em ambientes ecológicos distintos.

A tipagem eficaz de microrganismos é um pré-requisito para se estabelecer vínculos epidemiológicos ou filogenéticos entre isolados correspondentes. Diversos métodos têm sido aplicados com sucesso para tipar e diferenciar cepas bacterianas e grupos clonais (WITTE *et al*., 2006). No presente estudo, as cepas de *E. faecalis* foram clonalmente não relacionadas pelo PFGE quando comparadas com as diferentes fontes de isolamento, enquanto que cepas de *E. faecium* isoladas da clínica e do ambiente apresentaram clones idênticos. Um estudo realizado na Grécia identificou cepas de *E. faecium* isoladas de água potável e para fins recreativos que apresentaram-se clonalmente relacionadas pelo PFGE com *Enterococcus* spp de origem hospitalar, sugerindo uma possível origem comum (GRAMMENOU *et al*., 2006).

A análise de MLST do presente estudo confirmou a disseminação ambiental do clone multirresistente de alto risco de *E. faecium vanA* CC17 (ST478, ST412 e ST203), que em estudos prévios foram predominantes em amostras clínicas do Sudeste do Brasil (PALAZZO *et al.*, 2011; SILVA *et al*., 2012; MERLO *et al*, 2015). De acordo com a análise do eBURST, os ST478, ST412 e ST203 mostraram-se TLV (*triple-locus variants*), DLV (*double-locus variants*) e SLV (*single-locus variant*) do ST78, respectivamente. Estes STs podem ser descendentes diretos ou ter evoluído de um ancestral comum que está intimamente ligado ao ST78. De acordo com a literatura e informações depositadas no banco de dados do MLST de *E. faecium*, vários países da Europa, Ásia e América já identificaram enterococos com ST78 em pacientes hospitalizados (KO *et al*., 2005; QU *et al*., 2007; WERNER *et al*., 2008, 2011; HSIEH *et al.*, 2010; KHAN *et al*., 2010; FALLICO *et al.*, 2011; SILVA *et al*, 2012).

A detecção de cepas de *E. faecium vanA* pertencentes ao CC17 em rios urbanos é uma evidência epidemiológica que demonstra que a disseminação ambiental de bactérias multirresistentes de alto risco está em curso no Brasil. Digno de nota, o isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* co-produção de metalo-β-lactamase SPM-1 e 16S rRNA metilase RmtD1 e KPC-2 produtoras de *Klebsiella pneumoniae* em ambos os rios Tietê e Pinheiros também foi reportado (FONTES *et al*., 2011, OLIVEIRA *et al*., 2013). Com isso, há que se

considerar, que os rios urbanos do Brasil podem representar uma potencial fonte de colonização e/ou infecção humana. Por fim, considerando que o *E. faecium* CC17 *vanA* é comum em hospitalares do estado de São Paulo (CAMARGO *et al*., 2006; PALAZZO *et al.*, 2011; SILVA *et al*., 2012), especulações sobre uma possível ligação entre infecções nosocomiais e ambientais poderiam ser levantadas, o que demonstra o potencial de VRE *vanA* de se espalhar para outros sítios, além do hospitalar. A vigilância da resistência em amostras ambientais de regiões urbanas precisa ser estabelecida como uma prioridade, e as estratégias para o tratamento de águas residuais precisam ser adotadas, a fim de inibir a liberação de bactérias multirresistentes de alto risco para o meio ambiente.

As cepas isoladas de carne frango revelou a presença de *E. faecalis vanA* ST59 (CC59) e de cinco novos STs (*E. faecalis vanA* ST614, ST615 e ST616 e *E. faecium vanA* ST953 e ST954). A este respeito, de particular interesse é a descrição de *E. faecalis* pertencentes ao ST59, que tem sido previamente isoladas de carne de frango e amostras humanas (QUIÑONES *et al*., FREITAS *et al*., 2009; OLSEN *et al*., 2012). Ainda, a análise eBURST revelou o ST615 como pertencente ao CC21, um complexo clonal bastante documentado em isolados clínicos, de animais e alimentos (JAMET *et al*., 2012; NOVAIS *et al*., 2013 CHOWDHURY *et al*., 2014), o que denota o potencial dos VRE ou dos genes *vanA* de enterococos para alcançar os seres humanos através da cadeia alimentar (CETINKAYA *et al*., 2000; GOUSIA *et al*., 2015). Por outro lado, a identificação de novos STs, neste estudo, sugere que o frango comercial pode ser uma fonte para a transferência de resistência mediada por *vanA* entre enterococos comensais, o que é uma perspectiva preocupante, uma vez que VRE de origem comensais podem desempenhar um importante papel como patógenos oportunistas em humanos e em outros animais, que podem atuar como hospedeiros (SACRAMENTO *et al*., 2015b).

Em um estudo realizado por LEBRETON e colaboradores (2013) foram sequenciados os genomas de 51 enterococos isolados de diferentes ambientes ecológicos localizados em cinco continentes ao longo dos últimos 60 anos, a fim de compreender como os *E. faecium* emergiram

como um importante patógeno hospitalar. Por meio de reconstrução filogenômica, os pesquisadores desse estudo sugerem que a linhagem epidêmica adaptada ao hospital está evoluindo rapidamente, e que surgiu há aproximadamente 75 anos, concomitantemente com a introdução de antibióticos, a partir de uma população que incluiu a maioria das cepas de origem animal, e não de comensais humanos. Além disso, foi observado que a linhagem que incluiu a maioria das cepas de origem animal divergiu da principal linhagem comensal humana de cerca de 3.000 anos atrás, possivelmente devido à crescente urbanização dos seres humanos, desenvolvimento práticas de higiene e domesticação de animais. Cada bifurcação foi acompanhada da aquisição de novas capacidades metabólicas, traços de colonização em elementos móveis, e perda de função e remodelação do genoma associada à inserção de elemento móvel (LEBRETON *et al*., 2013).

No atual estudo, entre os isolados de *E. faecium* da clínica foi identificado um novo ST denominado ST858, além do ST114, previamente reportado por Camargo e colaboradores (2006) em surto ocorrido em hospital de São Paulo. Além do ST114, os ST478 e ST896 já reportados no Brasil e nos EUA, respectivamente, também foram identificados (PALAZZO *et al.*, 2011; SILVA *et al*., 2012; WANG *et al*., 2014).

A capacidade de distinguir com precisão diferentes cepas dentro de uma espécie bacteriana é um requisito fundamental para estudos de vigilância epidemiológica e microevolutivo. A grande diversidade genética presente em muitas espécies bacterianas tem originado vários métodos de tipagem que variam em sua reprodutibilidade e poder discriminatório (COOPER & FEIL, 2004). No presente estudo, a comparação das duas técnicas de tipagem molecular mostrou que os padrões de PFGE foram concordantes com os resultados de MLST nos isolados de *E. faecalis*, enquanto que algumas cepas de *E. faecium* apresentaram perfis de PFGE diferentes com MLST iguais ou virce e versa (**Tabela 6**). Comparações são frequentemente feitas entre os resultados de MLST e PFGE. Muitos estudos revelam níveis semelhantes de discriminação entre essas técnicas (PEACOCK *et al*., 2002;

NALLAPAREDDY *et al*., 2002; JOHNSON *et al*., 2003; GODOY *et al*., 2003). No entanto, em outros estudos, verificou-se que o MLST foi mais discriminatório (KOTETISHVILI *et al*., 2002, 2003; REVAZISHVILI *et al*., 2004), enquanto NOLLER e colaboradores (2003) demonstrou que o MLST não fez distinção entre cepas de *Escherichia coli* O157: H7, as quais foram diferenciadas pelo PFGE. Embora tais comparações possam proporcionar um indicador útil para epidemiologistas que monitoram a propagação de clones específicos, o poder desses métodos, em geral, dependerá dos detalhes dos protocolos (por exemplo, enzimas de restrição utilizadas no PFGE ou local do gene pesquisado no MLST). Além disso, ao passo que o MLST examina diretamente a diversidade de sequências de nucleotídeos, não detecta rearranjos genômicos em larga escala, enquanto que o PFGE é mais sensível a este último tipo de variação e assim, será, por conseguinte, mais discriminatório em espécies com muitas ilhas genômicas, sequências de inserção ou outros elementos móveis. Uma segunda vantagem do PFGE, refere-se à possibilidade de ser prontamente realizado na ausência de informação detalhada sobre o genoma bacteriano (COOPER *et al*., 2004).

O valor do MLST, como originalmente concebido, está na criação de uma estrutura abrangente de populações bacterianas com base em múltiplos genes estáveis. Para as espécies contendo uma considerável diversidade, esse método tem grande valia, tanto para a tipagem de rotina quanto para análises evolutivas. Uma vez que os custos das reações de sequenciamento vêm diminuindo nos últimos anos, estudos incluindo mais *locus* altamente variável tendem a serem conduzidos, facilitando assim, a subtipagem de alta resolução de clones específicos e a reconstrução de vias da evolutivas mais robusta (COOPER *et al*., 2004).

Um ponto crítico para ambos os métodos citados é a sua aplicabilidade para responder questões distintas que variam desde a investigação de surtos estabelecendo amplo parentesco genético, até a organização de cepas dentro dos principais complexos clonais. Cada método tem seus respectivos pontos fortes e fracos de acordo com a pergunta abordada e a metodologia por

trás (MAIDEN *et al*., 1998; ENRIGHT & SPRATT, 1999; URWIN & MAIDEN, 2003; BENNETT & CAFFERKEY, 2003).

O Tn*1546*, um transposon do *cluster vanA* presente no plasmídeo pIP816 do *E. faecium* BM4147, foi primeiramente reportado em 1993 (ARTHUR *et al*., 1993). Desde então, esse transposon tornou-se cada vez mais diversificado devido a mutações pontuais, a introdução de sequências de inserção (IS) e a deleções de genes nas extremidades esquerda e/ou direita do Tn*1546* (HANDWERGER *et al*., 1995; WILLEMS *et al*., 1999; KO *et al*., 2005; NAAS *et al*., 2005; GU *et al*., 2009; CHA *et al*., 2012; MERLO *et al*., 2015). No presente estudo, tipos idênticos de Tn*1546* foram encontrados em isolados de humano (ST478) e de ambiente aquático (ST412), caracterizados como clones endêmicos no Brasil (SACRAMENTO *et al*., 2015a). Foi identificado um ponto de mutação no gene *vanA* na posição 7.698 (substituição do nucleotídeo T pelo C) e um outro no gene *vanX* na posição 8.234 (G pelo T). A presença dessas mutações já foram reportadas no Brasil, EUA e Espanha (WILLEMS *et al*., 1999; CAMARGO *et al*., 2004; LÓPEZ *et al*., 2010). Ainda, nos dois transposons sequenciados no presente estudo, foram detectadas uma IS*1251* inserida entre os genes *vanS* e *vanH,* uma IS*1216E* entre os *vanX* e *vanY* e uma deleção na sua extremidade esquerda, sem apresentar alteração no fenótipo de resistência aos glicopeptídeos.

A IS1*251* foi detectada na mesma região intergênica, especialmente nos elementos *VanA* de cepas isoladas nos Estados Unidos (HANDWERGER *et al*., 1995; DE LENCASTRE *et al*., 1999), como também em raros isolados da Irlanda, Noruega, Grécia e Costa Rica (SIMONSEN *et al*., 2000; DEMERTZI *et al*., 2001; BUSTAMANTE *et al*., 2003). No Brasil, essa IS foi reportada pela primeira vez em 2004 em um elemento VanA de VRE, isolado de um paciente previamente tratado nos EUA, sugerindo que este VRE foi introduzido a partir do estrangeiro, provavelmente através da disseminação inter-hospitalar (CAMARGO *et al*., 2004). Essa IS também foi detectada durante um surto ocorrido em 2007 em um hospital universitário de Campinas, seguido por detecções em hospitais de Ribeirão Preto e Belo Horizonte

(PALAZZO *et al*., 2011; SILVA *et al*., 2012; MERLO *et al*., 2015). Diferentemente, a IS*1216E,* recentemente identificada por Merlo e colaboradores (2015) na maioria dos seus isolados de *E. faecium vanA* na mesma região intergênica (*vanS* e *vanH*), assim como no presente estudo. Essa IS até então não havia sido reportada nesta posição em *cluster van* de *E. faecium* em todo o mundo.

O Tn*1546* pode conter vários tipos de ISs, incluindo IS*1542*, IS*1251*, IS*Efa5*, IS*1476* e IS*19*, que são diversificadas regionalmente e têm sido caracterizadas a partir de isolados da Europa, Coréia, EUA e Brasil (HANDWERGER *et al*., 1995; WILLEMS *et al*., 1999; CAMARGO *et al*., 2005; CHA *et al*., 2012). Por outro lado, a IS*1216V* tem sido identificada em isolados de VRE em todo o mundo (HANDWERGER *et al*., 1995; WILLEMS *et al*., 1999; CAMARGO *et al*., 2005; CHA *et al*., 2012). Múltiplos locais de inserção apontam que esses elementos são ativamente móveis, cruciais para a evolução do ambiente genético do gene *vanA*. Infelizmente, o papel das ISs na diversificação do ambiente genético do *vanA* diminui o seu valor como marcador epidemiológico, uma vez que o movimento dessas ISs resulta em alteração estrutural do transposon, acarrentando uma baixa reprodutibilidade na tipagem. Embora isso possa não afetar estudos evolutivos ou epidemiológicos "instantâneos", os estudos de longo prazo devem ser interpretados com considerável cautela.

A este respeito, no atual estudo foi identificado o mesmo tipo de transposon encontrado por Merlo e colaboradores (2015) em 46 dos 47 *E. faecium vanA* em Belo Horizonte, Minas Gerais. Uma vez que é provável que a inserção da IS*1216E* no Tn*1546* foi um evento único, com padrão distinto do *cluster van* de outros isolados de VRE já estudados, pode-se constituir uma oportunidade para o estudo epidemiológico da propagação deste tipo de transposon de resistência em nosso país. Com relação ao ambiente genético do *cluster van*, este estudo confirma a presença dessa sequência de inserção, que até o presente momento, foi identificada em cepas brasileiras de *E. faecium*. De fato, a sequência IS*1216E* foi previamente reportada por Merlo e colaboradores em 2015 e curiosamente, neste contexto genético, não tem sido reportado

em outros países. Assim, muito provavelmente isolados brasileiros incorporaram recentemente esta IS.

A IS*1216E* tem sido associada com os genes *tcrB* e *aadE* que conferem resistência ao cobre e aminoglicosídeos, em *E. faecium* e *Streptococcus agalactiae*, respectivamente (HASMAN, 2005; MONTILLA *et al*., 2014). Portanto, essa IS deve contribuir para a rápida aquisição de resistência antimicrobiana entre as espécies de cocos Gram-positivos clinicamente importante (PAULSEN *et al*., 2003).

Os tipos de Tn*1546* indistiguíveis que foram identificados no atual estudo isolados de humano e ambientes aquáticos sugerem uma comum partilha de um *pool* de genes de resistência à vancomicina entre enterococos isolados de diferentes ecossistemas (SACRAMENTO *et al*., 2015a). Além disso, esses transposons apresentaram uma deleção na região de repetição, importante para a sua mobilidade, e portanto, é provável, que para a sua transposição seja necessário um plasmídeo para se deslocar de uma linhagem para outra. Um recente estudo realizado no Brasil com 47 *E. faecium*, todas as cepas possuiam plasmídeos de 35, 60 ou 75 Kb contendo o gene *vanA*, com exceção de uma cepa que não hibridizou com a sonda *vanA*, sugerindo que o transposon contendo *vanA* possa estar no cromossomo (MERLO *et al*., 2015).

Em resumo, no atual estudo foi documentada pela primeira vez, a identificação de VRE tipo *vanA* com novos STs em carne de frango comercializada no Brasil. A detecção precoce de VRE em amostras de frango pode ajudar na implementação de medidas preventivas que visem reduzir a contaminação, sendo muito útil para o país, que é o terceiro maior produtor de carne de frango e o maior exportador deste produto no mundo (ALVES *et al*., 2012). Além disso, a detecção de cepas de *E. faecium* contendo *vanA* pertencentes ao CC17 em amostras de águas superficiais em rios urbanos indica a disseminação ambiental de bactérias multirresistentes e virulentas, assim como seus elementos que compõe o ambiente genético do gene *vanA*. Infecções por VRE na comunidade ainda são raras no Brasil, e com o conhecimento

de que existem VRE em hospitais e nesses rios, medidas devem ser tomada para evitar a sua propagação para a esfera da comunidade.

7. CONCLUSÕES

- Nas amostras clínicas, de alimentos e de água superficial coletada de rios urbanos em São Paulo foram identificadas cepas de *E. faecium* (*n*= 12) e de *E. faecalis* (*n*= 8) resistentes à vancomicina.

- As cepas de *E. faecium* e *E. faecalis* resistentes à vancomicina apresentaram um perfil de multirresistência. As cepas clínicas mostraram resistência aos glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina), quinolonas (ciprofloxacina) e macrolídeos (eritromicina). Os isolados ambientais, além das resistências acima citadas, foram resistentes às penicilinas (ampicilina), enquanto que as cepas de alimentos foram resistentes aos glicopeptídeos, tetraciclina e as estreptograminas (quinupristina/dalfopristina).

- A presença do gene *vanA* foi identificada em todas as cepas de *E. faecium* e *E. faecalis*, resistentes aos glicopeptídeos, estudadas.

- Cepas de *E. faecium* isoladas da clínica e do ambiente apresentaram os fatores de virulência em comum acm^{+} e esp^{+}. O gene *gel*E foi identificado em todas as cepas de *E. faecalis*, mostrando que esse gene pode estar intimamente ligado a esta espécie.

- A maioria das cepas de *E. faecium* isoladas de hospitais e rios urbanos de São Paulo apresentaram clones indistinguíveis pelo PFGE.

- Foram isolados *E. faecium vanA* pertencentes ao complexo clonal 17 (ST203, ST412 e ST478) em rios de São Paulo idênticos a clones endêmicos de hospitais.

- Foram detectados novos STs de *E. faecalis* (ST614, ST615, ST616) e de *E. faecium* (ST953, ST954) em carne de frango comercializada no Brasil.

- A análise do ambiente genético do *cluster* do gene *vanA* (transposon Tn*1546*) dos dois isolados de *E. faecium* da clínica e do rio mostrou que ambas as cepas foram indistinguíveis, que apresentaram dois pontos de mutação nos genes *vanA* e *vanX*, uma deleção na extremidade esquerda do transposon, uma IS*1251* inserida entre os genes *vanS* e *vanH* e uma IS*1216E* entre os genes *vanX* e *vanY*.

- A IS*1216E* na região intergênica *vanXY* constitui um conjunto de genes previamente relatado em cepas clínicas de VREfm no Brasil, denotando uma característica regional.

- A presença da IS*1216E*, sugere uma propensão do *E. faecium* em incorporar elementos que podem contribuir para a rápida aquisição de resistência a compostos antimicrobianos, determinantes os quais podem chegar a ser disseminados para outras linhagens e/ou gêneros.

8. REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F.M. Characterization of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* (GRE) from broilers and pigs in Denmark: genetic evidence that persistence of GRE in pig herds is associated with coselection by resistance to macrolides. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.2774-2777, 2000.

ACAR, J.; CASEWELL, M.; FREEMAN, J.; FRIIS, C.; GOOSSENS, H. Avoparcin and virginiamycin as animal growth promoters: a plea for science in decision-making. **Clinical Microbiology and Infection**, v.6, p.477-482, 2000.

AGUIRRE, M.; COLLINS, M.D. Lactic acid bacteria and human clinical infection. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, p.95-107, 1993.

AHMAD, A.; DADA, A.C.; USUP, G.; HENG, L.Y. Occurrence of *Enterococcus* species with virulence markers in an urban flow-influenced tropical recreational beach. **Marine Pollution Bulletin**, v.82, n.1-2, p.26-38, 2014.

ALEXY, R.; SOMMER, A.; LANGE, F.T.; KÜMMERER, K. Local use of antibiotics and their input and fate in a small sewage treatment plant: Significance of balancing and analysis on a local scale vs. nationwide scale. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, v.34, p.587-592, 2006.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W., MILLER, W.; MYERS, E.W; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410, 1990.

ANDERSON, K.L.; WHITLOCK, J.E.; HARWOOD, V.J. Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.3041-3048, 2005.

ANDREWS, W.H.; HAMMACK, T.S. Chapter I, Food sampling and preparation of 95 sample homogenate. In: Bacteriological analytical manual online. U.S. Food and 96 Drug Administration, Silver Spring, MD. Publicado em Abr. 2003. Disponível em: http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063335.htm. Acesso em: 04 abr. 2015.

BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A.A.; DVORKIN, M.; KULIKOV, A.S.; LESIN, V.M.; NIKOLENKO, S.I.; PHAM, S.; PRJIBELSKI, A.D.; PYSHKIN, A.V.; SIROTKIN, A.V.; VYAHHI, N.; TESLER, G.; ALEKSEYEV, M.A.; PEVZNER, P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **J Comput Biol**, v. 19, n. 5,p.455-77, 2012

ARIAS, C.A.; CONTRERAS, G.A.; MURRAY, B.E. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v.16, n.6, p.555-562, 2010.

ARIAS, C.A.; MURRAY, B.E. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v.10, n.4, p.266-278, 2012.

ARIAS, C.A.; TORRES, H.A.; SINGH, K.V.; PANESSO, D.; MOORE, J.; WANGER, A.; MURRAY, B.E. Failure of daptomycin mono-therapy for endocarditis caused by an Enterococcus faecium strain with vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible subpopulations and evidence of in vivo loss of the vanA gene cluster. **Clinical Infectious Diseases**, v.10, p.1343-1346, 2007.

ARIAS, C.A.; MURRAY, B.E. Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v.6, p.637-655, 2008.

ARIAS, C.A.; MURRAY, B.E. In: Harrison's Principles of Internal Medicine (eds Longo, D. L. *et al*.) McGraw Hill, New York, p.1180-1186, 2011.

ARIAS, C.A.; PANESSO, D.; SINGH, K.V.; RICE, L.B.; MURRAY, B.E. Cotransfer of antibiotic resistance genes and a *hyl*Efm-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.4240-4246, 2009.

ARTHUR, M.; DEPARDIEU, F.; GERBAUD, G.; GALIMAND, M.; LECLERCQ, R.; COURVALIN P. The VanS sensor negatively controls VanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction. **Journal of Bacteriology**, v.179, p.97-106, 1997.

ARTHUR, M.; MOLINAS, C.; DEPARDIEU, F; COURVALIN, P. Characterization of Tn*1546*, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. **Journal of Bacteriology**, v.175, p.117-127, 1993.

AZIZ, R.K.; BARTELS, D.; BEST, A.A.; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R.A.;

FORMSMA, K.; GERDES, S.; GLASS, E.M.; KUBAL, M.; MEYER, F.; OLSEN, G.J.; OLSON, R.; OSTERMAN, A.L.; OVERBEEK, R.A.; MCNEIL, L.K.; PAARMANN, D.; PACZIAN, T.; PARRELLO, B.; PUSCH, G.D.; REICH, C.; STEVENS, R.; VASSIEVA, O.; VONSTEIN, V.; WILKE, A.; ZAGNITKO, O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, v.9, p.75, 2008.

BAGER, F.; AARESTRUP, F.M.; MADSEN, M.; WEGENER, H.C. Glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from broilers and pigs following discontinued use of avoparcin. , **Microbial Drug Resistance**, v.5, p.53-6, 1999.

BATES, J.; JORDENS, Z.; SELKON, J.B. Evidence for an animal origin of vancomycin-resistant enterococci. **Lancet**, v.342, p.490-491, 1993.

BATISTA XAVIER, D.; MORENO BERNAL, F.E.; TITZE-DE-ALMEIDA, R. Absence of VanA- and VanB-containing enterococci in poultry raised on nonintensive production farms in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.4, p.3072-3073, 2006.

BATISTÃO, D.W.; GONTIJO-FILHO, P.P.; CONCEIÇÃO, N.; OLIVEIRA, A.G.; RIBAS, R.M. Risk factors for vancomycin-resistant enterococci colonisation in critically ill patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107, n.1, p.57-63, 2012.

BENNETT, D.E.; CAFFERKEY, M.T. Multilocus restriction typing: a tool for *Neisseria meningitidis* strain discrimination. **Journal of Medical Microbiology**, v.52, p.781-787, 2003.

BERCHIERI A. Intestinal colonization of a human subject by vancomycin-resistant Enterococcus faecium. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, v.5, p.97100, 1999.

BESSA, L.J.; BARBOSA-VASCONCELOS, A.; MENDES, A.; VAZ-PIRES, P.; MARTINS DA COSTA, P. High prevalence of multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in river water, upstream and downstream of a wastewater treatment plant. **Journal of Water and Health**, v.12, n.3, p.426-435, 2014.

BOLANO, A.; STINCHI, S.; PREZIOSI, R.; BISTONI, F.; ALLEGRUCCI, M.; BALDELLI, F.; MARTINI, A.; CARDINALI, G. Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research**, v.1, p.221-224, 2001.

BOOTH, M.C.; BOGIE, C.P.; SAHL, H.G.; SIEZEN, R.J.; HATTER, K.L.; GILMORE, M.S. Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel

lantibiotic. **Molecular Microbiology**, v.21, p.1175-1184, 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6 : Detecção e identificação de bactérias de importância médica. Brasília/DF, v.9, 150p., 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Ministério da Saúde. Relatório do monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isoladas de carcaças de frangos congeladas comercializadas no Brasil. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF), 1.ed, Brasília/DF, 186p., 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Lista de aditivos autorizados uso na alimentação animal no Brasil. Atualizada em 25 abr 2015. [acesso 2015 jun 16]. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/animal/alimentacao/aditivos/aditivos-autorizados].

BUSTAMANTE, W.; ALPÍZAR, A.; HERNÁNDEZ, S.; PACHECO, A.; VARGAS, N.; HERRERA, M.L.; VARGAS, A.; CABALLERO, M.; GARCÍA, F. Predominance of *vanA* genotype among vancomycin-resistant *Enterococcus* isolates from poultry and swine in Costa Rica. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.12, p.7414-7419, 2003.

BUTAYE, P.; DEVRIESE, L.A.; HAESEBROUCK, F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.2, p.175-188, 2003.

BYAPPANAHALLI, M.N.; NEVERS, M.B.; KORAJKIC, A.; STALEY, Z.R.; HARWOOD, V.J. Enterococci in the environment. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.76, n.4, p.685-706, 2012.

CABELLI, V.J.; DUFOUR, A.P.; LEVIN, M.A.; MCCABE, L.J.; HABERMAN, P.W. Byappanahalli *et al*. Relationship of microbial indicators to health effects at marine bathing beaches. **American Journal of Public Health**, v.69, p.690-696, 1979.

CAMARGO, C.H.; BRUDER-NASCIMENTO, A.; LEE, S.H.; JÚNIOR, A.F.; KANENO, R.; RALL, V.L. Prevalence and phenotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated from food in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, n.1, p.111-115, 2014.

CAMARGO, I.L.; DEL PELOSO, P.F.; DA COSTA LEITE, C.F.; GOLDMAN, G.H.; DARINI,

A.L. Identification of an unusual VanA element in glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* in Brazil following international transfer of a bone marrow transplant patient. **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, n.9, p.767-770, 2004.

CAMARGO, I.L.; GILMORE, M.S.; DARINI, A.L. Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, n.11, p.1123-1130, 2006.

CAMARGO, I.L.; ZANELLA, R.C.; GILMORE, M.S.; DARINI, A.L. Virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin- susceptible *Enterococcus faecalis* from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, n.2, p.273-278, 2008.

CAMPOS, P.A.; BATISTÃO, D.W.; GONTIJO-FILHO, P.P.; RIBAS, R.M. A sustained endemic outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: A 30-month surveillance study. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.46, n.8, p.547-554, 2014.

CARATTOLI A. Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, p.117-123, 2008.

CASELLA, T.; RODRÍGUEZ, M.M.; TAKAHASHI, J.T.; GHIGLIONE, B.; DROPA, M.; ASSUNÇÃO, E.; NOGUEIRA, M.L.; LINCOPAN, N.; GUTKIND, G.; NOGUEIRA, M.C. Detection of blaCTX-M-type genes in complex class 1 integrons carried by Enterobacteriaceae isolated from retail chicken meat in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.197, p.88-91, 2015.

CASTILLO-ROJAS, G.; MAZARI-HIRÍART, M.; PONCE DE LEÓN, S.; AMIEVA-FERNÁNDEZ, R.I.; AGIS-JUÁREZ, R.A.; HUEBNER, J.; LÓPEZ-VIDAL, Y. Comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from water and clinical samples: antimicrobial susceptibility and genetic relationships. **PLoS One**, v.8, n.4, e59491, 2013.

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

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Nosocomial enterococci resistant to vancomycin in the United States, 1989-1993. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.42,

n.30, p.597-599, 1993.

CEREDA, R.F.; GALES, A.C.; SILBERT, S.; JONES, R.N.; SADER, H.S. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Brazil. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v.23, n.1, p.19-22, 2002.

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C.G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.4, p.686-707, 2000.

CHA, J.O.; YOO, J.I.; KIM, H.K.; KIM, H.S.; YOO, J.S.; LEE, Y.S.; JUNG, Y.H. Diversity of Tn1546 in vanA-positive *Enterococcus faecium* clinical isolates with VanA, VanB, and VanD phenotypes and susceptibility to vancomycin. **Journal of Applied Microbiology**. v.115, n.4, p.969-976, 2013.

CHA, J.O.; JUNG, Y.H.; LEE, H.R.; YOO, J.I.; LEE, Y.S. Comparison of genetic epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from human and poultry. Journal of Medical Microbiology, v.61, p.1121-1128, 2012.

CHEVREUX, B.; WETTER, T.; SUHAI, S. Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information, p 45–56. In Computer science and biology. Proceedings of the German Conference on Bioinformatics, GCB ‘99. GCB, Hannover, Germany, 1999.

CHOWDHURY, S.A.; NALLAPAREDDY, S.R.; ARIAS, C.A.; MURRAY, B.E. The majority of a collection of U.S. endocarditis *Enterococcus faecalis* isolates obtained from 1974 to 2004 lack capsular genes and belong to diverse, non-hospital-associated lineages. J**ournal of Clinical Microbiology**, v.52, n.2, p.549-556, 2014.

CLARK, N.C.; COOKSEY, R.C.; HILL, B.C.; SWENSON, J.M.; TENOVER, F.C. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.37, p.2311-2317, 1993.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. CLSI document M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2014.

CONCEIÇÃO, N.; DA SILVA, L.E.; DARINI, A.L.; PITONDO-SILVA, A.; DE OLIVEIRA, A.G. Penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* of hospital origin: pbp4 gene polymorphism and genetic diversity. **Infection, Genetics and Evolution**, v.28, p.289-295, 2014.

COOPER, J.E,; FEIL, E.J. Multilocus sequence typing - what is resolved? **Trends in Microbiology**. v.12, n.8, p.373-377, 2004.

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

CORREA, A.A.; PIGNATARI, A.C.; DA SILVEIRA, M.; MINGONE, R.C.; DE SALES OLIVEIRA, V.G.; FORTALEZA, C.M. Small hospitals matter: insights from the emergence and spread of vancomycin-resistant enterococci in 2 public hospitals in inner Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.82, n.3, p.227-233, 2015.

COSTA, L.M.D.; SOUZA, D.C.; MARTINS, L.T.F.; ZANELLA R.C.; BRANDILEONE, M.C.C.; BOKERMANN, S.; SADER, H.S.; SOUZA, H.A. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.2, p.160-163, 1998.

D'Costa, V.M.; King, C.E.; Kalan, L.; Morar, M.; Sung, W.W.; Schwarz, C.; Froese, D.; Zazula, G.; Calmels F.; Debruyne, R.; Golding, G.B.; Poinar, H.N.; Wright, G.D. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v.477p.457-461, 2011.

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

DA SILVA, N.S.; MUNIZ, V.D.; ESTOFOLETE, C.F.; FURTADO, G.H.; RUBIO, F.G. Identification of temporal clusters and risk factors of bacteremia by nosocomial vancomycin-resistant enterococci. **American Journal of Infection Control**. v.42, n.4, p.389-392, 2014.

DARTOIS, V.; PHALIP, V.; SCHMITT, P.; DIVIES, C. Purification, properties and DNA sequence of the D-lactate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. **Research in Microbiology**. v.146, p.291-302, 1995.

D'AZEVEDO, P.A.; FURTADO, G.H.; MEDEIROS, E.A.; SANTIAGO, K.A.; SILBERT, S.; PIGNATARI, A.C. Molecular characterization of vancomycin-resistant Enterococci strains eight years apart from its first isolation in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 2008 Jul-Aug;50(4):195-8.

DE ALMEIDA, L.M.; DE ARAÚJO, M.R.; IWASAKI, M.F.; SACRAMENTO, A.G.; ROCHA, D.; DA SILVA, L.P.; PAVEZ, M.; DE BRITO, A.C.; ITO, L.C.; GALES, A.C.; LINCOPAN, N.; SAMPAIO, J.L.; MAMIZUKA, E.M. Linezolid resistance in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates in a Brazilian hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.58, n.5, p.2993-2994, 2014.

DE LENCASTRE, H.; BROWN, A.E.; CHUNG, M.; ARMSTRONG, D.; TOMASZ, A. Role of transposon Tn*5482* in the epidemiology of vancomycin-resistant Enterococcus faecium in the paediatric on- cology unit of a New York City hospital. **Microbial Drug Resistance**, v.5, p.113-129, 1999.

DEMERTZI, E.; PALEPOU, M.F.; KAUFMANN, M.E.; AVLAMIS, A.; WOODFORD, N. Characterisation of VanA and VanB elements from glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* from Greece. **Journal of Medical Microbiology**, v.50, n.8, p.682-687, 2001.

DEVRIESE, L.A.; KERCKHOVE, A.V.D.; KILPPER-BÄLZ, R.; SCHLEIFER, K.H. Characterization and identification of *Enterococcus* species isolated from the intestines of animals. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, p.257-259, 1987.

DUPRE, I.; ZANETTI, S.; SCHITO, A.M.; FADDA, G.; SECHI, L.A. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates in Sardinia (Italy). **Journal of Medical Microbiology**, v.52, p.491-498, 2003.

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

EFSA. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. EFSA J; v.765, p.187, 2008.

ELISHA, B.G.; COURVALIN, P. Analysis of genes encoding D-alanine: D-alanine ligase-related enzymes in *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus* spp. **Gene** v.152, p.79-83, 1995.

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

ENRIGHT, M.C.; SPRATT, B.G. Multilocus sequence typing. **Trends in Microbiology**, v.7, p.482-487, 1999.

EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014. Disponível em: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. Acessado em: 06 jan 2014.

EUZÉBY, J.P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature - genus Enterococcus. Disponível em: http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html. Acessado em 12 abr 2015.

FALLICO, L.; BOLDRIN, C.; GROSSATO, A.; FRANCHIN, E.; DE CANALE, E.; TOMMASINI, T.; PARISI, S.G.; MANGANELLI, R.; PALÙ, G. Molecular epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates from an Italian hospital. **Infect**, v.39, p.127-133, 2011.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v.155, n.6, p.1749-1757, 2009.

FONTES, L.C.; NEVES, P.R.; OLIVEIRA, S.; SILVA, K.C.; HACHICH, E.M.; SATO, M.I.; LINCOPAN, N. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* coproducing metallo-β-lactamase SPM-1 and 16S rRNA methylase RmtD1 in an urban river. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, p.3063-3064, 2011.

FRACALANZZA, S.A.; SCHEIDEGGER, E.M.; SANTOS, P.F.; LEITE, P.C.; TEIXEIRA, L.M. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.7, p.853-859, 2007.

FREE, L.; SAHM, D. Detection of enterococcal vancomycin resistance by multiplex PCR. In: Persing D H, editor. PCR protocols for emerging infectious diseases. Washington, D.C: ASM Press; p.150-156, 1996.

FREITAS, A.R.; NOVAIS, C.; RUIZ-GARBAJOSA, P.; COQUE, T.M.; PEIXE, L. Clonal 153 expansion within clonal complex 2 and spread of vancomycin-resistant plasmids among different genetic lineages of *Enterococcus faecalis* from Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, p.1104-1111, 2009.

FREITAS, A.R.; TEDIM, A.P.; NOVAIS, C.; RUIZ-GARBAJOSA, P.; WERNER, G.; LAVERDE-GOMEZ, J.A.; CANTÓN, R.; PEIXE, L.; BAQUERO, F.; COQUE, T.M. Global spread of the *hyl*Efm colonization-virulence gene in megaplasmids of the *Enterococcus faecium* CC17 polyclonal subcluster. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.2660-2665,

2010.

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

GALES, A. C.; SADER, H. S.; RIBEIRO, J.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; PIGNATARI, A. C. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). Braz. J. Infect. Dis., v.13, p.90-98, 2009.

GALLOWAY-PENA, J.R.; ROH, J.H.; LATORRE, M.; QIN, X.; MURRAY, B.E. Genomic, SNP, and 16S rRNA analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium*. **PLoS ONE**, v.7, e30187, 2012.

GARBAJOSA, P.R.; BONTEN, M.J.M.; ROBINSON, D.A.; TOP, J.; NALLAPAREDDY, S. R.; TORRES, C. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.6, p.2220-2228, 2006.

GETACHEW, Y.; HASSAN, L.; ZAKARIA, Z.; ABDUL AZIZ, S. Genetic variability of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates from humans, chickens, and pigs in Malaysia. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n.15, p.4528-4533, 2013.

GHIDAN, A.; DOBAY, O.; KASZANYITZKY, E.J.; SAMU, P.; AMYES, S.G.B.; NAGY, K.; ROZGONYI, F. Vancomycin resistant Enterococci (Vre) still persist in slaughtered poultry in Hungary 8 years after the ban on Avoparcin. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica Journal**, v.55, p.409-417, 2008.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, n.2, p.163-171, 2002.

GODOY, D.; RANDLE, G.; SIMPSON, A.J.; AANENSEN, D.M.; PITT, T.L.; KINOSHITA, R.; SPRATT, B.G. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.2068-2079, 2003.

GOUSIA, P.; ECONOMOU, V.; BOZIDIS, P.; PAPADOPOULOU, C. Vancomycin-resistance phenotypes, vancomycin-resistance genes, and resistance to antibiotics of enterococci isolated

fromm food of animal origin. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.12, p.214-220, 2015.

GRAMMENOU, P.; SPILIOPOULOU, I.; SAZAKLI, E.; PAPAPETROPOULOU, M. PFGE analysis of enterococci isolates from recreational and drinking water in Greece. **Journal of Water and Health**, v.4, n.2, p.263-269, 2006.

GU, L.; CAO, B.; LIU, Y.; GUO, P.; SONG, S.; LI, R.; DAI, H.; WANG, C. A new Tn*1546* type of VanB phenotypevanA genotype vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in mainland China. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.63, p.70-75, 2009.

HALLER, L.; AMEDEGNATO, E.; POTÉ, J.; WILDI, W. Influence of freshwater sediment characteristics on persistence of fecal indicator bacteria. **Water, Air, & Soil Pollution**, v.203, p.217-227, 2009.

HAMMERUM, A.M.; LESTER, C.H.; HEUER, O.E. Antimicrobial-resistant enterococci in animals and meat: a human health hazard? **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, p.1137-1146, 2010.

HANDWERGER, S.; SKOBLE, J. Identification of chromosomal mobile element conferring high-level vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, p.2446-2453, 1995

HANDWERGER, S.; SKOBLE, J.; DISCOTTO, L.F.; PUCCI, M.J. Heterogeneity of the *vanA* gene cluster in clinical isolates of enterococci from the northeastern United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**,v.39, p.362-368, 1995.

HARADA, T.; KAWAHARA, R.; KANKI, M.; TAGUCHI, M.; KUMEDA, Y. Isolation and characterization of *vanA* genotype vancomycin-resistant *Enterococcus cecorum* from retail poultry in Japan. **International Journal of Food Microbiology**, v.153, n.3, p.372-377, 2012.

HASHIMOTO, Y.; TANIMOTO, K.; OZAWA, Y.; MURATA, T.; IKE, Y. Amino acid substitutions in the VanS sensor of the VanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus* strains result in high-level vancomycin resistance and low-level teicoplanin resistance. **FEMS Microbiology Letters**, v.185, p.247-254, 2000.

HASMAN H. The *tcrB* gene is part of the *tcrYAZB* operon conferring copper resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **Microbiology**, v.151, p.3019–3025, 2005.

HEIKENS, E.; SINGH, K.V.; JACQUES-PALAZ, K.D.; VAN LUIT-ASBROEK, M.;

OOSTDIJK, E.A.; BONTEN, M.J.; MURRAY, B.E.; WILLEMS, R.J. Contribution of the enterococcal surface protein Esp to pathogenesis of *Enterococcus faecium* endocarditis. **Microbes and Infection**, v.13, p.1185-1190, 2011.

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

HENRIQUE, P.M.; PALAZZO, I.C.V.; ZANELLA, R.C.; DARINI, A.L.C. Molecular characterization of enterococci harboring genotype and phenotype incongruence related to glycopeptide resistance isolated in Brazilian hospitals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p.301-305, 2008.

HIDRON, A.I.; EDWARDS, J.R.; PATEL, J.; HORAN, T.C.; SIEVERT, D.M.; POLLOCK, D.A.; FRIDKIN, S.K.; National Healthcare Safety Network Team; Participating National Healthcare Safety Network Facilities. NHSN annual update: antimicrobialresistant pathogens associated with healthcareassociated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v.29, p.996-1011, 2008.

HIRSCH, R.; TERNES, T.; HABERER, K.; KRATZ, K.L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science of the Total Environment**, v.225, p.109-118, 1999.

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

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

HUBBLE, T.S.; HATTON, J.F.; NALLAPAREDDY, S.R.; MURRAY, B.E.; GILLESPIE, M.J. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagenbinding protein, Ace, on adhesion to dentin. **Oral Microbiology and Immunology**, v.18, p.121-126, 2003.

HUGHES, V.M.; DATTA, N. Conjugative plasmids in bacteria of the ‘pre-antibiotic’ era. **Nature**, v.302, p.725-726, 1983.

HUGHES, D. Exploiting genomics, genetics and chemistry to combat antibiotic resistance. **Nat**

Rev Genet, v.4, p.432-441, 2003.

IKE, Y.; HASHIMOTO, H.; CLEWELL, D.B. Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies *zymogenes* contributes to virulence in mice. **Infection and Immunity**, v.45, p.528-530, 1984.

IVERSEN, A.; KÜHN, I.; RAHMAN, M.; FRANKLIN, A.; BURMAN, L.G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; TORELL, E.; MÖLLBY, R. Evidence for transmission between humans and the environment of a nosocomial strain of *Enterococcus faecium*. **Environmental Microbiology**, v.6, p.55-59, 2004.

JAMET, E.; AKARY, E.; POISSON, M.A.; CHAMBA, J.F.; BERTRAND, X.; SERROR, P. Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. **Food Microbiology**, v.31, n.2, p.191-198, 2012.

JENG, H,C.; SINCLAIR, R.; DANIELS, R.; ENGLANDE, A.J. Survival of Enterococci faecalis in estuarine sediments. **International Journal of Environmental Studies**, v.62, p.283-291, 2005.

JENSEN, L.B.; AHRENS, P.; DONS, L.; JONES, R.N.; HAMMERUM, A.M.; AARESTRUP, F.M. Molecular analysis of Tn*1546* in *Enterococcus faecium* isolated from animals and humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.437-442, 1998.

JOHNSEN, P.J.; TOWNSEND, J.P.; BØHN, T.; SIMONSEN, G.S.; SUNDSFJORD, A.; NIELSEN, K.M. Retrospective evidence for a biological cost of vancomycin resistance determinants in the absence of glycopeptide selective pressures. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.66, p.608-610, 2011.

Johnson, C.N.; Benjamin Jr, W.H. Jr.; Moser, S.A.; Hollingshead, S.K.; Zheng, X.; Crain, M.J.; Nahm, M.H.; Waites, K.B. Genetic relatedness of levofloxacinnonsusceptible Streptococcus pneumoniae isolates from North America. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.2458-2464, 2003.

JONES, R.N.; GUZMAN-BLANCO, M.; GALES, A.C.; GALLEGOS, B.; CASTRO, A.L.; MARTINO, M.D.; VEGA, S.; ZURITA, J.; CEPPARULO, M.; CASTANHEIRA, M. Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.17, n.6, p.672-681, 2013.

JUNG, W.K.; LIM, J.Y.; KWON, N.H.; KIM, J.M.; HONG, S.K.; KOO, H.C.; KIM, S.H.; PARK, Y.H. Vancomycin-resistant enterococci from animal sources in Korea. **International**

Journal of Food Microbiology, v.113, n.1, p.102-107, 2007.

KAY, D.; FLEISHER, J.M.; SALMON, R.L.; JONES, F.; WYER, M.D.; GODFREE, A.F.; ZELENAUCH-JACQUOTTE, Z.; SHORE, R. Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing: results from randomised exposure. **Lancet** v.344, p.905-909, 1994.

KEMPF, I.; HELLARD, G.; PERRIN-GUYOMARD, A.; GICQUEL-BRUNEAU, M.; SANDERS, P.; LECLERCQ, R. Prevalence of high-level vancomycin-resistant enterococci in French broilers and pigs. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.32, p.463-464, 2008.

KHAN, M.A.; NORTHWOOD, J.B.; LOOR, R.G.; THOLEN, A.T.; RIERA, E.; FALCÓN, M.; Paraguayan Antimicrobial Network; van BELKUM, A.; van WESTREENEN, M.; HAYS, J.P. High prevalence of ST-78 infection associated vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from hospitals in Asunción, Paraguay. **Clinical Microbiology and Infection**, v.16, p.624-627, 2010.

KHAN, M.A.; VAN DER WAL, M.; FARRELL, D.J.; COSSINS, L.; VAN BELKUM, A.; ALAIDAN, A.; HAYS, J.P. Analysis of VanA vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Saudi Arabian hospitals reveals the presence of clonal cluster 17 and two new Tn*1546* lineage types. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.279-283, 2008.

KO, K.S.; BAEK, J.Y.; LEE, J.Y.; OH, W.S.; PECK, K.R.; LEE, N.; LEE, W.G.; LEE, K.; SONG, J.H. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.2303-2306, 2005.

KOTETISHVILI, M.; STINE, O.C.; KREGER, A.; MORRIS, J.G JR.; SULAKVELIDZE, A. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental salmonella strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.1626-1635, 2002.

KOTETISHVILI, M.; STINE, O.C.; CHEN, Y.; KREGER, A.; SULAKVELIDZE, A.; SOZHAMANNAN, S.; MORRIS, J.G Jr. Multilocus sequence typing has better discriminatory ability for typing *Vibrio cholerae* than does pulsed-field gel electrophoresis and provides a measure of phylogenetic relatedness. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.2191-2196, 2003.

KRCMÉRY, V.; SEFTON, A. Vancomycin resistance in Gram-positive bacteria other than *Enterococcus* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.14, p.99-105, 2000.

KÜMMERER, K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment - a review - part I. **Chemosphere**. v.75, n.4, p.417-434.

LAUDERDALE, T.L.; MCDONALD, L.C.; SHIAU, Y.R.; CHEN, P.C.; WANG, H.Y.; LAI, J.F.; HO, M. Vancomycin-resistant enterococci from humans and retail chickens in Taiwan with unique VanB phenotype-vanA genotype incongruence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.2, p.525-527, 2002.

LEAVIS, H.L.; BONTEN, M.J.; WILLEMS, R.J. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v.9, p.454-460, 2006.

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

LEBRETON, F.; VAN SCHAIK, W.; MCGUIRE, A.M.; GODFREY, P.; GRIGGS, A.; MAZUMDAR, V.; CORANDER, J.; CHENG, L.; SAIF, S.; YOUNG, S.; ZENG, Q.; WORTMAN, J.; BIRREN, B.; WILLEMS, R.J.L.; EARL, A.M.; GILMORE, M.S. Emergence of epidemic multidrug resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. **MBio**, v.4, p.1-10, 2013.

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

LEE, H.G.; JANG, J.; CHOI, J.E.; CHUNG, D.C.; HAN, J.W.; WOO, H.; JEON, W.; CHUN, B.C. Blood stream infections in patients in the burn intensive care unit. **Infection and Chemotherapy**, v.45, p.194-201, 2013.

LEME, I.L.; PIANTINO, A.J.; PIGNATARI, A.C. Glycopeptides susceptibility among enterococci isolated from a poultry farm in São Paulo, Brazil (1996/1997). **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.53-57, 2000.

LESTER, C.H.; FRIMODT-MOLLER, N.; SORENSEN, T.L.; MONNET, D.L.; HAMMERUM, A.M. In vivo transfer of the vanA resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of

human volunteers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.5969, 2006.

LINCOPAN, N.; DE ALMEIDA, L.M.; ELMOR DE ARAÚJO, M.R.; MAMIZUKA, E.M. Linezolid resistance in *Staphylococcus epidermidis* associated with a G2603T mutation in the 23S rRNA gene. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.34, n.3, p.281-282, 2009.

LINCOPAN, N. Cetesb realiza estudo bacteriológico do Rio Tietê. Agência Universitária de Notícias, AUN (on line), Ano 43, n.100, 16 nov. 2010.

LIVERMORE, D.M. Has the era of untreatable infections arrived? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.64, p.i29-i36, 2009.

LOCATELLI, M.A.; SODRÉ, F.F.; JARDIM, W.F. Determination of antibiotics in Brazilian surface waters using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.60, n.3, p.385-393, 2011.

LÓPEZ, M.; SÁENZ, Y.; ALVAREZ-MARTÍNEZ, M.J.; MARCO, F.; ROBREDO, B.; ROJO-BEZARES, B.; RUIZ-LARREA, F.; ZARAZAGA, M.; TORRES, C. Tn*1546* structures and multilocus sequence typing of vanA-containing enterococci of animal, human and food origin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, n.8, p.1570-1575, 2010.

MACKINNON, M.G.; DREBOT, M.A.; TYRRELL, G.J. Identification and characterization of IS1476, an insertion sequence-like element that disrupts VanY function in a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.41, p.1805-1807, 1997.

MAIDEN, M.C.; BYGRAVES, J.A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J.E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D.A.; FEAVERS, I.M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B.G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.**, v.95, p.3140-3145, 1998.

MAINARDI, J.L.; VILLET, R.; BUGG, T.D.; MAYER, C.; ARTHUR, M. Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.32, p.386-408, 2008.

MARSHALL, C.G.; LESSARD, I.A.; PARK, I.; WRIGHT, G.D. Glycopeptide antibiotic resistance genes in glycopeptide-producing organisms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, n.9, p.2215-2220, 1998.

MARSHALL, C.G.; BROADHEAD, G.; LESKIW, B.; WRIGHT, G.D. D-AlaD-Ala ligases from glycopeptide antibiotic-producing organisms are highly homologous to the enterococcal vancomycin-resistance ligases VanA and VanB. **Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.**, v.94, p.6480-6483, 1997.

MATO, R.; LENCASTRE, H.; ROBERTS, R.B.; TOMASZ, A. Multiplicity of genetic backgrounds among vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates recovered from an outbreak in a New York City hospital. **Microbial Drug Resistance**, v.2, p.309-317, 1996.

MCDONALD, L.C.; KUEHNERT, M.J.; TENOVER, F.C.; JARVIS, W.R. Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, p.3117, 1997.

MERLO, T.P.; DABUL, A.N.; CAMARGO, I.L. Different VanA Elements in *E. faecalis* and in *E. faecium* Suggest at Least Two Origins of Tn*1546* Among VRE in a Brazilian Hospital. **Microbial Drug Resistance**, v.21, n.3, p.320-328, 2015.

MONTILLA, A.; ZAVALA, A.; CÁCERES, CÁCERES, R.; CITTADINI, R.; VAY, C.; GUTKIND, G.; FAMIGLIETTI, A.; BONOFIGLIO, L.; MOLLERACH, M. Genetic environment of the *lnu*(B) gene in a *Streptococcus agalactiae* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother**, v.58, n.9, p.5636-5637, 2014.

RAMSEY, A.M.; ZILBERBERG, M.D. Secular trends of hospitalization with vancomycin-resistant enterococcus infection in the United States, 2000-2006. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v.30, n.2, p.184-186, 2009.

MURRAY, B.E. The life and times of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.3, p.46-65, 1990.

MURRAY B.E. Vancomycin-resistant enterococcal infections. **The New England Journal of Medicine**, v.342, n.10, p.710-721, 2000.

MURRAY, B. E.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. Manual of Clinical Microbiology. 9.ed., Washington, D.C.: ASM Press, 2007.

NAAS, T.; FORTINEAU, N.; SNANOUDJ, R.; SPICQ, C.; DURRBACH, A.; NORDMANN, P. First nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* expressing a VanD-like phenotype associated with a vanA genotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.3642-3649, 2005.

NALLAPAREDDY, S.R.; SINGH, K.V.; OKHUYSEN, P.C.; MURRAY, B.E. A functional collagen adhesin gene, acm, in clinical isolates of *Enterococcus faecium* correlates with the recent success of this emerging nosocomial pathogen. **Infection and Immunity**, v.76, p.4110-4119, 2008.

NALLAPAREDDY, S.R.; DUH, R.W.; SINGH, K.V.; MURRAY, B.E. Molecular typing of selected Enterococcus faecalis isolates: pilot study using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.868-876, 2002.

NILSSON O. Vancomycin resistant enterococci in farm animals–occurrence and importance. **Infection Ecology & Epidemiology**, v.2, p.1–8, 2012.

NOLLER, A.C.; MCELLISTREM M.C.; STINE O.C.; MORRIS J.G. JR.; BOXRUD, D.J.; DIXON, B.; HARRISON, L.H. Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among Escherichia coli O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.675-679, 2003.

NOVAIS, C.; FREITAS, A.R.; SILVEIRA, E.; ANTUNES, P.; SILVA, R.; COQUE, T.M.; PEIXE, L. Spread of multidrug-resistant *Enterococcus* to animals and humans: an underestimated role for the pig farm environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.68, n.12, p.2746-2754, 2013.

NOVAIS, C.; FREITAS, A.R.; SOUSA, J.C.; BAQUERO, F.; COQUE, T.M.; PEIXE, L.V. Diversity of Tn1546 and its role in the dissemination of vancomycin-resistant enterococci in Portugal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n.3, p.1001-1008, 2008.

OH, J.Y.; AN, S.; JIN, J.S.; LEE, Y.C.; CHO, D.T.; LEE, J.C. Phenotypic and genotypic differences of the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from humans and poultry in Korea. TJ Microbiology. v.45, p.466-472, 2007.

MOURA, R.A.; SILVA, K.C.; PAVEZ, M.; MCCULLOCH, J.A.; DROPA, M.; MATTÉ, M.H.; MAMIZUKA, E.M.; SATO, M.I.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; LINCOPAN, N. Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumonia* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.69, p.849-852, 2013.

OLSEN, R.H.; CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M. Transmission and genetic diversity of *Enterococcus faecalis* during hatch of broiler chicks. **Veterinary Microbiology**, v.60, p.214-

221, 2012.

OSTROLENK, M.; KRAMER, N.; CLEVERDON, R.C. Comparative studies of enterococci and *Escherichia coli* as indices of pollution. **Journal of Bacteriology**, v.53, p.197-203, 1947.

PALAZZO ICV, CAMARGO ILBC, ZANELLA RC, DARINI ALC. Evaluation of clonality in enterococci isolated in Brazil carrying Tn*1546*-like elements associated with vanA plasmids. **FEMS Microbiol Lett**, v.258, p.20-36, 2006.

PALAZZO, I.C.; PITONDO-SILVA, A.; LEVY, C.E.; DA COSTA DARINI, A.L.Changes in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing outbreaks in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, 2011; 79: 70-4.

PALEPOU, M.F.; ADEBIYI, A.M.; TREMLETT, C.H.; JENSEN, L.B.; WOODFORD, N. Molecular analysis of diverse elements mediating VanA glycopeptide resistance in enterococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.42, p.605-612, 1998.

PARK, I.J.; LEE, W.G.; LIM, Y.A.; CHO, S.R. Genetic rearrangements of TN*1546*-like elements in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates collected from hospitalized patients over a seven-year period. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.12, p.3903-3908, 2007.

PARK, S.H.; PARK, C.; CHOI, S.M.; LEE, D.G.; KIM, S.H.; KWON, J.C.; BYUN, J.H.; CHOI, J.H.; YOO, J.H. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bloodstream infections among patients with neutropenia over a 6-year period in South Korea. **Microbial Drug Resistance**, v.17, n.1, p.59-65, 2011.

PARK, I.S.; WALSH,. C.T. D-Alanyl-D-lactate and D-alanyl-D-alanine synthesis by D-alanyl-D-alanine ligase from vancomycin-resistant *Leuconostoc mesenteroides*. Effects of a phenylalanine 261 to tyrosine mutation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.9210-9214, 1997.

PARK, S.Y.; SHIN, Y.P.; KIM, C.H.; PARK, H.J.; SEONG, Y.S.; KIM, B.S.; SEO, S.J.; LEE, I.H. Immune evasion of *Enterococcus faecalis* by an extracellular gelatinase that cleaves C3 and iC3b. **The Journal of Immunology**, v.181, p.6328-6336, 2008.

PATEL, R.; PIPER, K.; COCKERILL, F.R 3rd.; STECKELBERG, J.M.; YOUSTEN, A.A. biopesticide *Paenibacillus popilliae* has a vancomycin resistance gene cluster homologous to the enterococcal VanA vancomycin resistance gene cluster. **Antimicrobial Agents and**

Chemotherapy, v.44, p.705-709, 2000.

PATTERSON, J.E.; SWEENEY, A.H.; SIMMS.; CARLEY, N.; MANGI, R.; SABETTA, J.; LYONS, R.W. Analysis of 110 series enterococcal infections. **Medicine**, v.74, p.191-200, 1995.

PAULSEN, I.T.; BANERJEI, L.; MYERS, G.S.; NELSON, K.E.; SESHADRI, R.; READ, T.D.; FOUTS, D.E.; EISEN, J.A.; GILL, S.R.; HEIDELBERG, J.F.; TETTELIN, H.; DODSON, R.J.; UMAYAM, L.; BRINKAC, L.; BEANAN, M.; DAUGHERTY, S.; DEBOY, R.T.; DURKIN, S.; KOLONAY, J.; MADUPU, R.; NELSON, W.; VAMATHEVAN, J.; TRAN, B.; UPTON, J.; HANSEN, T.; SHETTY, J.; KHOURI, H.; UTTERBACK, T.; RADUNE, D.; KETCHUM, K.A.; DOUGHERTY, B.A.; FRASER, C.M. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Science.** v.299, n.5615, p.2071-2074, 2003.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E.M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.6, p.2702, 2009.

PEACOCK, S.J.; DE SILVA, G.D.; JUSTICE, A.; COWLAND, A.; MOORE, C.E.; WINEARLS, C.G.; DAY, N.P. Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis as tools for typing *Staphylococcus aureus* isolates in a microepidemiological setting. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.3764-3770, 2002.

PENAS, P.P.; MAYER, M.P.; GOMES, B.P.; ENDO, M.; PIGNATARI, A.C.; BAUAB, K.C.; PINHEIRO, E.T. Analysis of genetic lineages and their correlation with virulence genes in *Enterococcus faecalis* clinical isolates from root canal and systemic infections. **Journal of Endodontics**, v.39, n.7, p.858-864, 2013.

PRÜSS A. Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water. **International Journal of Epidemiology**, v.27, p.1-9, 1998.

QU, T.T.; CHEN, Y.G.; YU, Y.S.; LV, H.X.; DONG, X.Q.; XIAO, Z.; GU, H.Q.; LI, L.J. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci in Hangzhou, China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60, n.6, p.1403–1405, 2007.

QUIÑONES, D.; KOBAYASHI, N.; NAGASHIMA, S. Molecular epidemiologic analysis of Enterococcus faecalis isolates in Cuba by multilocus sequence typing. **Microbial Drug Resistance**, v.15, n.4, p.287-293, 2009.

REIS, A.O.; CORDEIRO, J.C.; MACHADO, A.M.; SADER, H.S. In vitro antimicrobial

activity of linezolid tested against vancomycin-resistant enterococci isolated in Brazilian hospitals. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.5, n.5, p.243-251, 2001.

RESENDE, M.; CAIERÃO, J.; PRATES, J.G.; NARVAEZ, G.A.; DIAS, C.A.; D'AZEVEDO, P.A. Emergence of vanA vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a hospital in Porto Alegre, South Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**. v.8, n.2, p.160-167, 2014.

REVAZISHVILI, T.; KOTETISHVILI, M.; STINE, O.C.; KREGER, A.S.; MORRIS, J.G JR.; SULAKVELIDZE, A. Comparative analysis of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis for characterizing Listeria monocytogenes strains isolated from environmental and clinical sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.276-285, 2004.

REYNOLDS PE. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptides antibiotics. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.8, p.943-950, 1989.

RICE, L.B.; CARIAS, L.; RUDIN, S.; VAEL, C.; GOOSSENS, H.; KONSTABEL, C.; KLARE, I.; NALLAPAREDDY, S.R.; HUANG, W.; MURRAY, B.E. A potential virulence factor gene, hylEfm, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. **The Journal of Infectious Diseases**, v.187, p.508-512, 2003.

RICE, L.B.; LAKTICOVÁ, V.; CARIAS, L.L.; RUDIN, S.; HUTTON, R.; MARSHALL, S.H. Transferable capacity for gastrointestinal colonization in *Enterococcus faecium* in a mouse model. **The Journal of Infectious Diseases**, v.199, p.342-349, 2009.

RIPPERE, K.; PATEL, R.; UHL, J.R.; PIPER, K.E.; STECKELBERG, J.M.; KLINE, B.C.; COCKERILL, F.R.; YOUSTEN, A.A. DNA sequence resembling *vanA* and *vanB* in the vancomycin-resistant biopesticide *Bacillus popilliae*. **The Journal of Infectious Diseases**, v.178, p;584-588, 1998.

ROBREDO, B.; SINGH, K.V.; BAQUERO, F.; MURRAY, B.E.; TORRES, C. Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. **International Journal of Food Microbiology**, v.54, n.3, p.197-204, 2000.

ROCHA, P.S.; LUVIZOTTO, G.L.; KOSMEHL, T.; BÖTTCHER, M.; STORCH, V.; BRAUNBECK, T.; HOLLERT, H. Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): in vitro comet assay versus in situ micronucleus assay studies. **Ecotoxicology and**

Environmental Safety, v.72, n.7, p.1842-1848, 2009.

RUIZ-GARBAJOSA, P.; BONTEN, M.J.; ROBINSON, D.A.; TOP, J.; NALLAPAREDDY, S.R.; TORRES, C.; COQUE, T.M.; CANTÓN, R.; BAQUERO, F.; MURRAY, B.E.; DEL CAMPO, R.; WILLEMS, R.J. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospitaladapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.2220-2228, 2006.

RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; RAJANDREAM, M.A.; BARRELL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, v.16, n.10, p.944-945, 2000.

SACRAMENTO, A.G. Tipagem molecular de cepas de Enterococcus spp resistentes à vancomicina, isoladas em hospitais da cidade de São Paulo, no período de 1999 a 2008. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde. [Dissertação] p.115, 2010.

SACRAMENTO, A.G.; CERDEIRA, L.T.; DE ALMEIDA, L.M.; ZANELLA, R.C.; PIRES, C.; SATO, M.I.; COSTA, E.A.; ROBERTO, N.P.; MAMIZUKA, E.M.; LINCOPAN, N. Environmental dissemination of *vanA*-containing *Enterococcus faecium* strains belonging to hospital-associated clonal lineages. **J Antimicrob Chemother**, p.1-2, 2015a.

SACRAMENTO, A.G.; ZANELLA, R.C.; de ALMEIDA, L.M.; PIRES, C.; POPAZOGLO, C.; COSTA, E.A.S.; CERDEIRA, L.T.; MAMIZUKA, E.M.; LINCOPAN, N. Identification of New Sequence Types among *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* carrying *vanA* gene in Retail Chicken Meat. **J Glob Antimicrob Resist**, 2015b.

SADOWSKY, M.J.; WHITMAN, R.L. The fecal bacteria. ASM Press, Washington, DC. Wolf HW. 1972. The coliform count as a measure of water quality, p.333-345. In Mitchell R (ed), Water pollution microbiology. Wiley Interscience, New York, NY, 2010.

SANTIAGO-RODRIGUEZ, T.M.R.J.; CORADIN, M.; TORANZOS, A. Antibiotic-resistance and virulence genes in *Enterococcus* isolated from tropical recreational waters. **Journal of Water and Health**, v.11, p.387-396, 2013.

SCHJORRING, S.; KROGFELT, K.A. Assessment of bacterial antibiotic resistance transfer in the gut. **International Journal of Microbiology**, v.2011, p.312956, 2011.

SEGARRA, R.A.; BOOTH, M.C.; MORALES, D.A.; HUYCKE, M.M.; GILMORE, M.S.

Molecular characterization of the *Enterococcus faecalis* cytolysin activator. **Infection and Immunity**, v.59, p.1239-1246, 1991.

SHANKAR, N.; LOCKATELL, C.V.; BAGHDAYAN, A.S.; DRACHENBERG, C.; GILMORE, M.S.; JOHNSON, D.E. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. **Infection and Immunity**, v.69, p.4366-4372, 2001.

SIGUIER, P.; PEROCHON, J.; LESTRADE, L.; MAHILLON, J.; CHANDLER, M. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. **Nucleic Acids Res**, v.34, p.32-36, 2006.

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

SIMONSEN, G.S.; MYHRE, M.R; DAHL, K.H.; OLSVIK, O.; SUNDSFJORD, A. Typeability of Tn1546-like elements in van- comycin-resistant enterococci using long-range PCRs and specific analysis of polymorphic regions. **Microbial Drug Resistance**, v.6, p.49-57, 2000.

SINCLAIR, R.G.; ROSE, J.B.; HASHAM, S.A.; GERBA, C.P.; HAAS, C.N. Criteria for selection of surrogates used to study the fate and control of pathogens in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p.1969-1977, 2012.

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

SONG, J.H.; KO, K.S.; OH, W.S.; PARK, S.; HEO, S.T.; KWON, K.T.; RYU, S.Y.; PECK, K.R.; LEE, N.Y. High frequency of vancomycinresistant E*nterococcus faecium* isolates with VanB phenotype and vanA genotype in Korean hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.56, p.401-406, 2006.

STOBBERINGH, E.; VAN DEN BOGAARD, A.; LONDON, N.; DRIESSEN, C.; TOP WILLEMS, JR. Enterococci with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmers, turkey slaughterers, and (sub)urban residents in the south of The Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, p.2215-2221, 1999.

STOKSTAD, E.L.; JUKES, T.H. Further observations on the ‘animal protein factor’.

Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine, v.78, p.5238, 1950.

SUARES ROCHA, P.; AZAB, E.; SCHMIDT, B.; STORCH, V.; HOLLERT, H.; BRAUNBECK, T. Changes in toxicity and dioxin-like activity of sediments from the Tietê River (São Paulo, Brazil). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, n.4, p.550-558, 2010.

TALEBI, M.; POURSHAFIE, M.R.; KATOULI, M.; MÖLLBY, R. Molecular structure and transferability of Tn*1546*-like elements in *Enterococcus faecium* isolates from clinical, sewage, and surface water samples in Iran. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.5, p.1350-1356, 2008.

TALEBI, M.; SADEGHI, J.; RAHIMI, F.;POURSHAFIE, M.R. Isolation and Biochemical Fingerprinting of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* From Meat, Chicken and Cheese. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v.8, n.4, p.e15815, 2015.

TEIXEIRA, L.; CARVALHO, M.; FACKLAN, R. Enterococcus. In: Murray P, Baron E, Landry M, Jorgensen J, Pfaller M, editors. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington, DC: ASM Press. p.430-442, 2007.

TEIXEIRA, L.M.; FACKLAM, R.R. Enterococcus. In Manual of Clinical Microbiology, 8th edn, p.422–433. Edited by P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller & R. H. Yolken. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2003.

TEOPHILO, G.N.; DOS FERNANDES VIEIRA, R.H.; DOS PRAZERES RODRIGUES, D.; MENEZES, F.G. Escherichia coli isolated from seafood: toxicity and plasmid profiles. **International Microbiology**. v.5, n.1, p.11-4, 2002.

TEUBER, M.Veterinary use and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v.4, p.493-499, 2001.

THAL, L.; DONABEDIAN, S.; ROBINSON-DUNN, B.; CHOW, J.W.; DEMBRY, L.; CLEWELL, D.B.; ALSHAB, D.; ZERVOS, M.J. Molecular analysis of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolates collected from Michigan hospitals over a 6-year period. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.3303-3308, 1998.

The European Antimicrobial Resistance Surveillance System. EARSS results. Disponível em: http://www.rivm.nl/earss/result/. Acessado em: 13 fev. 2012.

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

TROBOS, M.; LESTER, C.H.; OLSEN, J.E.; FRIMODT-MOLLER, N.; HAMMERUM, A.M. Natural transfer of sulphonamide and ampicillin resistance between *Escherichia coli* residing in the human intestine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, p.806, 2009.

URWIN, R.; MAIDEN, M.C. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends in Microbiology**, v.11, p.479-487, 2003.

US Environmental Protection Agency.Method 1600—enterococci in water by membrane filtration using membrane-Enterococcus indoxyl-B-D-glucoside agar (mEI). EPA-821-R-02-022. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 2002.

UTTLEY, A.H.; COLLINS, C,H.; NAIDOO, J.; GEORGE, R.C. Vancomycin-resistant enterococci. **Lancet**, v.1, p.57-58, 1988.

VAN DEN BOGAARD, A.E.; WILLEMS, R.; LONDON, N.; TOP, J.; STOBBERINGH, E.E. Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.49, p.497-505, 2002.

VAN DEN BRAAK, N.; VAN BELKUM, A.; VAN KEULEN, M.; VLIEGENTHART, J.; VERBRUGH, H.A.; ENDTZ, H.P. Molecular characterization of vancomycinresistant enterococci from hospitalized patients and poultry products in The Netherlands. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.1927-1932, 1998.

VAN DER AUWERA, P.; PENSART, N.; KORTEN, V.; MURRAY, B.E.; LECLERCQ, R. Influence of oral glycopeptides on the fecal flora of human volunteers: selection of highly glycopeptide-resistant enterococci. **The Journal of Infectious Diseases**, v.173, p.1129-1136, 1996.

VAN SCHAIK, W.; TOP, J.; RILEY, D.R.; BOEKHORST, J.; VRIJENHOEK, J.E.; SCHAPENDONK, C.M.; HENDRICKX, A.P.; NIJMAN, I.J.; BONTEN, M.J.; TETTELIN, H.; WILLEMS, R.J. Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. **BMC Genomics**, v.11, p.239, 2010.

VARELA, A.R.; FERRO, G.; VREDENBURG, J.; YANIK, M.; VIEIRA, L.; RIZZO, L.;

LAMEIRAS, C.; MANAIA, C.M. Vancomycin resistant enterococci: from the hospital effluent to the urban wastewater treatment plant. **Science of the Total Environment**, v.450-451, p.155-161, 2013.

VIGNAROLI, C.; ZANDRI, G.; AQUILANTI, L.; PASQUAROLI, S.; BIAVASCO, F. Multidrug-resistant enterococci in animal meat and faeces and co-transfer of resistance from an *Enterococcus durans* to a human *Enterococcus faecium*. **Current Microbiology**, v.62, p.1438-1447, 2011.

WADE, T.J.; SAMS, E.; BRENNER, K.P.; HAUGLAND, R.; CHERN, E.; BEACH, M.; WYMER, L.; RANKIN, C.C.; LOVE, D.; LI, Q.; NOBLE, R.; DUFOUR, A.P. Rapidly measured indicators of recreational water quality and swimming-associated illness at marine beaches: a prospective cohort study. **Environmental Health**, v.9, p.66, 2010.

WANG, G.; KAMALAKARAN, S.; DHAND, A.; HUANG, W.; OJAIMI, C.; ZHUGE, J.; YEE, L.L.; MAYIGOWDA, P.; SURENDRAIAH, P.K.; DIMITROVA, N.; FALLON, J.T. Identification of a novel clone, ST736, among Enterococcus faecium clinical isolates and its association with daptomycin nonsusceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.58, n.8, p.4848-4854, 2014.

WEGENER, H.C. Historical yearly usage of glycopeptides for animals and humans: the American-European paradox revisited. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, p.3049, 1998.

WEGENER, H.C.; AARESTRUP, F.M.; JENSEN, L.B.; HAMMERUM, A.M.; BAGER, F. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v.5, p.329-335, 1999.

WERNER, G.; COQUE, T.M.; HAMMERUM, A.M.; HOPE, R.; HRYNIEWICZ, W.; JOHNSON, A.; KLARE, I.; KRISTINSSON, K.G.; LECLERCQ, R.; LESTER, C.H.; LILLIE, M.; NOVAIS, C.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PEIXE, LV.; SADOWY, E.; SIMONSEN, G.S.; TOP, J.; VUOPIO-VARKILA, J.; WILLEMS, R.J.; WITTE, W.; WOODFORD, N. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. **Eurosurveillance**, v.13, p.1-11, 2008.

WERNER, G.; FLEIGE, C.; GERINGER, U.; VAN SCHAIK, W.; KLARE, I.; WITTE, W. IS element IS16 as a molecular screening tool to identify hospital-associated strains of

Enterococcus faecium. **BMC Infectious Diseases**, v.11, p.1-8, 2011.

WERNER, G.; KLARE, I.; WITTE, W. Large conjugative *vanA* plasmids in vancomycin-resistant Enterococcus faecium. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.7, p.2383-2384, 1999.

WERNER, G.; KLARE, I.; WITTE, W. The current MLVA typing scheme for *Enterococcus faecium* is less discriminatory than MLST and PFGE for epidemic-virulent, hospital-adapted clonal types. **BMC Microbiology**, v.7, p.28, 2007.

WERNER, G.; KLARE, I.; WITTE, W. Arrangement of the *vanA* gene cluster in enterococci of different ecological origin. **FEMS Microbiology Letters**, v.155, p.55-61, 1997.

WHO. Programmes and projects, Zoonoses and veterinary public health. Disponível em: http://www.who.int/zoonoses/en/. Aessado em: 19 dez. 2014.

WILLEMS, R.J.; VAN SCHAIK, W. Transition of *Enterococcus faecium* from comensal organism to nosocomial pathogen. **Future Microbiology**, v.4, n.9:1125-1135, 2009.

WILLEMS, R.J.; TOP, J.; VAN DEN BRAAK, N.; VAN BELKUM, A.; MEVIUS, D.J.; HENDRINKS, G., VAN SANTEN-VERHEUVEL, M.; VAN EMBDEN, J.D. Molecular diversity and evolutionary relationships of Tn*1546*-like elements in enterococci from humans and animals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, p.483-491, 1999.

WITTE, W. Selective pressure by antibiotic use in livestock. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.16, p.S1924, 2000.

WITTE, W.; STROMMENGER, B.; WERNER, G. Diagnostics, typing & taxonomy. In Gram positive pathogens 2nd edition. Edited by: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI. Washington D.C.: ASM Press; 2006.

WOODFORD, N.; ADEBIYL, A.M.; PALEPOU, M.F.; COOKSON, B.D. Diversity of VanA glycopeptide resistance elements in enterococci from humans and nonhuman sources. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, p.502-508, 1998.

WOODFORD, N.; JOHNSON, A.P.; MORRISON, D.; SPELLER, D.C.E. Current perspectives on glycopeptide resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, n.4, p.585-615, 1995.

WRIGHT, G.D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, p.175-186, 2007.

ZANELLA, R.C.; VALDERATO, F.; LOVGREN, M.; TYRREL, G.J.; BOKERMANN, S.; ALMEIDA, S.C.G.; VIEIRA, V.S.; BRANDILEONE, M.C.C. First confirmed case of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with Van A phenotype from Brazil: isolation from a meningits case in São Paulo. **Microbial Drug Resistance**, v.5, p.159-161, 1999.

ZANELLA, R.C.; BRANDILEONE, M.C.; BOKERMANN, S.; ALMEIDA, S.C.; VALDETARO, F.; VITÓRIO, F. Phenotypic and genotypic characterization of VanA *Enterococcus* isolated during the first nosocomial outbreak in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v.9, n.3, p.283-291, 2003.

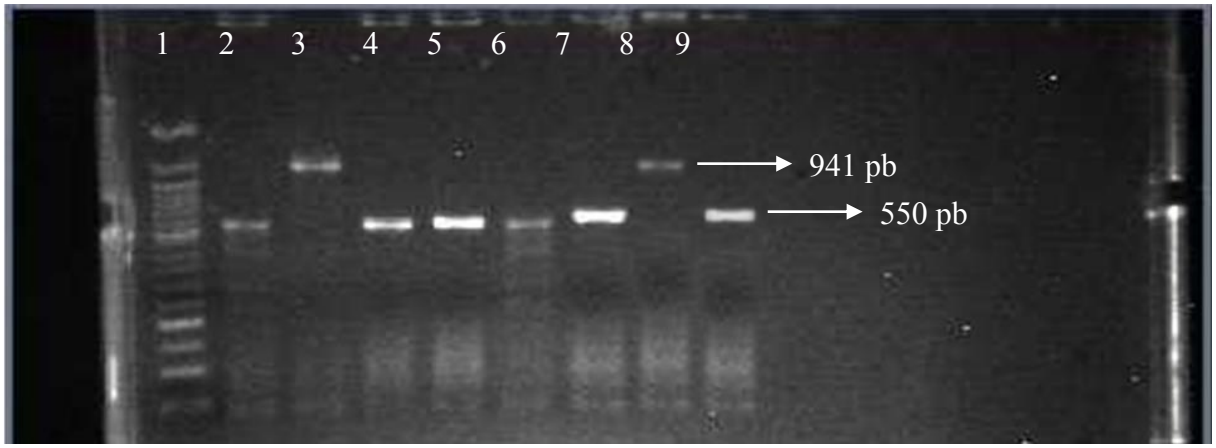
ZDRAGAS, A.; PARTHENIOU, P.; KOTZAMANIDIS, C.; PSONI, L.; KOUTITA, O.; MORAITOU, E.; TZANETAKIS, N.; NIANGOU, M. Molecular characterization of low-level vancomycin-resistant enterococci found in coastal water of Thermaikos Gulf, Northern Greece. **Water Research**, v.42, n.4-5, p.1274-1280, 2008.

ZENG, J.; TENG, F.; MURRAY, B.E. Gelatinase is important for translocation of *Enterococcus faecalis* across polarized human enterocyte-like T84 cells. **Infection and Immunity**, v.73, p.1606-1612, 2005.

ZHU, X.; ZHENG, B.; WANG, S.; WILLEMS, R.J.; XUE, F.; CAO, X.; LI, Y.; BO, S.; LIU, J. Molecular characterisation of outbreak-related strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from an intensive care unit in Beijing, China. **Journal of Hospital Infection**, v.72, n.2, p.147-154, 2009.

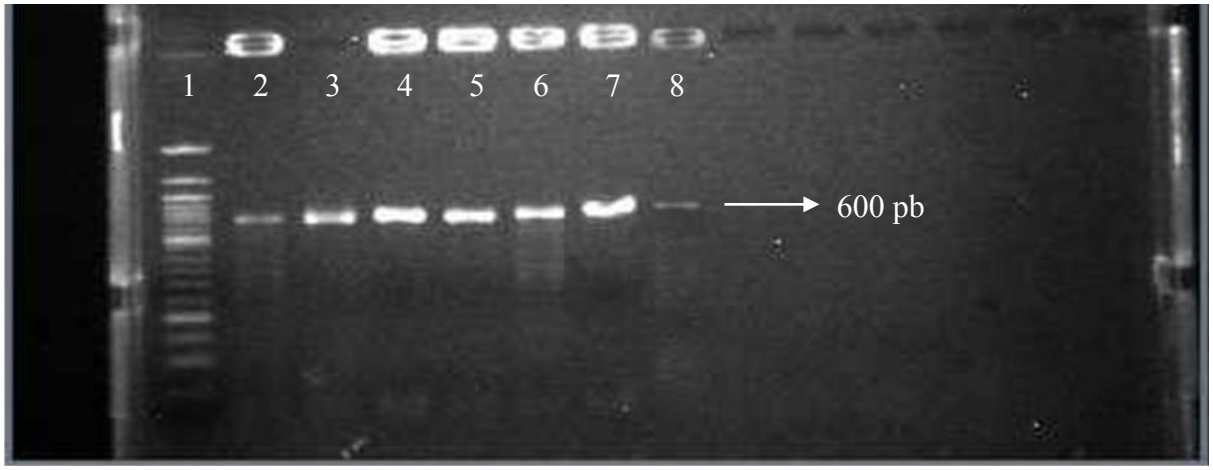
Anexos

Anexo 1 – Gel de agarose a 1% demonstrando a amplificação dos genes que codificam a ligase D-alanina D-alanina (*ddl*) utilizada na confirmação das espécies *E. faecalis* e *E. faecium*.



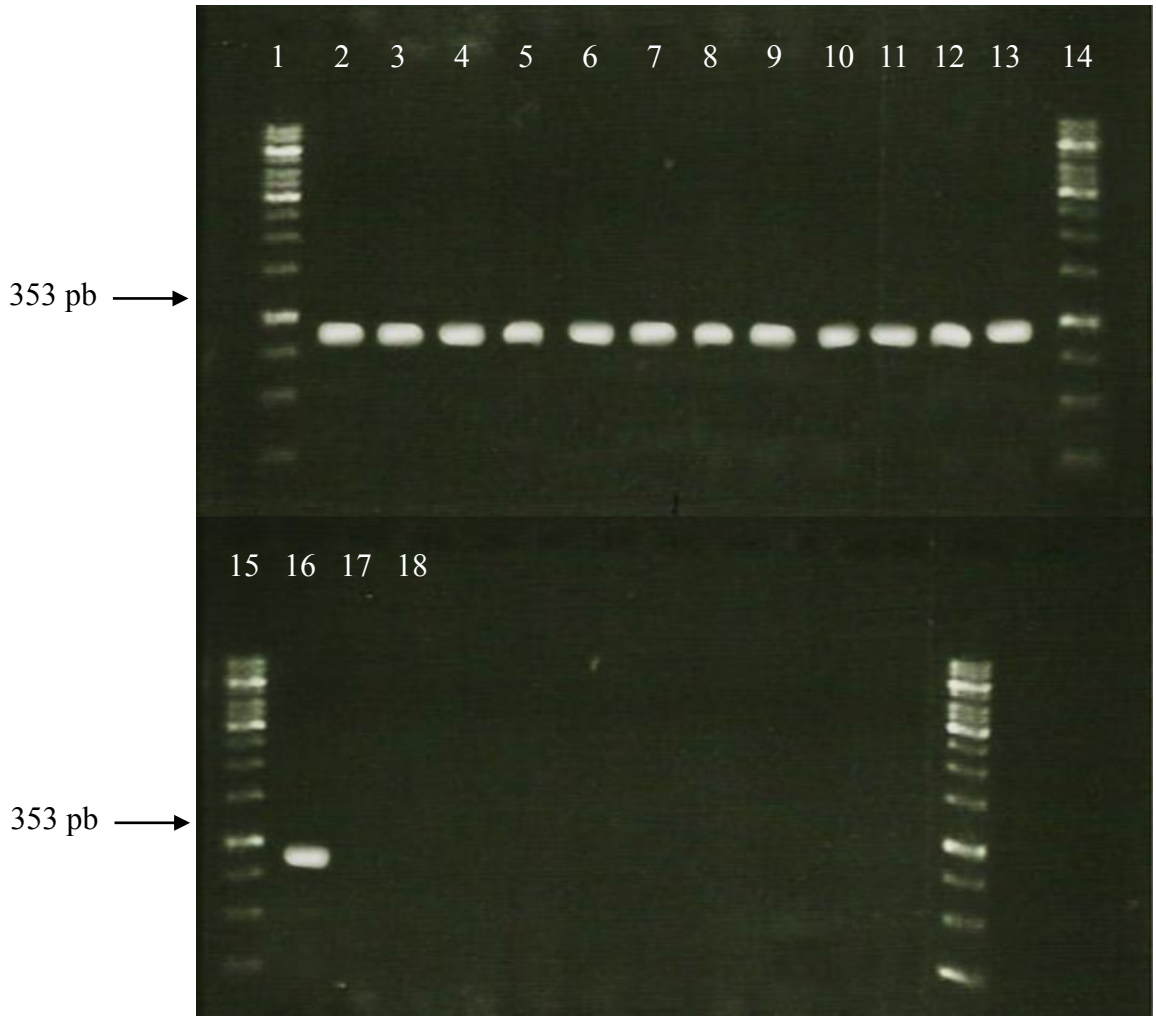
Legenda - Linhas 1: marcador de peso molecular de 100pb, 2: cepa padrão *E. faecium* 228, 3: *E. faecalis* ATCC 29212, 4: *E. faecium* 38, 5: *E. faecium* 11, 6: *E. faecium* 57, 7: *E. faecium* 320, 8: *E. faecalis* 438 e 9: *E. faecium* 402.

Anexo 2 – Gel de agarose a 1% demonstrando a amplificação do gene *vanA*.



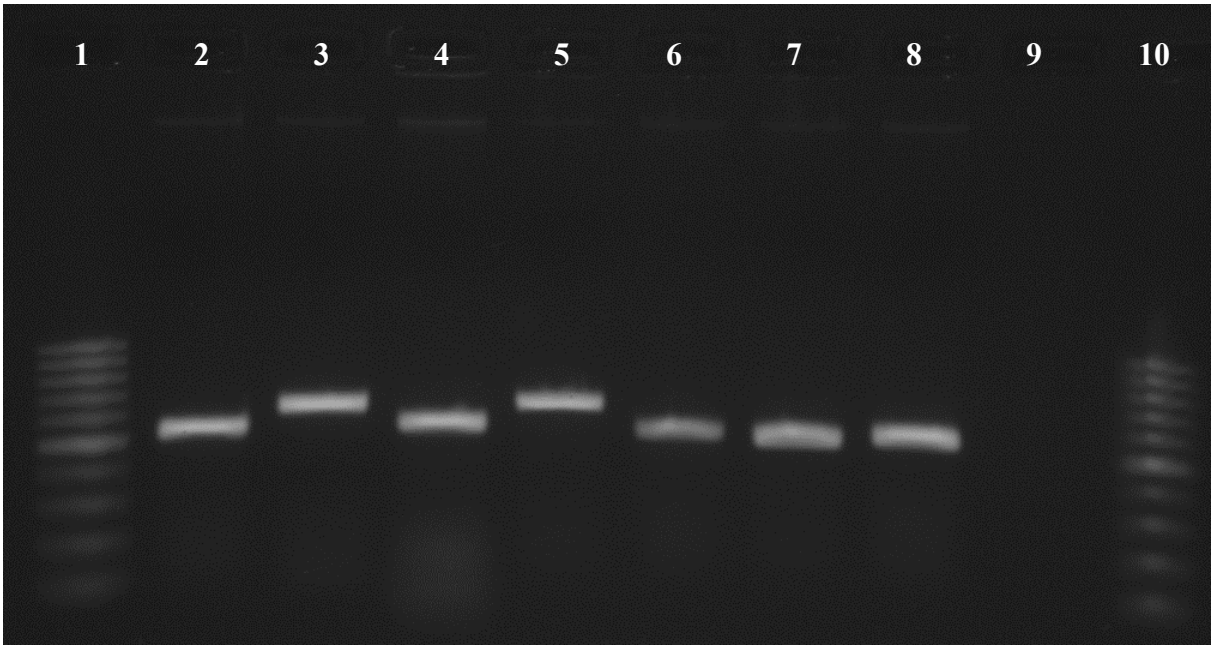
Legenda - Linhas 1: marcador de peso molecular de 100pb, 2: cepa padrão *E. faecium* 228 (*vanA*), 3: *E. faecium* 38, 4: *E. faecium* 11, 5: *E. faecium* 57, 6: *E. faecium* 320, 7: *E. faecalis* 438 e 8: *E. faecium* 402.

Anexo 3 - Produtos de amplificação do gene de virulência (*acm*) das cepas de *E. faecium* após eletroforese em gel de agarose 1%.



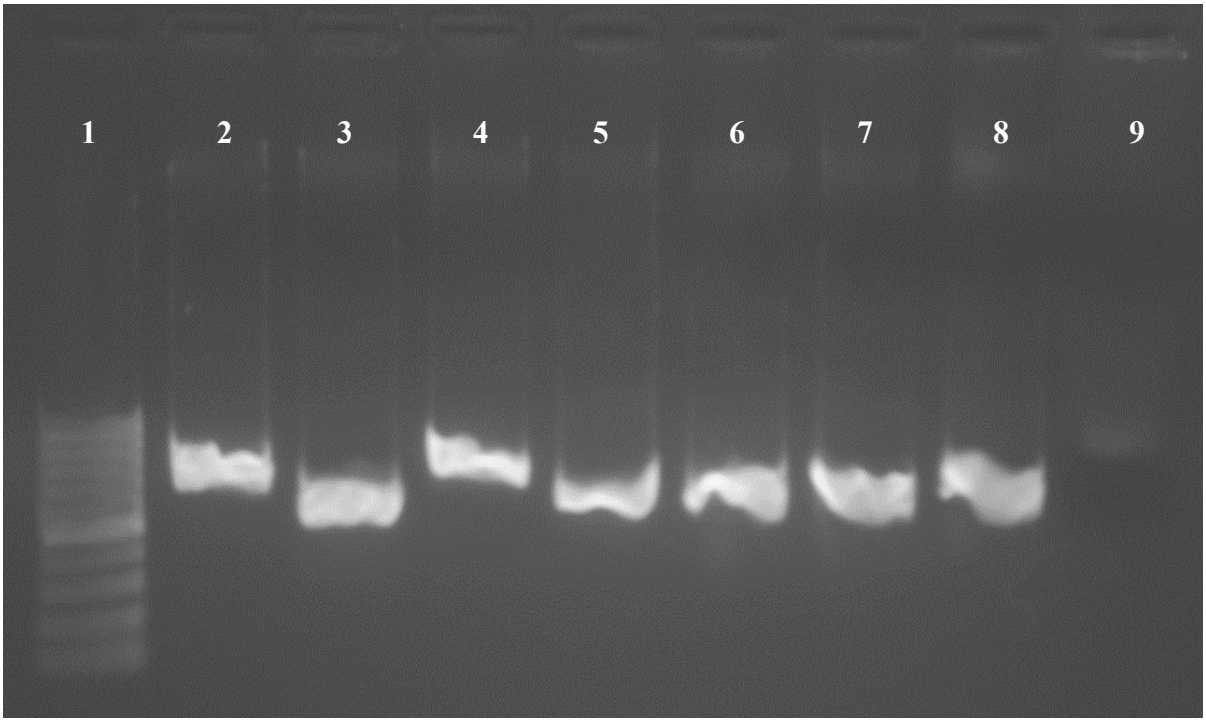
Legenda - Linhas: 1, 14 e 15 marcador de peso molecular de 100pb, 2: *E. faecium* 98A, 3: *E. faecium* 378, 4: *E. faecium* 57*,* 5: *E. faecium* 320*,* 6: *E. faecium* 09*,* 7: *E. faecium* 38*,* 8: *E. faecium* 9, 9: *E. faecium* 11, 10: *E. faecium* 28, 11: *E. faecium 21,* 12: *E. faecium* 55, 13: *E. faecium* 402, 16: *E. faecium* TX0016 (controle positivo), 17: *E. faecalis* JH2-2 (controle negativo) e 18: controle negativo da reação.

Anexo 4 - Amplificação dos sete genes *housekeeping* de *E. faecalis*.



Legenda - Linhas 1 e 10: marcador de peso molecular de 100pb, 2: *dgh* (glicose-6-fosfato desidrogenase), 3: *gyd* (desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato), 4: *pstS* (fosfato de transportador cassete de ligação ATP), 5: *gki* (glucoquinase putativo), 6: *aroE* (5 chiquimato desidrogenase), 7: *xpt* (5 chiquimato desidrogenase), 8: *yiqL* (acetil-coenzima A acetiltransferase) 9: controle negativo.

Anexo 5 - Amplificação dos sete genes *housekeeping* de *E. faecium*.



Legenda - Linhas 1: marcador de peso molecular de 100pb, 2: *atpA* (ATP sintetase, subunidade alfa), 3: *ddl* (Dalanina- D-alanina), 4: *gdh* (Desidrogenase glicose-6-fosfato), 5: *purK* (fosforibosilaminoimidazol carboxilase subunidade ATPase), 6: *gyd* (deidrogenase gliceraldeido-3-fosfato), 7: *pstS* (transportador cassete ligado a ATP fosfato), 8: *adK* (adenilato quinase) e 9: controle negativo.

Anexo 6 – Informações para os Membros da Banca Julgadora de Mestrado/Doutorado.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br

Anexo 7 – Ficha do aluno.

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 6594690/1 - Andrey Guimarães Sacramento

Email:	sacramento@usp.br
Data de Nascimento:	18/02/1982
Cédula de Identidade:	RG - 0785752307 - BA
Local de Nascimento:	Estado da Bahia
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Ciências Biológicas - Universidade Tiradentes - Sergipe - Brasil - 2006
Mestrado:	Mestre em Ciências (1) - Coordenadoria de Controle de Doenças - Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo - Brasil - 2010

Curso:	Doutorado
Programa:	Farmácia (Análises Clínicas)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	11/07/2011
Início da Contagem de Prazo:	11/07/2011
Data Limite para o Depósito:	13/07/2015
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Elsa Masae Mamizuka - 11/07/2011 até o presente. Email: mamizuka@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 11/07/2011
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 24/09/2013
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 11/07/2011

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 09/02/2015
Impresso em: 30/04/2015 14:01:03

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

Anexo 7 – Continuação

9136 - 6594690/1 - Andrey Guimarães Sacramento

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5803-1/4	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	09/08/2011	22/08/2011	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5757-3/2	Tópicos em Análises Clínicas II	09/08/2011	29/11/2011	30	2	85	A	N	Concluída
EDM5102-2/5	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	15/08/2011	25/09/2011	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
EDM5102-2/6	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	18/08/2011	28/09/2011	60	4	80	A	N	Concluída
FBA5728-3/3	Aprimoramento Didático	12/09/2011	09/10/2011	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5707-5/3	Infecção Hospitalar: Recursos Laboratoriais Tradicionais e Avançados na Investigação, Epidemiologia, Profilaxia e Controle	26/09/2011	16/10/2011	75	5	81	A	N	Concluída
FBC5800-4/1	Temas Avançados em Ciências e Tecnologia Farmacêutica I	17/10/2011	23/10/2011	30	2	90	A	N	Concluída
BMM5801-2/3	Vacinas e a Microbiologia (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	21/11/2011	04/12/2011	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5793-10/2	Tópicos em Análises Clínicas I	06/03/2012	26/06/2012	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5771-7/1	Bioinformática Aplicada às Análises Clínicas	10/07/2012	23/07/2012	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	21
Estágios:			
Total:	0	20	21

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria nº 524, de 29.04.2008..

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Anexo 8 – Artigo publicado: SACRAMENTO *et al*., *Environmental dissemination of vanA-containing Enterococcus faecium strains belonging to hospital-associated clonal lineages*, p.1-2, 2015a.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance Access published October 12, 2015

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dkv320

Environmental dissemination of *vanA*-containing *Enterococcus faecium* strains belonging to hospital-associated clonal lineages

Andrey G. Sacramento[1], Louise T. Cerdeira[1], Lara M. de Almeida[1], Rosemeire C. Zanella[2], Carlos Pires[1], Maria I. Z. Sato[3], Emanuela A. S. Costa[4], Natasha P. Roberto[1], Elsa M. Mamizuka[1] and Nilton Lincopan[1,5]*

[1]*Department of Clinical Analysis, School of Pharmacy, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil;* [2]*Bacteriology Branch, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil;* [3]*Environmental Company of São Paulo State (CETESB), São Paulo, Brazil;* [4]*Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil;* [5]*Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*

*Corresponding author. Tel: +55-11-3091-7296; Fax: +55-11-3091-7354; E-mail: lincopan@usp.br

Sir,

Enterococci are ubiquitous in the environment and in the intestinal tract of humans and other animals with which they have a commensal or parasitic relationship. The importance of these bacteria has been associated with nosocomial infection and multiple resistance to antimicrobial agents, mainly vancomycin.[1] In this regard, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREfm) has become endemic in many hospitals, and nowadays Bayesian analysis of genetic population structure and eBURST analysis of MLST have revealed the existence of groups and lineages associated with the majority of hospital outbreaks and clinical infections worldwide.[1,2] In this study, we report for the first time the environmental dissemination of *vanA*-containing *E. faecium* strains belonging to hospital-associated high-risk MLST lineages.

During a local surveillance study, established to monitor the occurrence of high-level VRE from urban rivers in south-eastern Brazil (i.e. the Tietê River and the Pinheiros River), six *vanA* VRE isolates were recovered from surface water samples (Table 1). The Tietê River is one of the main rivers of the region, which runs across São Paulo state from east to west for about 1100 km, whereas the Pinheiros River is a tributary of the Tietê River that runs 25 km through the city of São Paulo, the largest and most populous metropolitan area in Brazil.[3]

Following standard methods for the examination of water and wastewater, 500 mL aliquots of surface water were collected in sterile glass vials (http://www.standardmethods.org). From each water sample, 100 mL was concentrated by filtration through sterile membrane filters (0.45 μm pore size). The filters were placed on M-Enterococcus agar base plates and incubated for 24 h at 37°C. The membrane filters were aseptically removed and placed separately into sterile tubes that had previously been filled with 10 mL of sterile brain heart infusion broth. After vortex treatment, a 100 μL aliquot of each culture was streaked on to M-Enterococcus agar supplemented with 6 mg/L vancomycin. Isolates were identified by PCR[4] and MICs were determined using a microdilution technique.[5] Next, the presence of *van*-type genes was examined by PCR amplification and sequencing,[4] and *vanA*-containing VRE were further characterized by PFGE[4] and MLST (http://pubmlst.org/efaecalis/; http://pubmlst.org/efaecium/). Finally, representative STs of VREfm were selected for complete sequencing to elucidate the structure of the Tn*1546* transposable element associated with *vanA*. Thus, genomic DNA was sequenced using the Ion Torrent PGM platform 400 kit v2 and chip 318 (Life Technologies) and contigs were aligned against Tn*1546* prototype (accession number M97297). The VREfm clinical strain 320/07 belonging to ST478 was used for a comparative analysis (Table 1).

The *vanA* genotype was confirmed in MDR VREfm ($n=5$) and vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* ($n=1$) strains (Table 1). PFGE analysis revealed the presence of the Brazilian endemic clone of VREfm.[4] Moreover, MLST analysis confirmed the environmental dissemination of high-risk MLST lineages of VREfm (ST478, ST412 and ST203), which have been predominant in clinical settings in south-east Brazil.[6] Complete sequences of transposon Tn*1546* from VREfm clinical strain 320/07 (ST478) and environmental strains VREfm 11 (ST412) and VREfm 38 (ST478) showed a Tn*1546*-like element of ~12800 bp, with T7698C *vanA* and G8234T *vanX* mutations.[7] Moreover, deletion of the Tn*1546* left extremity,[7] and the IS*1251* and IS*1216E* sequence inside the *vanHS* and *vanYX* intergenic region, respectively, were also detected (GenBank accession numbers KR349520 and KR047792). In this regard, the IS*1216E* sequence inside the *vanXY* intergenic region constitutes a gene array previously reported for Brazilian VREfm clinical strains alone, denoting a regional characteristic. IS*1216E* has been associated with *tcrB* and *aadE* genes, which confer resistance to copper and aminoglycosides, in *E. faecium* and *Streptococcus agalactiae*, respectively.[8,9] Therefore, IS*1216E* should contribute to rapid acquisition of antimicrobial resistance among species of the clinically important Gram-positive cocci.[10] On the other hand, Tn*1546*-like elements were identical among clinical and environmental VREfm isolates, suggesting sharing of a common vancomycin resistance gene pool.

The detection of *vanA*-containing *E. faecium* strains belonging to hospital-associated clonal lineages in urban rivers is epidemiological evidence demonstrating that the environmental dissemination of high-risk MDR bacteria is ongoing in Brazil. Indeed, isolation of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in both the Tietê River and the Pinheiros River have also been reported.[3,11] Therefore, considering that related STs of *vanA*-carrying VREfm strains (i.e. ST17, ST18, ST78, ST117, ST192, ST280, ST412 and ST478) are widespread in hospital settings,[1,6] speculations on a possible link could be raised, which

© *The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com*

Table 1. Characteristics of environmental *vanA*-containing *E. faecium* and *E. faecalis* strains

Strain[a]	Environmental location (latitude/longitude)	HLAR[b]		MIC (mg/L)[c]											PFGE type[d]	MLST ST
		GEN	STR	VAN	TEC	AMP	TET	CIP	ERY	CHL	LZD	Q/D	DAP	TGC		
VREfm 9, TIET/04900	S 23° 27′ 16″/W 46° 54′ 36″	S	**R**	**>64**	**>32**	**>32**	0.5	**>32**	**>256**	16	2	2	1	0.03	M1	478
VREfm 11, TIET/04900	S 23° 27′ 16″/W 46° 54′ 36″	S	**R**	**>64**	**>32**	**>32**	0.5	**>32**	**>256**	4	1	1	1	0.06	P6	412
VREfm 38, TIET/04180	S 23° 31′ 18″/W 46° 37′ 52″	S	**R**	**>64**	**>32**	**>32**	1	**>32**	**>256**	**>64**	2	**16**	1	0.03	M1	478
VREfm 28, PINH/04250	S 23° 39′ 53″/W 46° 42′ 35″	S	**R**	**>64**	**>32**	**>32**	1	**>32**	**>256**	16	4	2	1	0.03	P6	478
VREfm 21, PINH/04900	S 23° 31′ 52″/W 46° 44′ 54″	S	S	**>64**	**>32**	**>32**	**>64**	**4**	**>256**	8	2	1	1	0.03	P21	203
VREfm 320/07, clinical/blood	S 23° 34′ 59.5″/W 46° 42′ 28″	S	**R**	**>64**	**>32**	**>32**	1	**>64**	**>256**	16	2	1	1	0.01	P6	478
VREfs 29, TIET/04200	S 23° 31′ 11″/W 46° 44′ 47″	S	**R**	**>64**	**>32**	**>32**	1	**>32**	**>256**	**64**	2	**16**	2	0.06	—	4

[a]VREfs, vancomycin-resistant *E. faecalis*; TIET, Tietê River; PINH, Pinheiros River.
[b]Agar dilution screening tests for high-level aminoglycoside resistance (HLAR): GEN, gentamicin (500 mg/L); and STR, streptomycin (2000 mg/L).[5] R, resistant; S, susceptible. Resistance is indicated in bold.
[c]MIC determined by broth microdilution methods; resistance is indicated in bold. VAN, vancomycin; TEC, teicoplanin; AMP, ampicillin; TET, tetracycline; CIP, ciprofloxacin; ERY, erythromycin; CHL, chloramphenicol; LZD, linezolid; Q/D, quinupristin/dalfopristin; DAP, daptomycin; TGC, tigecycline. The 2014 CLSI breakpoints were used to interpret the MIC results,[5] except for tigecycline, for which the EUCAST criteria were applied (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/).
[d]PFGE patterns were analysed using the Dice similarity coefficient and the unweighted-pair group method using the average linkage cluster method (BioNumerics software; Applied Maths, Kortrijk, Belgium). PFGE clusters M and P were assigned based on a <80% similarity of banding patterns. For each PFGE profile, banding patterns with >80% similarity were assigned a numeric subprofile designation. A VREfm strain representative of the Brazilian endemic clone was included in the gel to compare the fingerprint patterns.[4]

demonstrates the potential of *vanA* VRE to spread beyond the hospital.

In summary, to our knowledge, this is the first study showing the environmental dissemination of VREfm strains belonging to hospital-associated high-risk MLST lineages, which is a major public health issue. The surveillance of resistance in environmental samples from urban regions needs to be established as a priority, and strategies for the treatment of wastewater urgently need to be adopted to inhibit the release of MDR bacteria into the environment.

Acknowledgements

FAPESP and CNPq research grants are gratefully acknowledged. N. L. is a research fellow of CNPq. A. G. S. is the recipient of a postgraduate fellowship from CNPq. We thank Cefar Diagnóstica Ltda (São Paulo, Brazil) for kindly supplying antibiotic discs for susceptibility testing.

Funding

This work was funded by research grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Transparency declarations

None to declare.

References

1 Cattoir V, Leclercq R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 731–42.

2 Willems RJ, Top J, van Schaik W *et al*. Restricted gene flow among hospital subpopulations of *Enterococcus faecium*. *MBio* 2012; **3**: e00151-12.

3 Oliveira S, Moura RA, Silva KC *et al*. Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers. *J Antimicrob Chemother* 2013; **69**: 849–52.

4 Zanella RC, Brandileone MC, Bokermann S *et al*. Phenotypic and genotypic characterization of VanA *Enterococcus* isolated during the first nosocomial outbreak in Brazil. *Microb Drug Res* 2003; **9**: 283–91.

5 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fourth Informational Supplement M100-S24*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2014.

6 Silva LPP, Pitondo-Silva A, Martinez R *et al*. Genetic features and molecular epidemiology of *Enterococcus faecium* isolated in two university hospitals in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; **74**: 267–71.

7 Willems RJ, Top J, van den Braak N *et al*. Molecular diversity and evolutionary relationships of Tn*1546*-like elements in enterococci from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 483–91.

8 Hasman H. The *tcrB* gene is part of the *tcrYAZB* operon conferring copper resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Microbiology* 2005; **151**: 3019–25.

9 Montilla A, Zavala A, Cáceres Cáceres R *et al*. Genetic environment of the *lnu*(B) gene in a *Streptococcus agalactiae* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 5636–7.

10 Paulsen IT, Banerjei L, Myers GS *et al*. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 2003; **299**: 2071–4.

11 Fontes LC, Neves PR, Oliveira S *et al*. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* coproducing metallo-β-lactamase SPM-1 and 16S rRNA methylase RmtD1 in an urban river. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 3063–4.

Anexo 9 – Artigo aceito para publição: SACRAMENTO *et al*., *Identification of New Sequence Types among Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis carrying vanA gene in Retail Chicken Meat*, 2015b.

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Global Antimicrobial Resistance
Manuscript Draft

Manuscript Number: JGAR-D-15-00127R1

Title: Identification of New Sequence Types among Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis carrying vanA gene in Retail Chicken Meat

Article Type: Letter (to the Editor)

Keywords: Enterococcus spp; vancomycin; vanA; MLST; food animals

Corresponding Author: Dr. Nilton Lincopan,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Andrey Sacramento

Order of Authors: Andrey Sacramento; Rosemeire C Zanella; Lara de Almeida; Carlos Pires; Cecília Popazoglo; Emanuela Costa; Louise Cerdeira; Elsa Mamizuka; Nilton Lincopan

Manuscript

Identification of New Sequence Types among *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Carrying *vanA* Gene in Retail Chicken Meat

Andrey G. Sacramento, *Department of Clinical Analysis, School of Pharmacy,Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*

Rosemeire C. Zanella, *Bacteriology Branch, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil*

Lara M. de Almeida, Carlos Pires, Cecília Popazoglo, *Department of Clinical Analysis, School of Pharmacy, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*

Emanuela A. S. Costa, *Department of Infectious Diseases, School of Medicine, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*

Louise T. Cerdeira, *Department of Clinical Analysis, School of Pharmacy, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*

Elsa M. Mamizuka, *Department of Clinical Analysis, School of Pharmacy, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*

Nilton Lincopan*, *Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, Department of Clinical Analysis, School of Pharmacy, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*

***Corresponding author**

Tel.: +55 11 3091 7296;

fax: +55 11 3091 7354

E-mail address: lincopan@usp.br (N. Lincopan).

Sir,

In the last years, vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) have been increasingly identified in humans and animals, and their potential transmission by contaminated food has been highlighted [1]. In this regard, some studies have documented the worldwide dissemination of particular vancomycin-resistant *E. faecalis* clones isolated from healthy and infected humans and other animals [2]. In this study, we report the isolation of new sequence types (STs) of *vanA*-containing *Enterococcus* spp. in retail chicken meat, in Brazil, highlighting a potential community reservoir of VRE.

During the Brazilian National Program for Monitoring the Prevalence of Bacterial Resistance in Chicken (PREBAF), six VRE (1%) isolates were recovered from a total of 542 frozen retail chicken samples, intended for sale on local markets, in all five Brazilian regions (i.e., North, Northeast, Central West, Southeast and South). Firstly, *Enterococcus* spp. were isolated by using methods described in the U.S. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063335.htm). Next, positive cultures were plated on Enterococcosel agar without and with vancomycin (6 µg/mL), and isolated colonies were identified by using conventional biochemical tests and PCR [3]. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by microdilution technique [4]; the presence of *van*-type genes was examined for PCR amplification and sequencing by using specific primers as previously described [3]; and finally, *vanA*-containing VRE were further characterized by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) [3] and multilocus sequence typing (MLST) (http://pubmlst.org/efaecalis/; http://pubmlst.org/efaecium/).

50 The presence of *Enterococcus* spp., was confirmed in 535 (98.7%) retail chicken samples,
51 which were distributed among twelve species, with a predominance of *E. faecalis* (61.4%), *E.*
52 *gallinarum* (28.7%), *E. casseliflavus* (5.06%) and *E. faecium* (2.2%). The *vanA* genotype was
53 confirmed in six multidrug- and vancomycin-resistant strains, identified as *E. faecalis* (VREfs,
54 *n*= 4) and *E. faecium* (VREfm, *n*= 2), which were isolated from retail chicken samples collected
55 from markets in four states located in Southeast and Southern Brazil. The *vanA*-containing VRE
56 isolates exhibited resistance to several antimicrobial drugs used for the treatment of
57 enterococcal infections in humans (Table 1). In this regard, while resistance to
58 quinupristin/dalfopristin in VREfs strains is intrinsic [5], in VREfm this resistance can be
59 related to the use of virginiamycin, which may produce cross-resistance to
60 quinupristin/dalfopristin [5]. Furthermore, use of antimicrobial growth promotants such as
61 oxytetracycline, enrofloxacin, florfenicol and tylosin; which are structurally related to
62 tetracycline, ciprofloxacin, chloramphenicol and erythromycin, respectively, can be associated
63 with the antibiotic resistance profile displayed by *vanA*-containing VRE isolates from retail
64 chicken meat [6].
65
66 VRE strains were clonally unrelated by PFGE and, indeed, MLST analysis revealed the
67 presence of VREfs ST59 and five new STs (i.e., VREfs ST614, ST615, ST616, and VREfm
68 ST953 and ST954) (Table 1). In this regard, of particular interest is the description of VREfs
69 belonging to the ST59, which has been previously isolated from chicken meat and human
70 samples [2], denoting the potential for VRE or *van*-type genes of VRE to reach humans through
71 the food chain. On the other hand, identification of novel STs of *vanA*-type vancomycin-
72 resistant *Enterococcus* spp. suggests that comercial chicken could provide a hotspot for the
73 transfer of *vanA*-mediated resistance among commensal enterococci, which is a worrisome

prospect, since VRE of commensal origin can play key roles as opportunistic pathogens of human and other animals that can serve as hosts.

Regarding the possible origin of *vanA*-containing *Enterococcus* spp., most likely, the use of some antibiotics (e.g. tylosin and spiramycin) in broiler chickens; which are used for the control of chronic respiratory diseases caused by mycoplasmas and as subtherapeutic agents for improving growth rates and feed efficiency, could be to co-select for vancomycin resistance among enterococci, since the genes encoding resistance for these antimicrobial agents have been located on the same plasmid [7].

In summary, to our knowledge, this is the first Brazilian study showing retail chicken meat as an important vehicle for the dissemination of *vanA*-containing *Enterococcus* spp., which is a major commercial and public health issue, since Brazil is the third largest producer of chicken meat and the largest exporter of this product [8].

Declarations

Funding: This work was funded by research Grant from the Agência Nacional de Vigilância Sanitária–ANVISA (Brazilian National Health Agency) of the Ministério da Saúde-MS (Ministry of Health), National Program for Monitoring Bacterial Prevalence and Resistance in Chicken (PREBAF), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Competing Interests: None declared.

Ethical Approval: Not required.

99 **References**

100 [1] Getachew Y, Hassan L, Zakaria Z, Aziz SA. Genetic variability of vancomycin-resistant
101 *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates from humans, chickens, and pigs in
102 Malaysia. Appl Environ Microbiol 2013; 79: 4528–33.
103 [2] Freitas AR, Novais C, Ruiz-Garbajosa P, Coque TM, Peixe L. Clonal expansion within
104 clonal complex 2 and spread of vancomycin-resistant plasmids among different genetic lineages
105 of *Enterococcus faecalis* from Portugal. J Antimicrob Chemother 2009; 63: 1104–11.
106 [3] Zanella RC, Brandileone MC, Bokerman S, Almeida SC, Valdetaro F, Vitório F, Moreira
107 Mde F, Villins M, Salomão R, Pignatari AC. Phenotypic and genotypic characterization of
108 VanA *Enterococcus* isolated during the first nosocomial outbreak in Brazil. Microb Drug Res
109 2003; 9: 283-91.
110 [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial
111 susceptibility testing; twenty-five informational supplement. Document M100-S25. Wayne,
112 PA: CLSI; 2015
113 [5] McDermott PF, Cullen P, Hubert SK, McDermott SD, Bartholomew M, Simjee S, Wagner
114 DD. Changes in antimicrobial susceptibility of native *Enterococcus faecium* in chickens fed
115 virginiamycin. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 4986-91.
116 [6] Marshall BM, Levy SB. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. Clin
117 Microbiol Rev 2011; 24: 718-33.
118 [7] Aarestrup FM. Characterization of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* (GRE)
119 from broilers and pigs in Denmark: genetic evidence that persistence of GRE in pig herds is
120 associated with coselection by resistance to macrolides. J Clin Microbiol 2000; 38: 2774–7.
121 [8] Alves J, Marques VV, Pereira LFP, Hirooka EY, de Oliveira TCRM. Multiplex PCR for the
122 detection of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. in chicken meat. J Food Saf 2012; 32:
123 345–50.

Table 1

Epidemiological and microbiological characteristics of of *vanA*-containing *Enterococcus* spp. isolated from retail chicken meat

Strain	State[a]/year	PFGE type[b]	MLST ST/CC[c]	HLAR[d]		Resistance profile MIC (µg/mL)[e]										
				GEN	STR	VAN	TEC	AMP	TET	CIP	ERY	CHL	LZD	Q/D	DAP	TGC
E. faecalis 92	RS/2004	A	614/N	**R**	**R**	**64**	**>32**	2	**>64**	**>64**	**>64**	**64**	2	**>32**	2	0.03
E. faecalis 96	RS/2004	B	615/21	**R**	**R**	**64**	**>32**	4	**64**	**>64**	**>64**	**64**	2	**32**	1	0.12
E. faecalis 154	ES/2005	C	59/N	**R**	**R**	**64**	**32**	4	8	**64**	**64**	**64**	2	**16**	2	0.12
E. faecalis 438	SP/2005	D	616/S	S	**R**	**64**	**32**	2	**64**	0.5	0.5	16	1	**16**	0.5	0.12
E. faecium 402	SP/2005	I	954/N	S	S	**64**	**>64**	1	**>64**	0.25	**8**	8	2	**16**	1	0.06
E. faecium 55	SC/2004	II	953/N	S	**R**	**>64**	**64**	0.25	**>64**	**4**	0.25	8	1	**>32**	2	0.12

[a] RS, Rio Grande do Sul State; ES, Espírito Santo State; SP, São Paulo State; SC, Santa Catarina State.

[b] PFGE patterns were analyzed using the Dice similarity coefficient and the unweighted-pair group method using the average linkage cluster method (BioNumerics software; Applied Maths, Kortrijk, Belgium). PFGE clusters were assigned based on a <90% similarity of banding patterns.

[c] Multilocus sequence typing; ST, sequence type; CC, clonal complex; N, sequence types that are not assigned to any known CC; S, singleton.

[d] High-level aminoglycoside resistance (HLAR) was determined by agar dilution method. GEN, gentamicin (500 µg/mL) and STR, streptomycin (2000 µg/mL).

[e] MICs were determined by microdilution technique; resistance is indicated in bold. VAN, vancomycin; TEC, teicoplanin; AMP, ampicillin; TET, tetracyclin; CIP, ciprofloxacin; ERY, erythromycin; CHL, chloramphenicol; LZD, linezolid; Q/D, quinopristin/dalfopristin; DAP, daptomycin; TGC, tigecycline. The 2014 CLSI breakpoints were used to interpret the MIC results [4], except for tigecycline, for which the EUCAST criteria (resistant >0.5 µg/mL) was applied (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/).