

Ricardo Jorge Ribeiro Escada

**DISSEMINAÇÃO HORIZONTAL DE ELEMENTOS DE INSERÇÃO
CROMOSSOMAL ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA À AMPICILINA EM *E.*
FAECIUM ORIUNDOS DE DIFERENTES NICHOS ECOLÓGICOS**

Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012

Ricardo Jorge Ribeiro Escada

**DISSEMINAÇÃO HORIZONTAL DE ELEMENTOS DE INSERÇÃO
CROMOSSOMAL ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA À AMPICILINA EM *E.*
FAECIUM ORIUNDOS DE DIFERENTES NICHOS ECOLÓGICOS**

Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012

Ricardo Jorge Ribeiro Escada

**DISSEMINAÇÃO HORIZONTAL DE ELEMENTOS DE INSERÇÃO
CROMOSSOMAL ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA À AMPICILINA EM *E.*
FAECIUM ORIUNDOS DE DIFERENTES NICHOS ECOLÓGICOS**

Assinatura:

Dissertação apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Clínica sob a orientação da Professora Doutora Carla Novais (Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa/ REQUIMTE-Grupo Micro. Faculdade Farmácia. Universidade do Porto)

O presente trabalho resultou de uma colaboração da Universidade Fernando Pessoa com o REQUIMTE (Laboratório Associado)/Grupo de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Financiamento:

-Universidade Fernando Pessoa.
-REQUIMTE-Financiamento Plurianual (Fundação para a Ciência e a Tecnologia, no.
PEst-C/EQB/LA0006/2011)

SUMÁRIO

Nas últimas décadas, *E. faecium* tornou-se um dos agentes patogênicos nosocomiais mais comuns, estando associado ao globalmente disseminado complexo clonal 17 (CC17). O sucesso da subpopulação policlonal CC17 parece estar relacionada com a aquisição de características que aumentam a sua epidemicidade, algumas das quais maioritariamente associadas a esta linhagem genética. Essas características incluem a resistência a antibióticos (ex. ampicilina e fluoroquinolonas) ou uma maior capacidade em colonizar e infectar diferentes hospedeiros (fatores de virulência *fms*, *esp*, *hyl*, genes que codificam para algumas vias metabólicas). Enquanto a ocorrência de *esp* e *hyl* varia entre *E. faecium*-CC17, a maioria dos isolados apresenta níveis elevados de resistência à ampicilina. No entanto, a disseminação horizontal da resistência a este antibiótico (mediada pelo gene *pbp5*) é um processo ainda pouco explorado. Assim, o objetivo principal deste estudo consistiu em estudar a mobilização de *pbp5* a partir de *E. faecium* oriundos de vários nichos ecológicos e caracterizar as plataformas genéticas móveis que transportam este gene.

A transferência horizontal da ampicilina foi detetada entre bactérias selvagens de várias origens (hospital e comunidade) e bactérias recetoras com diferentes contextos genéticos (*pbp5*⁺/*pbp5*⁻; diferentes STs). Todas as bactérias selvagens que disseminaram o gene *pbp5* pertenciam ao CC17. A resistência à ampicilina persistiu nas estirpes selvagens e nos transconjugantes mesmo na ausência de pressão seletiva. A expressão da resistência à ampicilina foi variável (CMI=8-128mg/L) nos transconjugantes e a cotransferência da resistência a outros antibióticos (ex. vancomicina, eritromicina, estreptomicina) também foi detetada. O gene *pbp5* adquirido foi identificado em bandas cromossomais de elevado e variável tamanho (170-250kb) em *E. faecium* selvagens e em todos os transconjugantes obtidos. Nas bactérias recetoras *pbp5*⁺ esta transferência horizontal não implicou, em todos os casos, a substituição da plataforma natural que contém *pbp5*, e os rearranjos no DNA ocorreram com frequência e diversidade em diferentes transconjugantes.

A caracterização do ambiente genético de *pbp5* e a análise *in silico* de sequências disponíveis em bases de dados (GenBank) permitiu a identificação de cinco plataformas genéticas distintas (I-V), diferenciadas pela presença de sequências de inserção (*ISEf1*, *ISEfa11*), fragmentos genômicos (*ISEfm1*+acetiltransferase+histidinol fosfato fosfatase) ou do transposão conjugativo Tn5382. Algumas destas plataformas (I, II, IV) eram comuns em *E. faecium* de diferentes nichos ecológicos, STs e países. Contrastando com outros estudos, os *E. faecium* portugueses não possuíam plataformas com os transposões conjugativos CTn5382, CTn5386 ou CTn916, anteriormente associados à transferência horizontal de *pbp5*.

A presença de um elevado polimorfismo (traduzindo-se em alterações aminoacídicas cujas combinações foram designadas de C1 a C12) foi observado entre as sequências de *pbp5* analisadas oriundas de *E. faecium* que transferiram *pbp5*. Esta variabilidade pode refletir a disseminação de um fragmento de DNA portador de *pbp5* de elevado tamanho que evoluiu independentemente em diferentes hospedeiros que estão sob pressão seletiva. Esta hipótese é sugerida pela variabilidade de sequências de *pbp5* localizadas em regiões com um conteúdo em IS semelhante e pertencendo a linhagens genéticas próximas (STs de CC17 que são SLV entre eles).

A manutenção do elemento genético portador de *pbp5* adquirido na ausência de pressão seletiva e a sua transferência sob concentrações subinibitórias de ampicilina pode explicar a rápida expansão da resistência a este antibiótico entre *E. faecium* nosocomiais ao longo das últimas décadas. O uso intensivo de ampicilina pode também contribuir para a disseminação da resistência a outros antibióticos e para a manutenção e evolução de *E. faecium*-CC17 em diferentes hospedeiros e nichos ecológicos.

ABSTRACT

In the last decades, *E. faecium* has become one of the most common nosocomial pathogens, associated with the disseminated worldwide clonal complex 17 (CC17). The success of the CC17 subpopulation seems to be related to the acquisition of features increasing its epidemicsity, some of which mostly associated with this CC. They include antibiotic resistance (e.g. ampicillin and fluoroquinolones) or a greater ability to colonize and infect different hosts (virulence factors coded by *fms*, *esp* *hyl*, genes coding for some metabolic pathways). While the occurrence of *esp* and *hyl* genes is variable among *E. faecium*-CC17, all isolates show resistance to ampicillin. However, the horizontal spread of the genes codifying for the resistance to this antibiotic (*pbp5* gene) remains scarcely explored. Thus, the main objective of this study was to study the mobilization of *pbp5* from *E. faecium* of different ecological niches and to characterize the genetic mobile platforms carrying this gene.

The horizontal transfer of ampicillin was detected between wild bacteria from various sources (hospital and community) and recipient bacteria with different genetic contexts (*pbp5*⁺/*pbp5*⁻; different STs). All the wild *E. faecium* transferring *pbp5* gene belonged to CC17. Ampicillin resistance persisted in wild strains and transconjugants, even in the absence of selective pressure. The expression of ampicillin resistance was variable (MIC 8-128mg/L) in the different transconjugants and the cotransfer of resistance to other antibiotics (e.g. vancomycin, erythromycin, streptomycin) was also detected.

The acquired *pbp5* gene was chromosomal located and bands of high and variable sizes (170-250kb) were detected among wild strains and transconjugants. In *pbp5*⁺ receptor bacteria this horizontal transfer did not seem to replace the natural platform containing *pbp5* in all cases, and rearrangements in the DNA were frequent and diverse among transconjugants.

The characterization of *pbp5* genetic environment and the *in silico* analysis of sequences available in genetic databases (GenBank) allowed the identification of five distinct genetic platforms (I-V), distinguished by the presence of insertion sequences (ISEf1,

ISEfa11) genomic fragments (ISEfm1+acetyltransferase+histidinol phosphate phosphatase) or the conjugative transposon Tn5382. Some of these platforms (I, II, IV) were common among *E. faecium* from different ecological niches, STs and countries. In contrast to other studies, Portuguese *E. faecium* did not carry platforms with the conjugative transposons CTn5382, CTn5386 or CTn916, previously associated with horizontal transfer of *pbp5*.

The detection of a high polymorphism (translated in amino acid alterations which combinations were named C1 to C12) was detected among the acquired *pbp5* sequences. This variability may reflect the dissemination of a large DNA fragment carrying *pbp5*, which evolved independently in different hosts that are under selective pressure. This hypothesis is suggested by the sequence variability of *pbp5* sequences located in regions with a similar IS content and belonging to closed genetic lineages (CC17 STs that are SLV from each other).

The maintenance of the acquired *pbp5*-platform in the absence of selective pressure and their transfer under ampicillin subinhibitory concentrations may explain the rapid expansion of resistance to this antibiotic among nosocomial *E. faecium* over the past decades. The intensive use of ampicillin can also contribute to the spread of resistance to other antibiotics and consequently to the maintenance and evolution of *E. faecium*-CC17 in different hosts and ecological niches.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora Professora Doutora Carla Novais pela oportunidade, disponibilidade e transmissão de todos os conhecimentos que necessitei durante todo o Mestrado.

Queria também agradecer à Professora Dra. Eduarda Silveira pelo apoio técnico que me concedeu e também à Professora Doutora Luísa Peixe (REQUIMTE-Laboratório Associado/Grupo de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto) pela cedência das estirpes bacterianas, fundamentais para a realização deste projeto.

Aos professores coordenadores do mestrado agradeço a simpatia e a disponibilidade demonstrada ao longo destes últimos anos, bem como as condições que criaram para o desenvolvimento de projetos de investigação em Microbiologia.

Também gostaria de agradecer ao Ricardo Silva pelo apoio técnico prestado no laboratório, assim como aos restantes colegas do Mestrado pela simpatia, companheirismo e bom ambiente de trabalho.

À Univeridade Fernando Pessoa o meu agradecimento pelo facto de me ter permitido realizar este projeto e ter fornecido as instalações próprias para a realização do mesmo.

Finalmente, gostaria de agradecer aos meus pais pelo amor e carinho, aos amigos e à Silvia por todo o apoio incondicional que me deram para o sucesso deste projeto.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	21
1. Características gerais do género <i>Enterococcus</i>	21
2. Epidemiologia da resistência aos antibióticos em <i>Enterococcus</i> spp de vários nichos ecológicos.....	22
3. Estrutura populacional de <i>Enterococcus</i> spp.....	26
4. Mecanismo de ação e de resistência natural aos β -lactâmicos.....	31
5. Mecanismos de resistência adquirida a β -lactâmicos.....	33
5.1. Produção de β -lactamases.....	33
5.2. <i>Penicillin-binding proteins</i> (PBPs).....	34
6. Mecanismos associados à diversidade genética bacteriana e sua contribuição para a virulência e resistência aos antibióticos.....	41
6.1. Elementos genéticos móveis adquiridos por <i>Enterococcus</i> spp.....	44
6.2. Disseminação horizontal da resistência à ampicilina em <i>Enterococcus</i> spp....	51
II. OBJETIVOS	57
III. MATERIAL E MÉTODOS	59
1. Isolados bacterianos.....	59
2. Pesquisa de β -lactamases.....	59
3. Avaliação da capacidade de transferência horizontal de <i>pbp5</i>	60
3.1. Ensaio de conjugação.....	60
3.2. Confirmação de transconjugantes.....	60
4. Avaliação da relação clonal.....	63
4.1. Eletroforese em campo pulsado.....	63
4.2. <i>Multi Locus Sequence Typing</i> (MLST).....	64

5. Avaliação da estabilidade da resistência à ampicilina	66
6. Pesquisa da localização genómica do gene <i>pbp5</i>	66
7. Caracterização da variabilidade alélica do gene <i>pbp5</i> e do seu ambiente genético	68
7.1. Variabilidade alélica do gene <i>pbp5</i>	68
7.2. Estudo do ambiente genético da região de inserção do gene <i>pbp5</i>	69
8. Estudos bioinformáticos	70
9. Outros estudos moleculares	71
9.1. Pesquisa de transposões conjugativos	71
IV. RESULTADOS.....	75
1. Transferência horizontal do gene <i>pbp5</i> para a bactéria recetora <i>E. faecium</i> GE1 (<i>pbp5</i> ⁻).....	75
2. Transferência horizontal do gene <i>pbp5</i> para as recetoras de <i>E. faecium</i> BM4105RF e 64/3 (<i>pbp5</i> ⁺)	77
3. Análise da estabilidade da resistência à ampicilina	78
4. Avaliação da cotransferência da resistência a diferentes classes de antibióticos ...	80
5. Análise da estrutura populacional de <i>E. faecium</i> que transferem e não transferem o gene <i>pbp5</i>	80
6. Avaliação da localização genómica do gene <i>pbp5</i>	84
7. Pesquisa de transposões conjugativos.....	85
8. Avaliação da variabilidade alélica do gene <i>pbp5</i>	89
9. Caracterização do ambiente genético do gene <i>pbp5</i>	90
9.1. Amplificação de fragmentos de DNA das regiões que flanqueiam o gene <i>pbp5</i> por PCR.....	90
10. Estudos de bioinformática	97
10.1. Variedade do ambiente genético de <i>pbp5</i>	97
10.2. Alterações aminoacídicas em PBP5	98

V. DISCUSSÃO	102
VI. CONCLUSÃO	112
VII. BIBIOGRAFIA	113
VIII. ANEXOS.....	ERRO! MARCADOR NÃO DEFINIDO.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mutações descritas para o gene <i>pbp5</i> de <i>E. faecium</i> associadas a uma diminuição da afinidade para os antibióticos β -lactâmicos.	37
Tabela 2. Plasmídeos sequenciados descritos em <i>Enterococcus</i> spp que transportam genes que codificam para a resistência aos agentes antimicrobianos e outras características (adaptada de (Palmer, Kos & Gilmore 2010)).	45
Tabela 3. Transposões descritos em <i>Enterococcus</i> spp.	48
Tabela 4. Bactérias recetoras utilizadas nos ensaios de conjugação.	61
Tabela 5. Bactérias selvagens resistentes à ampicilina e bactérias recetoras usadas nos diferentes ensaios de conjugação.	62
Tabela 6. Descrição da sequência nucleotídica dos <i>primers</i> e das condições de amplificação usadas nas reações de PCR para o método MLST e na pesquisa de transposões conjugativos.	73
Tabela 7. Características epidemiológicas das bactérias selvagens que transferiram a resistência à ampicilina para <i>E. faecium</i> GE1 e CMI para a ampicilina das estirpes selvagens e respetivos transconjugantes.	75
Tabela 8. Características epidemiológicas das bactérias selvagens que transferiram a resistência à ampicilina para <i>E. faecium</i> BM4105RF e <i>E. faecium</i> 64/3 e CMI para a ampicilina das estirpes selvagens e respetivos transconjugantes.	79
Tabela 9. Resistências a diferentes famílias de antibióticos cotransferidas com a resistência à ampicilina para os transconjugantes obtidos.	81

Tabela 10. Estrutura populacional de <i>E. faecium</i> que transferem o gene <i>pbp5</i> para as bactérias recetoras.....	83
Tabela 11. Avaliação do tamanho dos fragmentos que hibridaram com <i>pbp5</i> em <i>E. faecium</i> selvagens de vários nichos ecológicos e STs (CC17), e respetivos transconjugantes.	88
Tabela 12. Distribuição das diferentes combinações de alterações aminoacídicas em PBP5 e tipo de ambiente genético observados em <i>E. faecium</i> que transferem e não transferem <i>pbp5</i> pertencentes a diferentes nichos ecológicos e STs.	91
Tabela 13. Bactérias selvagens, recetoras e transconjugantes em que se caracterizou por PCR e RFLP a região genómica entre os genes <i>N-acyl-glucosamine-6-phosphate-2-epimerase</i> e <i>ftsW</i> (<i>primers</i> P6 e P7), <i>ftsW</i> , <i>psr</i> e <i>pbp5</i> (<i>primers</i> P2 e P3), <i>pbp5</i> e bomba de efluxo de iões (<i>primers</i> P4 e P5) e bomba de efluxo de iões e proteína hipotética (<i>primers</i> P8 e P9). Legenda : N.D. – Não determinado, (-) – Sem Amplificação.....	94
Tabela 14. Caracterização das diferentes plataformas genéticas (I-V) que incluem o gene <i>pbp5</i> obtidas de isolados deste estudo e após pesquisa <i>in silico</i> de sequências disponíveis no GenBank.	100
Tabela 15. Substituições de aminoácidos da proteína PBP5 detetadas em isolados de <i>E. faecium</i> deste estudo e em sequências disponíveis no GenBank.	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Posicionamento filogenético de *Enterococcus* spp relativamente a outros gêneros de bactérias de Gram positivo (sequenciação do rRNA da subunidade 16S) (*International Journal of Food Microbiology*, 2003, Vol. 88, p. 123-131, doi: 10.1016/50168-1605(03)00175-2, reproduzido com permissão da *American Society for Microbiology*-Anexo 1).....21

Figura 2. Representação esquemática das linhagens genéticas (*Sequence types*-STs) de *E. faecium* de diversos nichos ecológicos. Cada ST é representado por um ponto, sendo que o tamanho de cada ponto é indicador da prevalência dos isolados pertencentes a esse ST. As linhas ligam os diferentes SLVs (*Single Locus Variants* que são STs que diferem em um alelo entre si). As cores indicam os diferentes nichos ecológicos de que são provenientes os isolados e os CCs (Complexos Clonais) são representados por círculos a tracejado (CC1, CC5, CC9, CC17, CC22 e CC94) (*Applied and Environmental Microbiology*, 2009, Vol. 75, No. 14, p. 4904-4908, doi:10.1128/AEM.02945-08, reproduzido com permissão da *American Society for Microbiology*-Anexo 1).....29

Figura 3. Representação esquemática dos acontecimentos que parecem ter levado à prevalência de CC17 no nicho hospitalar. A aquisição sequencial de novos genes de resistência a agentes antimicrobianos e genes de virulência por transferência horizontal e recombinação conferiu ao CC17 uma vantagem seletiva facilitando a sua adaptação e diversificação genética (adaptado de (Leavis *et al.* 2004)).....30

Figura 4. Diferentes tipos de elementos genéticos [transposões conjugativos ou (ICEs-*integrative chromosomal elements*)], plasmídeos, (pro)fagos e ilhas genômicas (GEIs-*genomic islands*) (adaptado de (Juhás *et al.* 2009)).....42

Figura 5. Representação esquemática do transposição Tn5382/1549, incluindo a ligação entre o transposição Tn1549 e o gene <i>pbp5</i> (Carias <i>et al.</i> 1998; Dahl <i>et al.</i> 1999).....	53
Figura 6. Estrutura da plataforma genética proposta para a disseminação horizontal da resistência à ampicilina não associada a Tn5382. As localizações dos transposições Tn916 e Tn5386, assim como do gene <i>pbp5</i> , estão devidamente assinaladas (adaptado de (Rice <i>et al.</i> 2005a)).....	54
Figura 7. Representação esquemática do mecanismo de defesa promovido pelos <i>loci</i> CRISPR (adaptado de (Terns & Terns 2011)).....	56
Figura 8. Descrição da sequência nucleotídica dos <i>primers</i> e das condições de amplificação usadas nas reações de PCR no estudo da variabilidade do ambiente genético da região de inserção de <i>pbp5</i> . Na parte superior da imagem aparece uma representação esquemática do posicionamento dos <i>primers</i> usados para a caracterização do ambiente genético de <i>pbp5</i> , assim como o tamanho dos fragmentos amplificados	72
Figura 9. Imagem representativa da amplificação do gene <i>pbp5</i> por PCR em alguns dos transconjugantes de <i>E. faecium</i> GE1 obtidos. A banda amplificada corresponde a um fragmento de 1983 pb.....	76
Figura 10. Comparação dos perfis de restrição de bactérias selvagens, transconjugantes e recetora <i>E. faecium</i> GE1 por PFGE.....	76
Figura 11. PFGE em que foi usada a enzima de restrição <i>SmaI</i> para bactérias transconjugantes de <i>E. faecium</i> BM4105RF e de <i>E. faecium</i> 64/3 e bactérias recetoras.....	78

Figura 12. A-PFGE do DNA genómico sujeito a restrição com *I-CeuI* de isolados selvagens, recetora *E. faecium* GE1 e respetivos transconjugantes. B-Ensaio de hibridação sobre uma membrana obtida a partir do gel da figura A em que foi usada uma sonda para o gene *pbp5* (primers P1 e P2 da Figura 8 da secção 9.1 do capítulo III).....86

Figura 13. A-PFGE do DNA genómico sujeito a restrição com *SmaI* de isolados selvagens, recetoras *E. faecium* GE1, *E. faecium* BM4105RF e *E. faecium* 64/3 e respetivos transconjugantes. As linhas por baixo das bandas correspondem aos locais em que ocorreu hibridação com a sonda do gene *pbp5*. B-Ensaio de hibridação sobre uma membrana obtida a partir do gel da figura A, em que foi usada uma sonda para o gene *pbp5* (primers P1 e P2 Figura 8 da secção 9.1 do capítulo III).....87

Figura 14. Representação dos perfis de RFLP (enzima *DdeI*) obtidos após amplificação do fragmento entre os genes *ftsW* e *pbp5* (primers P2 e P3).....96

Figura 15. Caracterização do ambiente genético do gene *pbp5* de *E. faecium* por PCR e sequenciação. A numeração romana apresentada (I, II, III, IV e V) representa as diferentes estruturas genéticas encontradas. O símbolo (+) representa uma amplificação positiva e (++) uma amplificação cujo produto possui maior tamanho que o esperado.....99

NOMENCLATURA

AF - Ácido fusídico

AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism*

AMP - Ampicilina

CC17 - *Clonal Complex 17*

CMI - Concentração Mínima Inibitória

CRISPR - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

CTn - *Conjugative transposon*

ERI - Eritromicina

ESTR - Estreptomicina

GEN - Gentamicina

MLST - *Multi Locus Sequence Typing*

NIT - Nitrofurantoína

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

pb - pares de bases

PBP5 - *Penicillin binding protein 5*

PFGE - *Pulsed Field Gel Electrophoresis*

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RIF - Rifampicina

ST - *Sequence Type*

TEC - Teicoplanina

TET - Tetraciclina

VAN - Vancomicina

VRE - *Vancomycin Resistant Enterococcus*

I. INTRODUÇÃO

1. Características gerais do género *Enterococcus*

A designação “*Enterococcus*” provém da palavra francesa “enterócoque” e remonta ao final do século XIX, quando Thiercelin observou pela primeira vez a presença destas bactérias na flora saprófita intestinal (Stiles & Holzapfel 1997). Posteriormente, em 1937, as espécies de *Streptococcus* spp foram classificadas em quatro subgrupos, tendo sido *Enterococcus* spp incluídos no subgrupo dos *Streptococcus* fecais (Klein 2003). Em 1984, através de novas técnicas de biologia molecular (hibridação de DNA e sequenciação do rRNA da subunidade 16S) verificou-se que *Streptococcus faecium* e *Streptococcus faecalis* apresentavam características suficientemente distintas dos outros *Streptococcus*, tendo sido criado o género *Enterococcus* cujo posicionamento relativo a outros géneros de bactérias de Gram positivo está representado na Figura 1 (Foulque Moreno *et al.* 2006; Routsis *et al.* 2003). Atualmente, existem 41 espécies de *Enterococcus* devidamente identificadas (Euzéby n.d.).

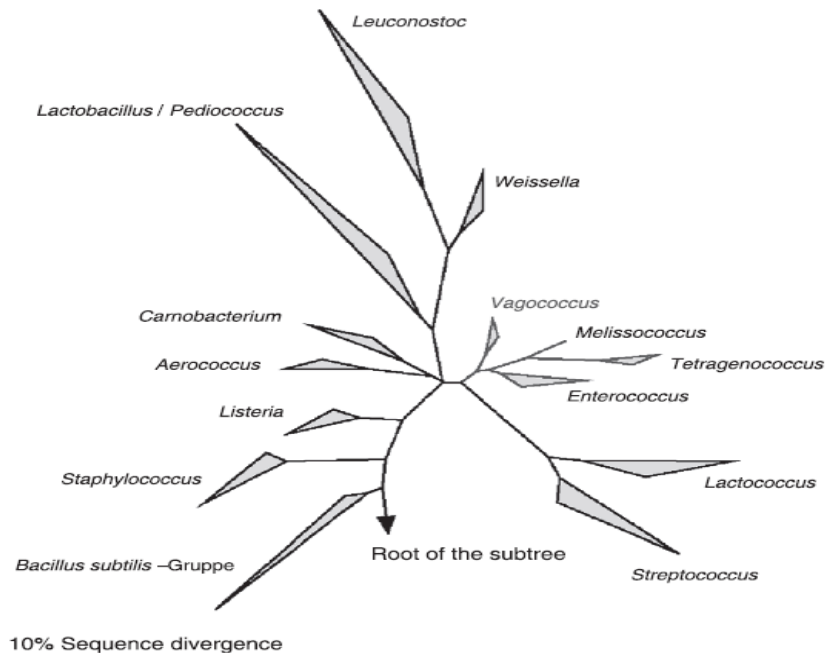


Figura 1. Posicionamento filogenético de *Enterococcus* spp relativamente a outros géneros de bactérias de Gram positivo (sequenciação do rRNA da subunidade 16S) (*International Journal of Food Microbiology*, 2003, Vol. 88, p. 123-131, doi: 10.1016/50168-1605(03)00175-2, reproduzido com permissão da *American Society for Microbiology*-Anexo 1).

Enterococcus spp caracterizam-se por serem cocos de Gram positivo agrupados ou não em cadeias, catalase negativas, não formadoras de esporos, aerotolerantes e produtoras de ácido láctico (Foulque Moreno *et al.* 2006). Estas bactérias crescem preferencialmente à temperatura de 35°C, embora muitas espécies tolerem temperaturas entre os 10 e os 45°C (Foulque Moreno *et al.* 2006). *Enterococcus* spp têm ainda a capacidade de sobreviver em ambientes com elevada concentração de NaCl (6,5%), com 40% de sais biliares e a pH 9.6 (Fisher & Phillips 2009).

A resistência destes microrganismos a condições físicas e químicas adversas permite a sua sobrevivência em diferentes nichos ecológicos, apesar de eles se encontrarem preferencialmente no intestino de mamíferos (Flahaut *et al.* 1996). A sua presença foi descrita em alimentos frescos e processados (ex: água para consumo, vegetais, frutos, salsichas, carne) (Johnston & Jaykus 2004; Wilson & McAfee 2002; Simjee *et al.* 2002; Macedo *et al.* 2011; de Fatima Silva Lopes *et al.* 2005), no ambiente (ex: águas do mar, rios e esgotos) (Iversen *et al.* 2002; Novais *et al.* 2005; Iversen *et al.* 2004; Guardabassi *et al.* 2002), em fezes de humanos e animais (Novais *et al.* 2006), e como agentes de infeção humana quer em ambulatório quer no ambiente hospitalar (Hidron *et al.* 2008; Velasco *et al.* 2004; Werner *et al.* 2008a).

2. Epidemiologia da resistência aos antibióticos em *Enterococcus* spp de vários nichos ecológicos

Durante décadas não se atribuiu grande importância clínica a *Enterococcus* spp, considerado um género bacteriano da flora comensal intestinal e com um poder patogénico limitado (Hendrickx *et al.* 2009). Nos últimos trinta anos, este género revelou-se um importante agente etiológico de infeções humanas sendo, atualmente, um dos agentes de infeção mais comuns nas unidades hospitalares de todo o mundo, participando quer em situações epidémicas quer endémicas (Bell *et al.* 1998; Hidron *et al.* 2008; Leavis, Bonten & Willems 2006; Liu *et al.* 2011; Matsushima *et al.* 2011; Palazzo *et al.* 2011; Ruiz-Garbajosa *et al.* 2011; Top *et al.* 2008; von Gottberg *et al.* 2000; Novais *et al.* 2004). Embora várias espécies de *Enterococcus* tenham sido

associadas a infecções, a mais comum nas décadas de 80 e 90 foi *E. faecalis* (> 90% das infecções), tendo vindo a ser gradualmente substituída por *E. faecium* (cerca de 75% das infecções) mais resistente a antibióticos (Treitman *et al.* 2005; Hidron *et al.* 2008; Sood *et al.* 2008). Estas bactérias foram descritas em infecções do trato urinário, septicémias, endocardites, feridas cirúrgicas, entre outras (Bonten, Willems & Weinstein 2001; Malani P. 2002).

A emergência de *Enterococcus* spp como agentes de infeção parece estar associada quer à aquisição de fatores de virulência (Arias *et al.* 2009; Willems & van Schaik 2009) quer de determinantes de resistência a diversos agentes antimicrobianos. De facto, para além das resistências naturais que *Enterococcus* spp possuem [cefalosporinas, monobactamos, polimixinas, baixas concentrações de vancomicina (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*/*E. flavescens*) e de aminoglicosídeos], estas bactérias têm ainda uma grande capacidade de adquirir elementos genéticos (plasmídeos, transposões, sequências de inserção) (Klare *et al.* 2003; Leavis, Bonten & Willems 2006) envolvidos na disseminação horizontal de diversos genes que codificam para a resistência a diferentes famílias de antibióticos [ex: elevadas concentrações de aminoglicosídeos, β -lactâmicos, glicopéptidos, macrólidos, tetraciclina, cloranfenicol] (Hegstad *et al.* 2010; Klare *et al.* 2003; Palmer *et al.* 2010; Willems *et al.* 2011). Esta emergência de isolados com resistência múltipla está fortemente associada ao consumo intenso de antibióticos no tratamento de infeções humanas nosocomiais e comunitárias, no tratamento de infeções nos animais de estimação, na produção animal intensiva e na agricultura (Klare *et al.* 2003; Guardabassi, Schwarz & Lloyd 2004; Kummerer 2004; Aarestrup *et al.* 2000; Gambarotto *et al.* 2000).

Dentro dos antibióticos mais importantes para o tratamento de infeções enterocócicas destacam-se os glicopéptidos, ampicilina, aminoglicosídeos e os antibióticos mais recentemente introduzidos no mercado (ex: linezolid e daptomicina). Na década de 80, *E. faecium* começaram a destacar-se pela sua elevada resistência à ampicilina e, na década de 90, também pela resistência aos glicopéptidos (Willems & van Schaik 2009; Galloway-Pena *et al.* 2009). Atualmente, a resistência à ampicilina é sobretudo detetada na espécie *E. faecium* das unidades hospitalares de diferentes regiões geográficas

(Simonsen *et al.* 2003; Emilia 2011; Maniatis *et al.* 2001), embora ocasionalmente possam também ser encontrados em outros nichos ecológicos (Iversen *et al.* 2004).

A emergência da resistência aos glicopéptidos dentro nas unidades hospitalares europeias foi mais lenta do que nos Estados Unidos (Leavis, Bonten & Willems 2006). Sobretudo a partir do ano 2000, países como o Chipre, Alemanha, Itália, Portugal, Reino Unido, Grécia e Irlanda aproximaram-se das taxas de resistência encontradas nos Estados Unidos (Willems & van Schaik 2009; de Kraker & van de Sande-Bruinsma 2007). Embora a primeira descrição de *E. faecalis* resistente aos glicopéptidos tenha ocorrido num paciente em França, a resistência a estes antibióticos na Europa começou por emergir na comunidade (animais e humanos saudáveis) (Bonten, Willems & Weinstein 2001). Esta seleção de *Enterococcus* spp resistentes aos glicopéptidos esteve associada ao uso da avoparcina (um análogo da vancomicina) como promotor de crescimento animal (Sood *et al.* 2008). Este antibiótico nunca foi permitido nos Estados Unidos que mantiveram, até recentemente, a resistência aos glicopéptidos dentro das unidades hospitalares (Bonten, Willems & Weinstein 2001; Donabedian *et al.* 2010). A incidência da resistência de *Enterococcus* spp aos β -lactâmicos não atingiu valores significativos no ambiente de produção animal, apesar destes antibióticos serem frequentemente consumidos em veterinária (Barton 2000).

Em *Enterococcus* spp a resistência elevada a macrólidos, tetraciclina e aminoglicosídeos também têm sido frequentemente descrita (Simonsen *et al.* 2003; Mondino *et al.* 2003; Quednau *et al.* 1998; Donabedian *et al.* 2003; Aarestrup 2000; Zhanel *et al.* 2003). Alguns estudos também têm detetado resistência às novas moléculas linezolid, daptomicina e tigeciclina de vários nichos e regiões geográficas (Werner *et al.* 2008b; Bonora *et al.* 2006; Montero, Stock & Murray 2008; Freitas *et al.* 2011b).

Enterococcus spp resistentes a antibióticos têm sido observados não só nos nichos ecológicos acima mencionados mas também em ambientes fortemente expostos a estes microrganismos e seus genes (ex: esgotos, águas de rios e mares) (Harwood *et al.* 2001;

Arvanitidou, Katsouyannopoulos & Tsakris 2001; Witte 2000; Macedo *et al.* 2011) ou em ambientes de áreas remotas (animais selvagens) (Quinteira *et al.* 2011).

A dispersão da resistência entre nichos e hospedeiros pode ocorrer por disseminação clonal de algumas estirpes ou através da dispersão horizontal de elementos genéticos que transportam os genes de resistência. Por exemplo, Iversen *et al.* (2004) observaram pelo método de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) o mesmo clone de *E. faecium* resistente à ampicilina quer em hospitais quer nos esgotos hospitalares. Novais *et al.* (2006) observaram clones de *E. faecalis* e *E. faecium* resistentes à gentamicina em humanos saudáveis e frangos para consumo humano e Freitas *et al.* (2011a) descreveram clones de *E. faecalis* e *E. faecium* resistentes à vancomicina em suiniculturas e isolados clínicos.

A presença da mesma estrutura do transposão Tn1546, responsável pela resistência aos glicopéptidos, foi identificada em isolados *E. faecium*, *E. faecalis* e *Enterococcus* spp de frangos e humanos saudáveis (tratadores de aves de consumo) (van den Bogaard *et al.* 2002) e em isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* de humanos, animais e meio ambiente (Novais *et al.* 2008). Verificou-se ainda que o transposão Tn1546 estava contido dentro de diferentes plasmídeos responsáveis pela sua disseminação em *E. faecalis* e *E. faecium* oriundos de suínos, humanos saudáveis e isolados clínicos (Freitas *et al.* 2011a; Laverde Gomez *et al.* 2011b; Novais *et al.* 2008).

Esta disseminação de estirpes e elementos genéticos comuns entre o homem e outros nichos ecológicos pode ser veiculada pela cadeia alimentar ou pelo contacto direto com ambientes/hospedeiros colonizados com estas bactérias (contacto direto com os animais de produção, manipulação de alimentos contaminados, atividades recreativas em águas contaminadas) (Witte 2000).

3. Estrutura populacional de *Enterococcus* spp

Vários métodos foram utilizados para determinar a relação clonal entre isolados da mesma espécie de *Enterococcus* provenientes do mesmo nicho ou de nichos ecológicos diferentes. O método de *Pulsed-Field-Gel-Electrophoresis* (PFGE) continua a ser largamente utilizado mas, devido ao seu grande poder discriminativo, não é o mais adequado para se estabelecer relações clonais entre *Enterococcus* spp que sofreram processos evolutivos distintos (ao longo de diversos períodos de tempo ou em diferentes nichos ecológicos) (Willems & van Schaik 2009) frequentemente associados a recombinações homólogas relacionadas com a aquisição de diferentes determinantes genéticos (Morrison *et al.* 1999; Willems *et al.* 2005).

O primeiro estudo da estrutura populacional de *E. faecium* foi realizado por um método denominado de *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP). Este estudo utilizou isolados de *E. faecium* provenientes de diferentes nichos ecológicos e diversas regiões geográficas que foram especificamente agrupados (Willems *et al.* 2000). Oitenta e quatro por cento de *E. faecium* obtidos de doentes hospitalizados pertenciam ao genogrupo C e 75% dos isolados de humanos saudáveis e 100% dos isolados de suínos foram agrupados no genogrupo A, independentemente de serem ou não classificados no mesmo tipo de PFGE. Isolados bacterianos de aves domésticas (92%) e bovinos (70%) pertenciam aos genogrupos B e C, respetivamente (Willems *et al.* 2000).

Mais recentemente, com a técnica *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) foi possível determinar de forma mais clara qual a associação entre os diferentes genótipos de *E. faecium* (Homan *et al.* 2002). No estudo de Homan *et al.* (2002) foram obtidos resultados similares aos detetados anteriormente por AFLP, tendo sido observado que estirpes epidémicas hospitalares se agrupavam numa linhagem inicialmente denominada de C1. Pelo método de MLST também se demonstrou que a maioria dos isolados associados a infeções nosocomiais se encontravam relacionados em termos evolutivos, pertencendo a um grupo designado por complexo clonal 17 (CC17). Esta denominação é proveniente da *sequence type* 17 (ST17) que se presume estar na origem desta linhagem genética (Willems *et al.* 2005). Desde então, publicações de diferentes regiões

geográficas mundiais confirmaram a sua disseminação global, reconhecendo o CC17 como o mais importante complexo clonal associado a isolados nosocomiais de *E. faecium* (Bonora *et al.* 2007; Freitas *et al.* 2009b; Klare *et al.* 2005; Khan *et al.* 2008; Lopez *et al.* 2009a; Valdezate *et al.* 2009; Willems *et al.* 2005).

Recentemente, foi sugerido que a designação de CC17 como uma única linhagem genética pode não ser a mais correta, uma vez que os isolados de *E. faecium* associados ao nicho hospitalar, nomeadamente ST17, ST18 e ST78, não parecem ter evoluído de um único ancestral (Willems *et al.* 2011). Apesar desta aparente falta de um ancestral comum na evolução dos STs de CC17, a maioria dos isolados relacionados a surtos e infecções hospitalares são claramente distintos da maioria das estirpes comensais de humanos saudáveis e animais (Willems & van Schaik 2009), implicando origens evolutivas distintas que podem ter ocorrido há milhares de anos (Willems & van Schaik 2009; Galloway-Pena *et al.* 2012).

A determinação de linhagens clonais comuns de *E. faecium* nos diversos nichos mencionados não explica, por si só, as razões pelas quais alguns clones causam mais infecções do que outros. O sucesso comprovado de clones associados às infecções nosocomiais parece estar associado a uma aquisição sucessiva e acumulativa de genes e/ou elementos genéticos que conferem resistência aos antibióticos, virulência e melhoria da capacidade de colonização (Willems *et al.* 2011). Pensa-se que um das primeiras características relevantes adquiridas por CC17 foi a resistência à ampicilina, resultando numa sobrevivência mais eficiente no nicho hospitalar e, conseqüentemente, aumentando a possibilidade de adquirir novos genes/elementos genéticos (Willems & van Schaik 2009; Willems *et al.* 2005; Galloway-Pena *et al.* 2009). Entre as características adquiridas por isolados de CC17 encontra-se a aquisição de resistência à vancomicina e quinolonas (Leavis, Bonten & Willems 2006). Um número significativo de isolados também possui uma ilha genómica de patogenicidade de localização cromossomal (Leavis *et al.* 2004) que inclui o gene *esp* (Willems *et al.* 2005; Coque *et al.* 2002; Willems *et al.* 2001). Este gene codifica a proteína Esp (*enterococcal surface protein*), que se julga ter funções de adesina, contribuindo para a colonização das células epiteliais do aparelho urinário e formação de biofilmes (Leavis *et al.* 2004;

Shankar *et al.* 2001; Toledo-Arana *et al.* 2001). Também o gene de virulência *hyl_{Efm}*, presente na maioria dos isolados clínicos pertencentes ao CC17 (Rice *et al.* 2003; Freitas *et al.* 2010), codifica a enzima hidrolase de glicosídeos que se julga facilitar a colonização intestinal e a invasão peritoneal (Arias *et al.* 2009; Rice *et al.* 2003; Rice *et al.* 2009). Foi detetado em megaplasmídeos conjugativos com disseminação global (Freitas *et al.* 2010).

Genes que codificam para proteínas com a função de interagir com determinados compostos químicos da matriz extracelular (Nallapareddy *et al.* 2008; Nallapareddy *et al.* 2007; Hendrickx *et al.* 2007; Sillanpaa *et al.* 2008) também foram descritos como associados mais frequentemente a estirpes hospitalares do que a estirpes comensais humanas e estirpes presentes nos animais (Willems & van Schaik 2009). Mais recentemente foi identificada uma outra ilha genómica de patogenicidade presente em *E. faecium* hospitalares, sendo constituída por genes envolvidos numa via metabólica responsável pelo metabolismo e transporte de carboidratos (Heikens *et al.* 2008). Assim as estirpes de *E. faecium* do CC17 que possuem esta via metabólica devem possivelmente ter uma vantagem competitiva sobre as estirpes comensais de *E. faecium* em determinados nichos ecológicos (Heikens *et al.* 2008).

A presença frequente de sequências de inserção (IS) em CC17, nomeadamente IS16, também parece ter importância na aquisição de fatores de virulência tais como o gene *esp* (Leavis *et al.* 2007). Todas estas características poderão explicar a elevada prevalência e disseminação global desta linhagem clonal e a evolução de alguns *E. faecium* de bactérias comensais a patogénicas.

Em Portugal o CC17 foi identificado em isolados de hospitais, humanos saudáveis, suínos, suiniculturas e ambiente, provenientes de diferentes regiões geográficas (Figura 2) (Freitas *et al.* 2009b; Freitas *et al.* 2011a). Todas as bactérias pertencentes a este complexo clonal apresentavam resistência à ampicilina e eritromicina e variavelmente a outros antibióticos (glicopéptidos, ciprofloxacina, canamicina e estreptomina).

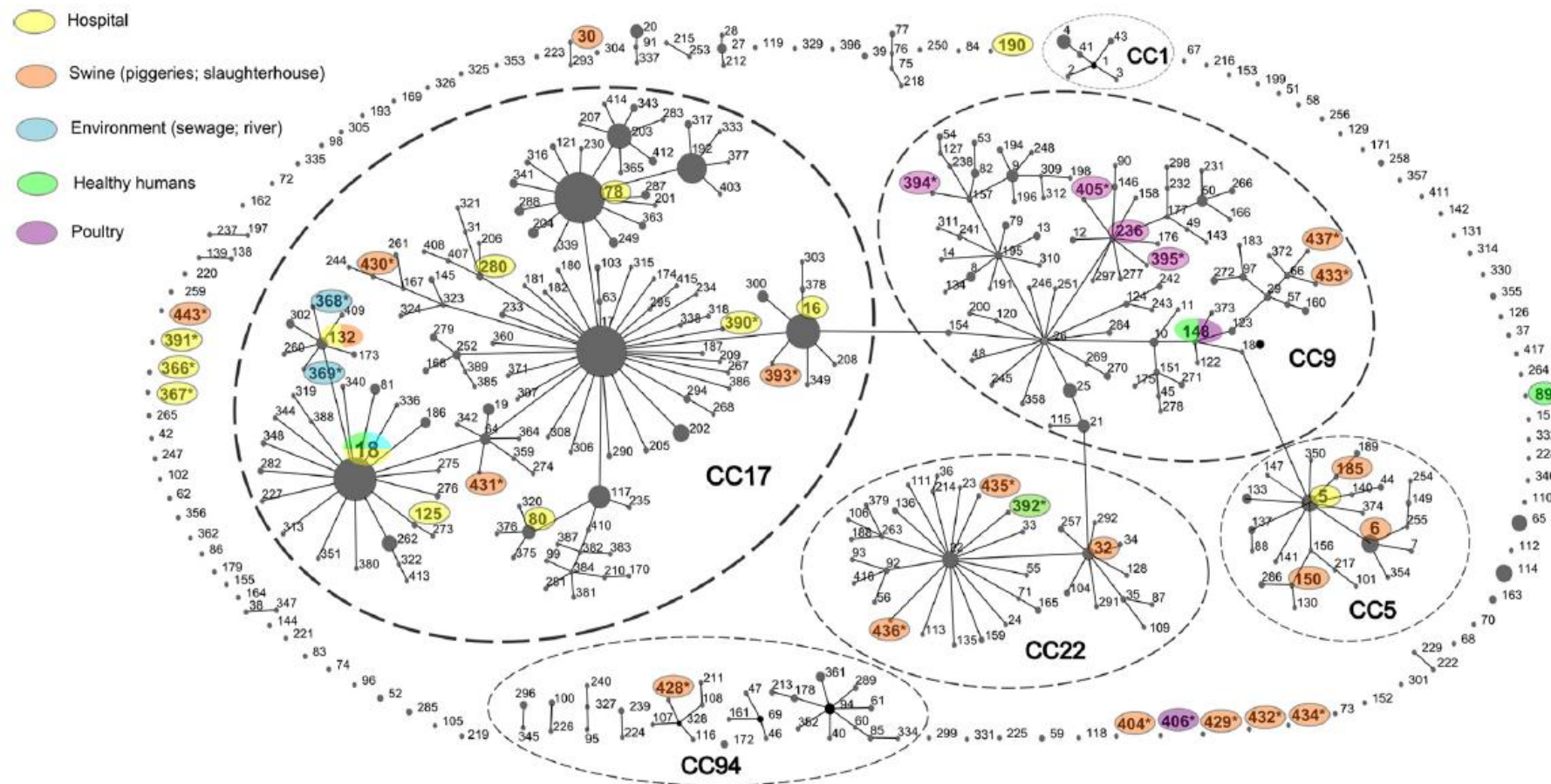


Figura 2. Representação esquemática das linhagens genéticas (*Sequence types*-STs) de *E. faecium* de diversos nichos ecológicos. Cada ST é representado por um ponto, sendo que o tamanho de cada ponto é indicador da prevalência dos isolados pertencentes a esse ST. As linhas ligam os diferentes SLVs (*Single Locus Variants* que são STs que diferem em um alelo entre si). As cores indicam os diferentes nichos ecológicos de que são provenientes os isolados e os CCs (Complexos Clonais) são representados por círculos a tracejado (CC1, CC5, CC9, CC17, CC22 e CC94) (*Applied and Environmental Microbiology*, 2009, Vol. 75, No. 14, p. 4904–4908, doi:10.1128/AEM.02945-08, reproduzido com permissão da *American Society for Microbiology*-Anexo 1).

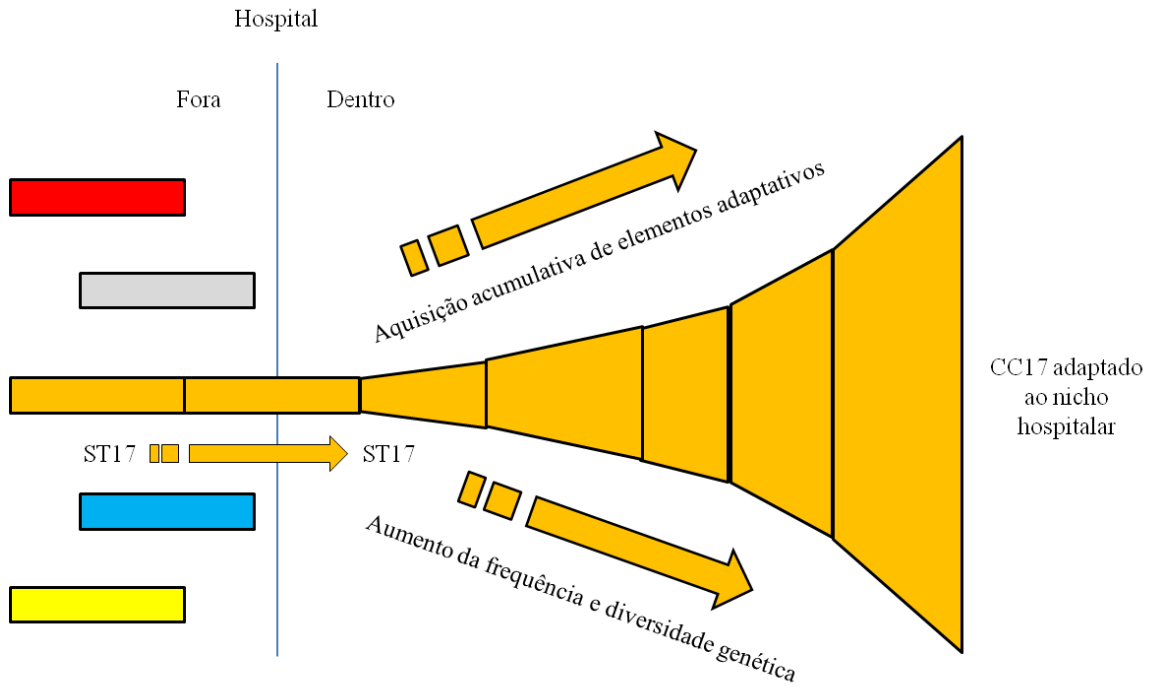


Figura 3. Representação esquemática dos acontecimentos que parecem ter levado à prevalência de CC17 no nicho hospitalar. A aquisição sequencial de novos genes de resistência a agentes antimicrobianos e genes de virulência por transferência horizontal e recombinação conferiu ao CC17 uma vantagem seletiva facilitando a sua adaptação e diversificação genética (adaptado de (Leavis *et al.* 2004)).

O gene *esp* foi observado em bactérias de diferentes nichos, enquanto o gene *hyl* foi encontrado associado preferencialmente com os isolados clínicos. Os restantes fatores de virulência testados, tais como a citolisina, gelatinase e substância de agregação codificados pelos genes *cyl*, *gel* e *agg* respetivamente, não foram encontrados associados ao CC17 em Portugal (Freitas *et al.* 2009b).

Ainda no estudo realizado em Portugal foi observada a presença do complexo clonal CC5, estando essa linhagem genética associada a infeções hospitalares e isolados de suiniculturas (Freitas *et al.* 2009b). CC5 incluía isolados com variados perfis de resistência a antibióticos, mas sem os fatores de virulência acima mencionados (Freitas *et al.* 2009b). Assim, a deteção de CC5 nas unidades hospitalares evidencia a importância de diferentes hospedeiros de nichos não hospitalares como possíveis reservatórios de *Enterococcus* spp com características clínicas importantes (Freitas *et al.* 2009b).

O estudo da estrutura populacional de *E. faecalis* tem revelado algumas diferenças comparativamente à de *E. faecium*. O uso do método MLST permitiu identificar as sequências ST6, ST9, ST16, ST21, ST28, ST40 e ST47 e os complexos clonais CC2 e CC21 presentes em isolados clínicos e associados a surtos, e na comunidade (produção animal e alimentos de origem animal) (Ruiz-Garbajosa *et al.* 2006). Esta partilha mais frequente de STs entre doentes hospitalizados e outros reservatórios (Willems *et al.* 2011), contrasta com *E. faecium* em que os clones mais importantes presentes no nicho hospitalar raramente se encontravam presentes na comunidade.

Também os genes envolvidos na virulência de *E. faecalis*, que codificam para a gelatinase, citolisina, proteína Esp e substância de agregação têm sido encontrados em estirpes não patogénicas, tais como isolados presentes nos alimentos, em bebés saudáveis e isolados clínicos associados a infeções humanas e veterinárias (Semedo *et al.* 2003; Solheim *et al.* 2009; van Schaik & Willems 2010). Assim, ao contrário do que sucede em *E. faecium*, em *E. faecalis* não existe uma diferença clara entre os isolados patogénicos e os não patogénicos (Willems *et al.* 2011).

4. Mecanismo de ação e de resistência natural aos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos são um grupo heterogéneo de compostos químicos que apresentam uma ação antibacteriana de espectro alargado, sendo amplamente usados no tratamento de infeções por bactérias de Gram positivo e de Gram negativo (Georgopapadakou 1993). Nesta família de antibióticos estão incluídas penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenems (Sousa 2006), cujo mecanismo de ação está relacionado com a inibição de um dos principais componentes da parede celular bacteriana, o peptidoglicano. Os antibióticos β -lactâmicos inibem de um modo eficiente as transpeptidases bacterianas, habitualmente denominadas PBPs (*Penicilin Binding Proteins*) (Wilke, Lovering & Strynadka 2005). Estas enzimas que catalisam a reação final de polimerização do peptidoglicano interagem com o antibiótico β -lactâmico, formando-se o complexo letal peniciloil-enzima que impede o prosseguimento da reação de transpeptidação (Wilke, Lovering & Strynadka 2005). Uma vez que o

peptidoglicano não está presente nas células eucarióticas, faz com que os antibióticos β -lactâmicos apresentem uma toxicidade antibacteriana seletiva (Sousa 2006).

Enterococcus spp são naturalmente resistentes à ação de diferentes β -lactâmicos dado que algumas moléculas pertencentes a esta família apresentam uma baixa afinidade para os seus PBPs (Fontana *et al.* 1990). Por exemplo, as cefalosporinas e os monobactamos são inativos em *Enterococcus* spp (Comenge *et al.* 2003; Kristich, Wells & Dunny 2007; Kristich *et al.* 2011). Recentemente, observou-se que a resistência intrínseca às cefalosporinas em *E. faecalis* pode ser devida a dois mecanismos distintos (Kristich *et al.* 2011) : um gene que expressa um sistema de transdução do sinal que regula a expressão de mais genes que promovem a resistência às cefalosporinas (Hancock & Perego 2004; Comenge *et al.* 2003) ou outro gene que codifica uma cínase com a função de mediar respostas adaptativas que promovem a homeostasia da parede celular bacteriana e aumentam a resistência intrínseca aos antibióticos antiparietais como as cefalosporinas (Kristich, Wells & Dunny 2007). Em contraste às cefalosporinas, a penicilina e seus derivados, assim como o imipenem possuem alguma atividade face a estas bactérias (sobretudo *E. faecalis*), inibindo o seu crescimento (Ono, Muratani & Matsumoto 2005).

Os β -lactâmicos mais frequentemente usados em infeções enterocócicas são a amoxicilina ou a ampicilina, com atividade semelhante mas diferindo no tipo de formulações disponíveis (Sousa 2006). Apesar da boa atividade *in vitro* da ampicilina e da penicilina em *E. faecalis*, tem sido observado que a monoterapia com estes antibióticos em pacientes com infeções endovasculares está associada a falhas terapêuticas. Estas infeções costumam exigir uma antibioterapia bactericida, que para muitas estirpes de *Enterococcus* não é alcançada apenas com o uso de ampicilina ou penicilina (Arias, Contreras & Murray 2010). Para além disso, algumas estirpes de *Enterococcus* spp são destruídas com uma concentração específica do β -lactâmico, acima da qual o efeito letal diminui (efeito Eagle) (Eagle 1951). Assim, o sucesso da monoterapia com β -lactâmicos é imprevisível para infeções graves associadas a *Enterococcus* spp. No entanto, salvo raras exceções, consegue-se uma terapia sinérgica pela adição de um aminoglicosídeo (gentamicina ou estreptomicina) ou de vancomicina

à ampicilina (Herman & Gerding 1991). Outros antibióticos que também se podem utilizar em sinergia com a ampicilina são o imipenemo, daptomicina ou doxiciclina (Arias, Contreras & Murray 2010).

5. Mecanismos de resistência adquirida a β -lactâmicos

5.1. Produção de β -lactamases

As β -lactamases são enzimas que conferem resistência aos β -lactâmicos através de uma reação de hidrólise da ligação amida do anel β -lactâmico (Wilke, Lovering & Strynadka 2005). Estas enzimas encontram-se organizadas em quatro classes (A a D), sendo essa classificação baseada na semelhança das sequências aminoacídicas (Wilke, Lovering & Strynadka 2005).

A produção de β -lactamases é um mecanismo de resistência raramente descrito em *Enterococcus* spp. Até ao momento foram descritas *blaZ* oriundas de *Staphylococcus* (Murray 1992) e TEM-1 oriunda de bactérias de Gram negativo (Chouchani *et al.* 2011) classificadas no grupo de β -lactamases de classe A (Fisher, Meroueh & Mobashery 2005). Verificou-se ainda que estas enzimas identificadas em *Enterococcus* são inibidas pelos inibidores de β -lactamases ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (Murray 1992; Coudron, Markowitz & Wong 1992).

O primeiro estudo publicado com referência à produção de uma β -lactamase em *E. faecalis* data do ano de 1981, nos Estados Unidos (Murray & Mederski-Samaroj 1983). Desde então, foram descritos, ocasionalmente, outros isolados da mesma espécie produtores de β -lactamases em diferentes regiões geográficas (Ingerman *et al.* 1987; Patterson, Colodny & Zervos 1988; Patterson, Masecar & Zervos 1988). A descrição de β -lactamases em outras espécies é menos frequente. Em 1989, identificou-se um isolado de *E. faecium* produtor de uma β -lactamase num hospital dos Estados Unidos que também apresentava *E. faecalis* endêmicos produtores das mesmas enzimas (Coudron,

Markowitz & Wong 1992). Em 2010, foram descritos 8 *E. faecium*-CC17 produtores de β -lactamases num Hospital de Modena, Itália (Sarti *et al.* 2012) .

A detecção de β -lactamases em *Enterococcus* spp não é fácil, dado que nem sempre coincidem com um fenótipo de resistência aos β -lactâmicos. Adicionalmente, o teste clássico de nitrocefim para a avaliação das β -lactamases pode não originar resultados positivos imediatos sendo necessários tempos de incubação prolongados, inóculos bacterianos elevados e pressão seletiva com um β -lactâmico (Sarti *et al.* 2012; Murray 1992). Estas dificuldades metodológicas podem estar relacionadas com a descrição de uma baixa incidência de β -lactamases em *Enterococcus* spp.

5.2. Penicillin-binding proteins (PBPs)

As PBPs estão envolvidas na biossíntese e manutenção do peptidoglicano, macromolécula integrante da parede celular bacteriana. Estas proteínas catalisam as reações de transglicosilação, transpeptidação e, algumas delas, também de D,D-carboxipeptidação e endopeptidação (Sauvage *et al.* 2008). Como anteriormente referido, estas moléculas são os alvos de ação dos antibióticos β -lactâmicos que têm uma estrutura molecular semelhante ao dipéptido D-Alanina-D-Alanina, substrato natural das PBPs. Os domínios com atividade catalítica das PBPs vão reagir com o anel β -lactâmico originando um intermediário (complexo enzima-substrato), que vai ser hidrolisado muito lentamente, inibindo as reações de polimerização e síntese da parede celular, resultando na morte bacteriana (Sauvage *et al.* 2008; Goffin & Ghuyssen 1998).

Enterococcus spp possuem vários tipos de PBPs. Em *E. hirae* identificou-se uma estirpe moderadamente resistente à benzilpenicilina, produzindo a proteína PBP5 de baixa afinidade para esse antibiótico, apresentando o respetivo gene (*pbp5*) uma localização cromossomal (el Kharroubi *et al.* 1991). Numa estirpe de *E. hirae* com elevada resistência à penicilina, observou-se uma expressão muito elevada de PBP5, estando relacionada com a inativação do gene *psr*, situado a montante do gene *pbp5* e que se presume ter uma função reguladora (inibidora) da síntese de PBP5 (Ligozzi, Pittaluga & Fontana 1993; Massidda *et al.* 1998). Por outro lado, um outro isolado proveniente do

intestino de suínos possuía PBP5 e PBP3^r como recetores implicados na resistência à penicilina (Piras *et al.* 1993). Neste último isolado, observou-se uma expressão muito alta de PBP3^r após exposição a concentrações crescentes de penicilina. No entanto, a expressão elevada de PBP5 apenas ocorreu quando o isolado foi submetido a uma mutagénesse que inativou o gene que expressa a molécula PBP3^r (Piras *et al.* 1993). O gene *pbp3^r* encontrava-se localizado num plasmídeo responsável também pela disseminação da resistência a outras classes de antibióticos. Os genes *psr3r* e *pbp3^r* apresentavam uma elevada homologia com os genes *psrfm* e *pbp5fm* de um isolado de *E. faecium*, tendo sido postulado que os genes *psr3r* e *pbp3^r* foram transferidos de uma estirpe de *E. faecium* e inseridos num plasmídeo de *E. hirae* (Raze *et al.* 1998).

Em *E. faecium* a resistência aos β -lactâmicos é mediada pela expressão de um gene cromossomal (*pbp5*), que codifica a proteína PBP5 com baixa afinidade de ligação para os antibióticos β -lactâmicos (Fontana *et al.* 1983; Fontana *et al.* 1994; Rice *et al.* 2001; Rice *et al.* 2005b). A proteína PBP5 possui uma função transpeptidásica, mantendo a sua atividade quando as outras PBPs são inibidas pelos β -lactâmicos (Fontana *et al.* 1983; Fontana *et al.* 1985). Na última década, elevados níveis de resistência à ampicilina têm sido detetados em isolados clínicos de *E. faecium*, comprometendo a sua utilidade terapêutica sobretudo nas infeções enterocócicas graves (Klare *et al.* 2003; Simonsen *et al.* 2003; Zhanel *et al.* 2003). Diversos estudos observaram que estes elevados níveis de resistência se deviam ou a uma expressão mais elevada do gene *pbp5* (apenas em bactérias que expressavam baixos níveis de resistência) e/ou a mutações específicas nesse gene que diminuía a sua afinidade para a ampicilina (Rice *et al.* 2001; Sifaoui *et al.* 2001; Williamson *et al.* 1985; Williamson *et al.* 1983; Zorzi *et al.* 1996). Os isolados com perfis extremos de resistência possuíam quer uma expressão mais elevada do gene *pbp5* quer uma afinidade mais reduzida da molécula PBP5 para o β -lactâmico (Klare *et al.* 1992; Fontana *et al.* 1994), ou apenas o segundo mecanismo (Zorzi *et al.* 1996; Rybkine *et al.* 1998). As mutações pontuais no gene *pbp5* que foram descritas como estando correlacionadas com uma diminuição da afinidade para os β -lactâmicos em *E. faecium* estão descritas na Tabela 1.

Em *E. faecalis* foi também identificada uma PBP de baixa afinidade para os antibióticos β -lactâmicos (Signoretto, Boaretti & Canepari 1994). Essa proteína, designada por PBP4 apresentou níveis de expressão mais elevados numa estirpe resistente à ampicilina, quando comparada com uma estirpe suscetível a esse antibiótico (Duez *et al.* 2001). No entanto, na vizinhança do gene *pbp4* não foi identificado o gene *psr*, responsável pela regulação da expressão de PBP5 em *E. hirae* e *E. faecium* (Duez *et al.* 2001). Posteriormente, foi observada uma associação de isolados de *E. faecalis* (não produtores de β -lactamases) resistentes à ampicilina e ao imipenemo, com a presença de mutações pontuais do gene *pbp4* nas posições 520 e 605 (Hiraga *et al.* 2008).

De todas as mutações identificadas foi sugerido que a mutação 485Metionina→Treonina/Alanina tem um papel relevante na expressão de elevados níveis de resistência à ampicilina, sendo frequentemente observada em *E. faecium* de várias regiões geográficas (Zorzi *et al.* 1996; Rybkine *et al.* 1998; Jureen *et al.* 2003; Rice *et al.* 2004). Foi previamente detetado que esta mutação, quando introduzida individualmente, apenas causa um ligeiro aumento da resistência associada com uma pequena diminuição da afinidade para a penicilina (Sifaoui *et al.* 2001; Rice *et al.* 2004; Zorzi *et al.* 1996). Efeitos mais reduzidos na diminuição da suscetibilidade à ampicilina foram também detetados com outras mutações individuais (499Alanina/Isoleucina→Treonina, 629Glutamato→Valina e inserção de serina após a posição 466) (Zapun, Contreras-Martel & Vernet 2008). Todavia quando esta última mutação (Serina466´) estava combinada com outras mutações, em particular com 485Metionina→Treonina/Alanina, a concentração mínima inibitória (CMI) para a ampicilina aumentou pelo menos três vezes (Rice *et al.* 2004). Este último dado foi confirmado num estudo posterior, em que foi observado uma CMI elevada quando os isolados possuíam a mutação Serina466´ ou Aspartato466´ em combinação com a mutação 485Met→Thr/Ala (Galloway-Pena, Rice & Murray 2011). No mesmo estudo foi também observado que um isolado portador da mutação 485Met→Thr/Ala, apresentava uma CMI baixa para a ampicilina, sugerindo que nem sempre a presença desta mutação se traduz em valores de resistencia elevados (Galloway-Pena, Rice & Murray 2011).

Tabela 1. Mutações descritas para o gene *pbp5* de *E. faecium* associadas a uma diminuição da afinidade para os antibióticos β -lactâmicos.

Mutação	Origem do isolado	País	Referências
426Met→Ile	Isolados clínicos e mutantes de laboratório de um Centro de Infeciologia de Buenos Aires e do Instituto de Microbiologia da Universidade Católica de Roma	Argentina Itália	(Ligozzi, Pittaluga & Fontana 1996)
	Isolado clínico do hospital <i>Saint-Joseph</i> de Paris	França	(Zorzi <i>et al.</i> 1996)
	Isolado clínico da Universidade de Paris VI		
	Isolado clínico da Universidade de Liège	Bélgica	
	Isolados clínicos da Universidade de Paris VI	França	(Rybkin <i>et al.</i> 1998)
	Isolado clínico do Instituto de Pasteur de Paris		
	Isolado clínico do hospital <i>Saint-Joseph</i> de Paris		
485Met→Thr/Ala	Isolados clínicos	Hungria	
		Alemanha	
		Estados Unidos	
	Isolados de doentes internados em hospitais e isolados clínicos do Hospital da Universidade de Haukeland	Noruega	(Jureen <i>et al.</i> 2003; Jureen <i>et al.</i> 2004)
	Isolado clínico da Universidade de Paris VI	França	(Rice <i>et al.</i> 2004)
	Isolados clínicos de centros médicos e da Faculdade de Medicina de Ohio	Estados Unidos	

Tabela 1. (Continuação).

Mutação	Origem do isolado	País	Referências
485Met→Thr/Ala	Isolados clínicos de laboratórios de Microbiologia de hospitais regionais e gerais	Taiwan	(Hsieh <i>et al.</i> 2006)
	Isolados fecais de animais de estimação e de aves de capoeira	Portugal	(Poeta <i>et al.</i> 2007b)
		Espanha	
	Isolados clínicos e não clínicos de diferentes regiões geográficas	15 países representados	(Galloway-Pena, Rice & Murray 2011)
496Asn→Lys	Isolados de doentes internados em hospitais e isolados clínicos do Hospital da Universidade de Haukeland	Noruega	(Jureen <i>et al.</i> 2003)
	Isolados fecais de animais de estimação e de aves de capoeira	Portugal Espanha	(Poeta <i>et al.</i> 2007b)
499Ala/Ile→Thr	Isolados clínicos da Universidade de Paris VI	França	
	Isolado clínico do Instituto de Pasteur de Paris		
	Isolado clínico do Hospital de <i>Saint-Joseph</i> de Paris		
	Isolado clínico da Universidade de Liège	Bélgica	(Rybkin <i>et al.</i> 1998)
	Isolados clínicos	Hungria	
		Alemanha	
		Estados Unidos	
	Isolados de doentes internados em hospitais e isolados clínicos do Hospital da Universidade de Haukeland	Noruega	(Jureen <i>et al.</i> 2003)
	Isolados clínicos de laboratórios de Microbiologia de hospitais regionais e gerais	Taiwan	(Hsieh <i>et al.</i> 2006)
Isolados fecais de animais de estimação e de aves de capoeira	Portugal	(Poeta <i>et al.</i> 2007b)	
	Espanha		

Tabela 1. (Continuação).

Mutação	Origem do isolado	País	Referências
525Glu→Asp	Isolados de doentes internados em hospitais e isolados clínicos do Hospital da Universidade de Haukeland	Noruega	(Jureen <i>et al.</i> 2003)
	Isolados fecais de animais de estimação e de aves de capoeira	Portugal Espanha	(Poeta <i>et al.</i> 2007b)
558Ala→Val	Isolados clínicos e mutantes de laboratório de um Centro de Infeciologia de Buenos Aires e do Instituto de Microbiologia da Universidade Católica de Roma	Argentina	(Ligozzi, Pittaluga & Fontana 1996)
562Thr→Ala		Itália	
574Thr→Ile			
586Val→Leu	Isolados de doentes internados em hospitais e isolados clínicos do Hospital da Universidade de Haukeland	Noruega	(Jureen <i>et al.</i> 2003)
	Isolados fecais de animais de estimação e de aves de capoeira	Portugal Espanha	(Poeta <i>et al.</i> 2007b)
	Isolados clínicos e mutantes de laboratório de um Centro de Infeciologia de Buenos Aires e do Instituto de Microbiologia da Universidade Católica de Roma	Argentina Itália	(Ligozzi, Pittaluga & Fontana 1996)
629Glu→Val	Isolados de doentes internados em hospitais e isolados clínicos do Hospital da Universidade de Haukeland	Noruega	(Jureen <i>et al.</i> 2003)
	Isolados clínicos de laboratórios de Microbiologia de hospitais regionais e gerais	Taiwan	(Hsieh <i>et al.</i> 2006)
	Isolados fecais de animais de estimação e de aves de capoeira	Portugal Espanha	(Poeta <i>et al.</i> 2007b)
	Isolados clínicos da Universidade de Paris VI	França	(Rybkin <i>et al.</i> 1998)
	Isolado clínico do Instituto de Pasteur de Paris		
	Isolado clínico do Hospital de <i>Saint-Joseph</i> de Paris		

Tabela 1. (Continuação).

Mutação	Origem do isolado	País	Referências	
629Glu→Val	Isolado clínico da Universidade de Liège	Bélgica	(Rybkin <i>et al.</i> 1998)	
	Isolados clínicos	Hungria		
		Alemanha		
		Estados Unidos		
667Ser→Pro	Isolados clínicos da Universidade de Paris VI	França	(Rybkin <i>et al.</i> 1998)	
	Isolado clínico do Instituto de Pasteur de Paris			
	Isolado clínico do Hospital de <i>Saint-Joseph</i> de Paris			
	Isolado clínico da Universidade de Liège	Bélgica		
	Isolados clínicos	Hungria		
Alemanha				
Estados Unidos				
Inserção de Ser ou Asp após o local 466 - 466 (Ser/Asp)	Isolado clínico da Universidade de Paris VI	França	(Rice <i>et al.</i> 2004)	
	Isolado clínico de centros médicos e da Faculdade de Medicina (Ohio)	Estados Unidos		
	Isolados fecais de animais de estimação e de aves de capoeira	Portugal	(Poeta <i>et al.</i> 2007b)	
		Espanha		
	Isolados clínicos de laboratórios de Microbiologia de hospitais regionais e gerais	Taiwan	(Hsieh <i>et al.</i> 2006)	
		Isolados clínicos	Estados Unidos	(Rybkin <i>et al.</i> 1998)
			Hungria	
Isolados clínicos e não clínicos de diferentes regiões geográficas	15 países representados	(Galloway-Pena, Rice & Murray 2011)		

Legenda: Ala-Alanina; Asn-Asparagina; Asp-Aspartato; Glu-Glutamato; Ile-Isoleucina; Leu-Leucina; Lys-Lisina; Met-Metionina; Pro-Prolina; Ser-Serina; Thr-Treonina; Val-Valina.

De acordo com os dados obtidos foi sugerido que a inserção de um aminoácido após a posição 466 deve deslocar o aminoácido do centro ativo valina-465, reduzindo a afinidade para a penicilina (Sauvage *et al.* 2002). Foi também postulado que a remoção do aminoácido metionina da posição 485, resultaria numa alteração de conformação do centro ativo da enzima e num processo de acilação menos eficiente (Sauvage *et al.* 2002). Apesar destas evidências, vários grupos de investigação propuseram que outros fatores adicionais ainda não conhecidos deverão estar implicados no perfil de suscetibilidade de *E. faecium* aos β -lactâmicos (Jureen *et al.* 2004; Rice *et al.* 2001; Sifaoui *et al.* 2001; Galloway-Pena, Rice & Murray 2011). Fatores relacionados com a regulação, expressão, modificações na tradução do gene *pbp5* ou outros genes poderão traduzir-se em CMI distintas em estirpes de *E. faecium* (Galloway-Pena, Rice & Murray 2011).

6. Mecanismos associados à diversidade genética bacteriana e sua contribuição para a virulência e resistência aos antibióticos

As diferenças observadas na patogenicidade dos microrganismos contribuíram para um interesse acrescido no estudo da sua diversidade molecular (Beres & Musser 2007). Bactérias da mesma espécie possuem características genéticas comuns e fundamentais para a sua sobrevivência, apresentado um genoma principal denominado de “*core genome*” (Maruyama *et al.* 2009). Contudo, podem existir genes específicos (genes acessórios) associados a fenótipos variáveis que codificam por exemplo para a resistência aos antibióticos, virulência e capacidade de metabolizar diferentes substratos nutricionais que facilitam a colonização de determinados ambientes e/ou hospedeiros (Maruyama *et al.* 2009).

A diversidade genética está relacionada com a deleção, duplicação e/ou mutação de genes existentes ou com a aquisição de novos genes por processos de transferência horizontal (Lawrence & Ochman 2002; Cole *et al.* 2001; Gevers *et al.* 2004; Feldgarden, Byrd & Cohan 2003). Nesta última, mecanismo fundamental para a evolução do genoma bacteriano, estão envolvidos elementos genéticos móveis como

profagos, plasmídeos, sequências de inserção (ISs), transposões, integrões, ilhas genómicas e ilhotas genómicas (Figura 4) (Maruyama *et al.* 2009).

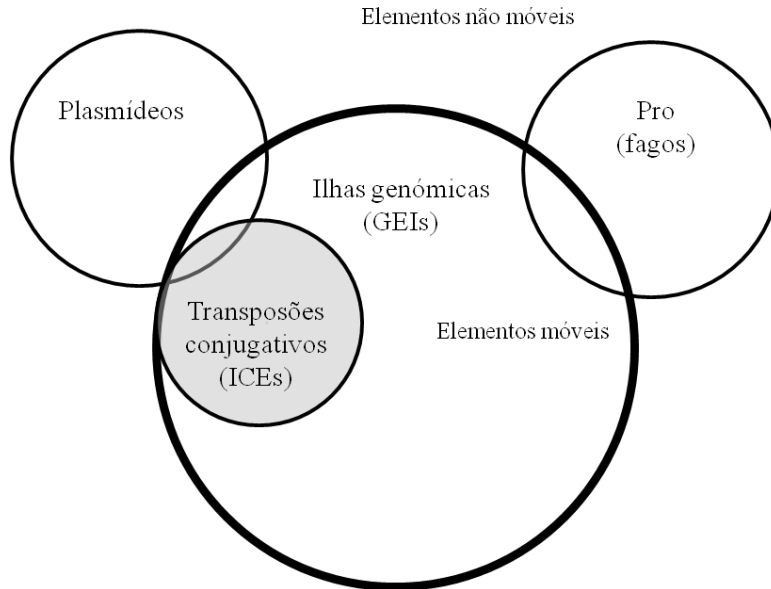


Figura 4. Diferentes tipos de elementos genéticos [transposões conjugativas ou (ICEs-*integrative chromosomal elements*)], plasmídeos, (pro)fagos e ilhas genómicas (GEIs - *genomic islands*) (adaptado de (Juhás *et al.* 2009)).

Os plasmídeos são moléculas de DNA extracromossomais com a capacidade de replicação autónoma (Hegstad *et al.* 2010), integrando-se ocasionalmente no cromossoma bacteriano, tendo aí o nome de episomas (Britannica n.d.). Alguns destes plasmídeos são conjugativos (autotransmissíveis) ou são mobilizados por outros elementos genéticos, tais como transposões ou plasmídeos conjugativos. Eles são constituídos por uma estrutura modular que inclui uma “região constante” contendo genes que codificam para funções essenciais (replicação, conjugação e manutenção) e uma região “variável” associada a um conjunto de genes que codificam para funções adaptativas (resistência a antibióticos, resistência a metais tóxicos, virulência, funções metabólicas) (Hegstad *et al.* 2010). Os plasmídeos variam em tamanho (<1kb-2.9Mb) e a sua classificação pode ser feita de acordo com o seu número de cópias, diversidade de hospedeiros, replicação e mobilidade (Hegstad *et al.* 2010).

Os elementos genéticos envolvidos em mecanismos de transposição são segmentos de DNA que se podem inserir de um modo repetido num local ou em vários locais de um

ou vários genomas (Roberts *et al.* 2008). Estes elementos têm a capacidade de sofrer processos de excisão do cromossoma ou de plasmídeos e, posteriormente, transferirem-se para um outro hospedeiro por conjugação. A possibilidade destes elementos interagirem entre si e com outros elementos genéticos pode originar a formação de plataformas maiores, em mosaico e complexas que poderão trazer benefícios para a célula hospedeira (Roberts *et al.* 2006).

Os elementos de transposição incluem ISs e transposões. Estes últimos podem ser classificados em transposões compostos, transposões da família Tn3 e transposões conjugativos (ICEs-*Integrative and Conjugative Elements*) (Hegstad *et al.* 2010). Nos ICEs estão incluídos também outros elementos genéticos móveis para além dos transposões conjugativos, tais como as ilhas de patogenicidade e as SCC*mec*.

Os transposões compostos podem conter genes de resistência a um ou mais antibióticos, estando em ambas as extremidades presentes IS da mesma família, importantes na mobilização do DNA presente entre eles (Hegstad *et al.* 2010). Os transposões da família Tn3, por seu lado, caracterizam-se por se moverem intracelularmente dentro ou entre diversas replicões através de um mecanismo replicativo específico (Hegstad *et al.* 2010). Os transposões conjugativos são elementos que sofrem excisão por uma recombinação específica e integram-se de uma forma semelhante aos profagos. Uma outra característica importante dos transposões conjugativos é a sua capacidade de cotransferirem outros transposões ou plasmídeos, assim como facilitar a transferência de grandes segmentos cromossomais entre diferentes estirpes (Hegstad *et al.* 2010).

As ilhas genómicas (GEI-*genomic islands*) são segmentos de DNA bacteriano com um elevado tamanho (10-200 kb). Estes elementos genéticos contribuem para a diversidade e adaptação dos microrganismos, sendo responsáveis pela plasticidade e evolução, assim como pela disseminação de fatores de virulência, resistência aos antibióticos e formação de novas vias catabólicas. Presume-se que as GEIs são uma família de elementos genéticos que inclui os ICEs, plasmídeos conjugativos e profagos (Hacker & Carniel 2001; Juhas *et al.* 2009). As ilhas de patogenicidade (PAIs – *pathogenicity islands*) são ilhas genómicas presentes nos genomas de bactérias patogénicas sendo

responsáveis pela expressão de fatores de virulência (Sriramulu 2008). Os fatores de virulência incluem proteínas com diversas funções, tais como facilitar a invasão do hospedeiro, produção de superantígenos, produção de enterotoxinas, expressão de sistemas de absorção do ferro, sistemas de secreção e expressão de fatores de colonização (Sriramulu 2008).

6.1. Elementos genéticos móveis adquiridos por *Enterococcus* spp

Em *Enterococcus* spp tem sido observado que a disseminação horizontal de genes tem contribuído para a evolução deste gênero bacteriano como importante agente de infecções nosocomiais (Sood *et al.* 2008) e que estirpes melhor adaptadas a este nicho possuíam uma maior prevalência de elementos genéticos móveis comparativamente a outras (Hegstad *et al.* 2010).

Estudos moleculares efetuados em *Enterococcus* spp indicam que a resistência aos antibióticos é frequentemente mediada pela transferência horizontal de plasmídeos conjugativos e mobilizáveis (Palmer, Kos & Gilmore 2010). Os principais plasmídeos associados a *Enterococcus* spp e sequenciados encontram-se descritos na Tabela 2.

Têm sido descritos plasmídeos que respondem a feromonas (pCF10, pAD1, pAM373, pMG2200, pBEE99, pBRG1, pHKK10) contendo genes que codificam para bacteriocinas, citolisinas, resistência às radiações ultravioleta e aos antibióticos (Palmer, Kos & Gilmore 2010). Por exemplo, o plasmídeo pMG2200 presente em *E. faecalis* e pBRG1 ou pHKK10 presentes em *E. faecium* foram previamente descritos como transportadores do gene *vanB* associado à resistência à vancomicina (Zheng *et al.* 2009).

Tabela 2. Plasmídeos sequenciados descritos em *Enterococcus* spp que transportam genes que codificam para a resistência aos agentes antimicrobianos e outras características (adaptada de (Palmer, Kos & Gilmore 2010)).

Plasmídeo	Hospedeiro	Resistência aos antibióticos ^a	Outras características ^b	Referência
pCF10	<i>E. faecalis</i>	Tet	AS, UV ^R	(Hirt <i>et al.</i> 2005)
pAD1	<i>E. faecalis</i>	–	AS, Cyt, UV ^R	(Francia <i>et al.</i> 2001)
pAM373	<i>E. faecalis</i>	–	AS	(De Boever, Clewell & Fraser 2000)
pMG2200	<i>E. faecalis</i>	Van	AS, Bac, UV ^R	(Zheng <i>et al.</i> 2009)
pBEE99	<i>E. faecalis</i>	–	AS, Bac, Bee, UV ^R	(Coburn <i>et al.</i> 2010)
pAMβ1	<i>E. faecalis</i>	MLS _B		(Clewel <i>et al.</i> 1974)
PIP816	<i>E. faecium</i>	Van		(Sletvold <i>et al.</i> 2010)
pRUM	<i>E. faecium</i>	Cm, Sp, Sm, Van		(Grady & Hayes 2003)
pAM830	<i>E. faecalis</i>	MLS _B , Van		(Palmer <i>et al.</i> 2010)
pRE25	<i>E. faecalis</i>	Cm, MLS _B		(Schwarz, Perreten & Teuber 2001)
pHTβ	<i>E. faecium</i>	Van		(Tomita & Ike 2005)
pMG1	<i>E. faecium</i>	Gm, Km		(Tanimoto & Ike 2008)

Legenda:

^a (-)nenhuma resistência aos antibióticos conhecida; Tet–tetraciclina; Cm–cloranfenicol; Gm– elevada resistência à gentamicina; Cm–canamicina; MLS_B–macrólidos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B; Van–vancomicina.^bAS–substância de agregação; UV^R–resistência às radiações ultravioletas; Bee (*biofilm enhancer in Enterococcus*)–promove a formação de biofilmes em *Enterococcus* spp.; Cyl–citolisina; Bac–bacteriocina.

Dentro do grupo dos plasmídeos que não respondem a feromonas pode referir-se pAMβ1 que transporta genes que codificam para resistência aos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B em *E. faecalis* (Roberts *et al.* 1999) e pRUM (genes de resistência à eritromicina, cloranfenicol, estreptomicina e estreptotricina) em *E. faecium* (Rosvoll *et al.* 2010). Os plasmídeos pHTβ e pMG1 são importantes mediadores da resistência à vancomicina em *E. faecium* e *E. faecalis*, estando envolvidos na transferência do transposão não conjugativo Tn1546, que contém o gene *vanA* (Tomita *et al.* 2003; Tomita & Ike 2005). A transferência de regiões genômicas maiores mediada por plasmídeos tem sido reportada em *E. faecalis* assim como em outras espécies (Manson, Hancock & Gilmore 2010). Por exemplo, Palmer,

Kos & Gilmore (2010), descreveram em *E. faecalis*, a transferência de uma ilha de patogenicidade (codifica os fatores de virulência Esp, citolisina e substância de agregação) dependente dos plasmídeos pTEF1 e pTEF2 (Manson, Hancock & Gilmore 2010).

Vários transposões têm sido descritos em *Enterococcus* spp nomeadamente Tn5281 associado a elevados níveis de resistência aos aminoglicosídeos (Feizabadi *et al.* 2008) ou Tn5385 (Tn5281+Tn5384) estando envolvido na resistência à eritromicina, aminoglicosídeos, estreptomicina, penicilina e cloreto de mercúrio (Rice & Carias 1998). A família Tn3 também tem sido associada à resistência aos antibióticos nomeadamente macrólidos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B [Tn917 (Tn551), Tn3871] e a elevados níveis de resistência aos glicopéptidos (*vanA*-Tn1546) (Arthur *et al.* 1993; Shaw & Clewell 1985). Os transposões conjugativos têm sido associados à resistência às tetraciclinas (ex: Tn916, Tn5397, CW459TetM/Tn5801 e CTn6000), grupo MLS_B (ex:Tn1545) e vancomicina (Tn5382) (Hegstad *et al.* 2010). Mais exemplos e detalhes podem ser consultados na Tabela 3.

A mobilização e expressão de genes, assim como a diversidade estrutural de plasmídeos e transposões pode ser influenciada pela presença de diversas ISs. Entre as mais frequentemente descritas em *Enterococcus* spp encontram-se aquelas pertencentes às famílias IS3, IS4, IS6, IS30, IS66, IS110, IS200/IS605, IS256, IS982, IS1182, IS1380 e ISL3, encontrando-se quer em DNA cromossomal quer extracromossomal (Leavis *et al.* 2007; Dahl *et al.* 2000b; Quintiliani & Courvalin 1996; Camargo *et al.* 2005; Huh *et al.* 2004; Chen *et al.* 2006).

Presume-se que estes elementos genéticos estejam envolvidos na regulação da expressão genética através da rutura de genes após a sua inserção na região codificante ou na integração da região promotora, resultando na perda do promotor ou num promotor mais eficiente (Hegstad *et al.* 2010).

Por exemplo, IS1542 e IS1191, ambas pertencentes à família IS256, parecem contribuir para a expressão constitutiva do gene *vanA* e na expressão mais elevada da formação de biofilmes em *E. faecalis*, respetivamente (Brown, Townsley & Amyes 2001).

Todos estes elementos móveis contribuem para a plasticidade dos genomas de *Enterococcus* spp promovendo rearranjos no DNA cromossomal e plasmídico através de processos de recombinação homóloga (Rice & Carias 1998). Um exemplo aplica-se ao transposição Tn5385, um elemento genético integrado nos cromossomas de estirpes clínicas de *E. faecalis* (Rice & Carias 1998). Verificou-se que este elemento confere resistência à eritromicina, gentamicina, estreptomicina, tetraciclina/minociclina, penicilina (através da produção de β -lactamases) e cloreto de mercúrio (Rice & Carias 1998). As diferentes regiões do Tn5385 sugerem que ele evoluiu de uma combinação de elementos mais pequenos, tais como plasmídeos e transposições de *Enterococcus* (Tn5381, Tn4001, Tn917, IS1216), *Staphylococcus* (IS257, operão *mer*, Tn552) contendo o gene produtor de β -lactamase e regiões contendo pequenos plasmídeos), *Streptococcus* (plasmídeo pSM19035) e genes de replicação específicos de uma grande variedade de bactérias hospedeiras (Bonafede, Carias & Rice 1997; Rice *et al.* 1996; Rice & Carias 1998).

Relativamente às ilhas de patogenicidade (PAIs), foi descrita em *E. faecalis* uma PAI que codifica vários fatores de virulência (proteína Esp, citolisina, substância de agregação, hidrolase de ácidos biliares, proteínas superficiais e proteínas de stress) (Shankar, Baghdayan & Gilmore 2002). Presume-se que esta PAI, de conteúdo genético bastante variável, tenha a sua origem no ganho e perda de segmentos genómicos (McBride *et al.* 2009). Relativamente à sua disseminação, foi sugerido que se comporta como ICE, uma vez que possui genes codificantes de excisionases e integrases e DR (*direct repeats*) nas extremidades (McBride *et al.* 2009; Shankar, Baghdayan & Gilmore 2002).

Tabela 3. Transposições descritos em *Enterococcus* spp.

Designação do transposi	Classificação	Genes que conferem resistência/ virulência	Referências
Tn5281 (Tn4001), Tn3706 e elementos da mesma família		Aminoglicosídeos [<i>aac</i> (6')- <i>aph</i> (2'')]	(Simjee <i>et al.</i> 2000; Hodel-Christian & Murray 1991; Simjee, Fraise & Gill 1999; Straut <i>et al.</i> 1997; Straut, de Cespedes & Horaud 1996; Sahn & Gilmore 1995; Leelaporn <i>et al.</i> 2008)
Tn924		Aminoglicosídeos [<i>aac</i> (6')- <i>aph</i> (2'')]	(Thal <i>et al.</i> 1994)
Tn1547		Vancomicina (<i>vanB1</i>)	(Quintiliani & Courvalin 1996)
Tn5384	Transposões compostos	Aminoglicosídeos [<i>aac</i> (6')- <i>aph</i> (2'')], eritromicina (<i>ermB</i>), cloreto de mercúrio (<i>merX</i>)	(Bonafede, Carias & Rice 1997; Rice & Marshall 1994)
Tn5385		Aminoglicosídeos [<i>aac</i> (6')- <i>aph</i> (2'')], eritromicina (<i>ermB</i>), cloreto de mercúrio (<i>mer</i>), estreptocimicina (<i>aadE</i>), tetraciclina- minociclina (<i>tetM</i>), penicilina (<i>blaZ</i>)	(Rice & Carias 1998; Rice 2002)
Tn5405 e elementos da mesma família		Aminoglicosídeos (<i>aphA-3</i> , <i>aadE</i>), estreptotricina (semelhante ao gene <i>sat4</i>)	(Werner, Hildebrandt & Witte 2003; Derbise, de Cespedes & el Solh 1997)
Tn5482		Glicopéptidos (<i>vanA</i>)	(Handwerker & Skoble 1995)
Tn5506		Glicopéptidos (<i>vanA</i>)	(Heaton <i>et al.</i> 1996)
Tn917 (Tn551) e Tn3871	Família de	Macrólidos, lincosamidas e estreptogramina B [<i>erm</i> (B)]	(Tomich, An & Clewell 1980; Shaw & Clewell 1985; Banai & LeBlanc 1984)
Tn1546 e elementos da mesma família	transposões Tn3	Glicopéptidos (<i>vanA</i>)	(Arthur <i>et al.</i> 1993)

Tabela 3 (Continuação).

Designação do transposição	Classificação	Genes que conferem resistência/ virulência	Referências
Tn916, Tn918, Tn919, Tn920, Tn925, Tn3702, Tn5031, Tn5032, Tn5033, Tn5381 e Tn5383		Tetraciclina-minociclina [<i>tet(M)</i>]	(Rice, Marshall & Carias 1992; Torres <i>et al.</i> 1991; Franke & Clewell 1981; Fletcher, Marri & Daneo-Moore 1989; Clewell <i>et al.</i> 1985; Casey, Daly & Fitzgerald 1991; Horaud, Delbos & de Cespedes 1990)
Tn1545 e elementos da mesma família		Tetraciclina-minociclina [<i>tet(M)</i>], macrólidos, lincosamidas e estreptogramina B (<i>ermB</i>), canamicina (<i>aphA-3</i>)	(De Leener <i>et al.</i> 2004; Poyart-Salmeron <i>et al.</i> 1989)
Tn6009		Tetraciclina-minociclina [<i>tet(M)</i>], mercúrio (<i>mer</i>)	(Soge <i>et al.</i> 2008)
Tn5382, Tn1549 e elementos da mesma família	Transposições conjugativos	Vancomicina (<i>vanB2</i>)	(Dahl <i>et al.</i> 2000b; Garnier <i>et al.</i> 2000)
Tn5386		Lantibioticos (<i>spa</i>), proteína de adesão ao colagénio exposto superficialmente	(Rice <i>et al.</i> 2007; Bourgogne <i>et al.</i> 2008)
Homólogo do transposição conjugativo OG1RF		Proteínas de adesão	(Bourgogne <i>et al.</i> 2008)
Tn6000/EfcTnI		Tetraciclina [<i>tet (S)</i>]	(Roberts <i>et al.</i> 2006)
Elemento contendo o gene V583 <i>vanB1</i>		Vancomicina (<i>vanB1</i>)	(Paulsen <i>et al.</i> 2003)
Tn5397 e elementos da mesma família		Tetraciclina - minociclina [<i>tetM</i>]	(Agero, Pedersen & Aarestrup 2006; Poeta <i>et al.</i> 2007a)
Tn950		Eritromicina	(Takeuchi <i>et al.</i> 2005)

Diversos estudos descreveram a mobilização deste elemento genético, tais como a transferência do gene *esp* e de segmentos genômicos entre diferentes estirpes de *E. faecalis* (Oancea *et al.* 2004; Coburn *et al.* 2007), assim como a transferência cromossomal da PAI entre isolados de *E. faecalis* e de *E. faecalis* para *E. faecium* (Laverde Gomez *et al.* 2011a). Nesses estudos tem sido observado o envolvimento do plasmídeo pTEF1 (Coburn *et al.* 2007) ou a ação conjunta deste último com o plasmídeo pTEF2 (Manson, Hancock & Gilmore 2010). Neste último caso assistiu-se à disseminação do *locus* da cápsula, do transposição que confere resistência à vancomicina, da ilha de patogenicidade e dos alelos dos *housekeeping genes* usados na técnica de MLST, sendo a extensão da região transferida variável (Manson, Hancock & Gilmore 2010).

Em *E. faecium* foi identificada uma PAI, apresentando em comum com a PAI de *E. faecalis* o gene *esp* e uma sequência de 10kb (van Schaik *et al.* 2010). Este facto está relacionado com processos de transferência horizontal de genes entre as duas espécies, como referido acima, ou através da aquisição individual de genes de bactérias de outros géneros (van Schaik *et al.* 2010). Esta disseminação horizontal está relacionada com a presença do elemento EfaB5 e do gene *rps1*, uma vez que EfaB5 é um elemento conjugativo e integrativo e o gene *rps1* é um local preferencial de integração de elementos genéticos móveis em bactérias Gram positivas (van Schaik *et al.* 2010; Brochet *et al.* 2008). Adicionalmente, a elevada recombinação deste elemento genético com a aquisição de novos genes, assim como a sua mobilização através de conjugação bacteriana, resulta numa disseminação rápida, contribuindo para o aparecimento de estirpes bacterianas com maior patogenicidade (van Schaik *et al.* 2010).

Existe ainda pouca informação acerca da importância dos fagos na disseminação de fenótipos de virulência e de resistência aos antibióticos em *Enterococcus* spp. Contudo, estes elementos podem apresentar uma grande contribuição para a diversidade do genoma de *E. faecium* e *E. faecalis* (Jett, Huycke & Gilmore 1994; Nigutova *et al.* 2008). Num estudo recente realizado com fagos enterocócicos, observou-se o seu envolvimento na disseminação da resistência à tetraciclina e gentamicina entre

diferentes espécies de *Enterococcus* (Mazaheri Nezhad Fard, Barton & Heuzenroeder 2011).

6.2. Disseminação horizontal da resistência à ampicilina em *Enterococcus* spp

6.2.1. β -lactamases

A resistência aos β -lactâmicos pode ser mediada por β -lactamases ou PBP com baixa afinidade para esta classe de antibióticos (ver ponto 5.).

A disseminação horizontal de β -lactamases está associada a elementos genéticos diferentes. A localização das β -lactamases enterocócicas (*blaZ*) foi frequentemente identificada em plasmídeos transferíveis que também transportavam genes de resistência à gentamicina (Murray & Mederski-Samaroj 1983; Wanger & Murray 1990; Murray *et al.* 1992; Patterson *et al.* 1990). Esses plasmídeos encontravam-se disseminados em diferentes clones de *E. faecalis* e possuíam distintos RFLPs, apesar do gene *blaZ* e do gene que codifica para a resistência à gentamicina serem comuns. Sugeriu-se que os plasmídeos sofreram evoluções distintas após terem sido adquiridos ou que o gene *blaZ* tenha sido disseminado por um transposição conjugativo a partir de *Staphylococcus* para diferentes plasmídeos de *E. faecalis* (Patterson *et al.* 1990). Em outro estudo, isolados de *E. faecalis* obtidos de um mesmo hospital durante o período de 7 anos mantiveram-se endêmicos, não tendo sido reportada a transferência horizontal da β -lactamase para outras estirpes (Seetulsingh *et al.* 1996).

β -lactamases com localização cromossomal também foram descritas quer em *E. faecalis* quer em *E. faecium* (Sarti *et al.* 2012; Rice *et al.* 1991). Após a análise do ambiente genético a jusante do gene que expressa a β -lactamase em *E. faecalis*, identificou-se a presença de uma sequência encontrada nos elementos Tn552 e Tn4002, dois transposões que transportam *blaZ* em *Staphylococcus* spp (Rice & Marshall 1992). Um outro transposição, denominado Tn5385, foi encontrado integrado no cromossoma bacteriano de um isolado de *E. faecalis* (Rice & Carias 1998). Presume-se que este

elemento genético móvel de estrutura complexa seja o resultado da combinação de material genético de diversos géneros bacterianos (ver ponto 6.1.) (Rice & Carias 1998). No caso de *E. faecium*, não foi caracterizado o elemento cromossomal associado a *blaZ* (Sarti *et al.* 2012) e em *E. faecalis* recentes (Chouchani *et al.* 2011) não se conhece quer a localização quer o elemento genético responsável pela aquisição de TEM-1.

6.2.2. Penicillin binding proteins (PBPs)

Antes de 1998, nunca tinha sido demonstrada a transferência horizontal do gene *pbp5* em *E. faecium*. A transferência da resistência aos β -lactâmicos, por intermédio de PBPs, apenas era conhecida em *E. hirae*, sendo o gene de localização plasmídica responsável pela expressão da molécula PBP3r (Piras *et al.* 1993).

Em 1998, um grupo de investigação detetou que a transferência simultânea da resistência à ampicilina e vancomicina (*vanB*) era mediada pelo transposão denominado de Tn5382 (Carias *et al.* 1998). Este transposão de 27kb estava localizado no cromossoma bacteriano e era formado pelo Tn1549 (contendo um conjunto de genes, incluindo *vanB*, importantes na resistência à vancomicina) distanciado do gene *pbp5* (resistência à ampicilina) de 113 pb (Carias *et al.* 1998) (Figura 5). Neste transposão podem ocorrer ligeiras variações na sua estrutura através da introdução de sequências de inserção, tais como ISEnfa110, ISEnfa150 (ver Figura 5) (Carias *et al.* 1998) e ISEnfa3 (Lee & Kim 2003).

A presença e mobilização do transposão Tn5382 foi posteriormente detetada em diversas regiões geográficas, em várias espécies de *Enterococcus* spp isoladas de humanos (isolados clínicos), animais (suínos, animais de estimação) e alimentos (Hanrahan, Hoyen & Rice 2000; Lu *et al.* 2005; Torres *et al.* 2006; Dahl *et al.* 2000b; Torres *et al.* 2003; Lopez *et al.* 2009b). Este transposão está associado quer a estirpes que causam infeções ocasionais, quer a surtos por dispersão clonal de *E. faecium*-CC17 (Valdezate *et al.* 2009). Num isolado de *E. faecalis* pertencentes ao CC2 foi também

observado o transposição Tn5382 (Lopez *et al.* 2011), embora não tenha sido detetada resistência à ampicilina (Lopez *et al.* 2011).

A disseminação da resistência à ampicilina (na ausência da presença de β -lactamases) nem sempre está associada à resistência à vancomicina e ao Tn5382. Num estudo efetuado nos Estados Unidos verificou-se que o gene *pbp5* foi transferido de *E. faecium* de múltiplas origens e nichos ecológicos diferentes (isolados clínicos dos Estados Unidos e Europa, isolados de perús) para uma estirpe recetora sem este gene, independentemente das estirpes selvagens possuírem ou não o gene de resistência à vancomicina (Rice *et al.* 2005b). Num outro estudo efetuado pelos mesmos autores, identificaram-se dois transposões da família Tn916 (Tn916 e Tn5386), responsáveis pela excisão cromossomal, de uma região genómica em que está incluído o gene *pbp5* em *E. faecium*, (Rice *et al.* 2005b; Rice *et al.* 2007; Rice *et al.* 2005a) (Figura 6).

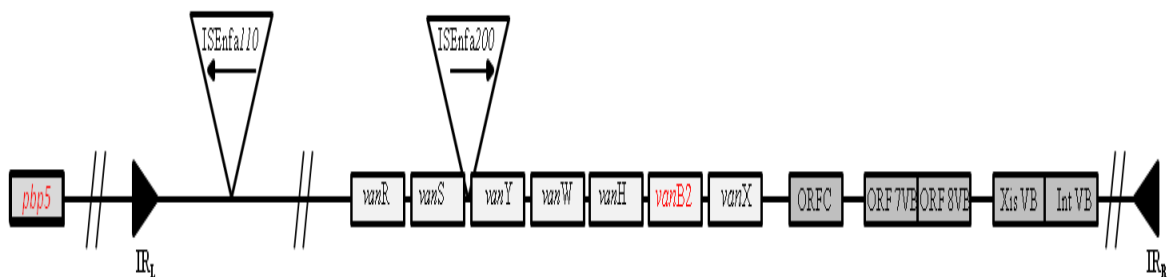


Figura 5. Representação esquemática do transposão Tn5382/1549, incluindo a ligação entre o transposão Tn1549 e o gene *pbp5* (Carias *et al.* 1998; Dahl *et al.* 1999).

No entanto, estes transposões não foram identificados em todos os isolados que transferiam *pbp5*, sugerindo-se que outro transposão ainda não identificado ou elementos genéticos móveis possam ser responsáveis pela excisão de segmentos genómicos de diversos tamanhos nos quais está incluído o gene *pbp5* (Rice *et al.* 2005b).

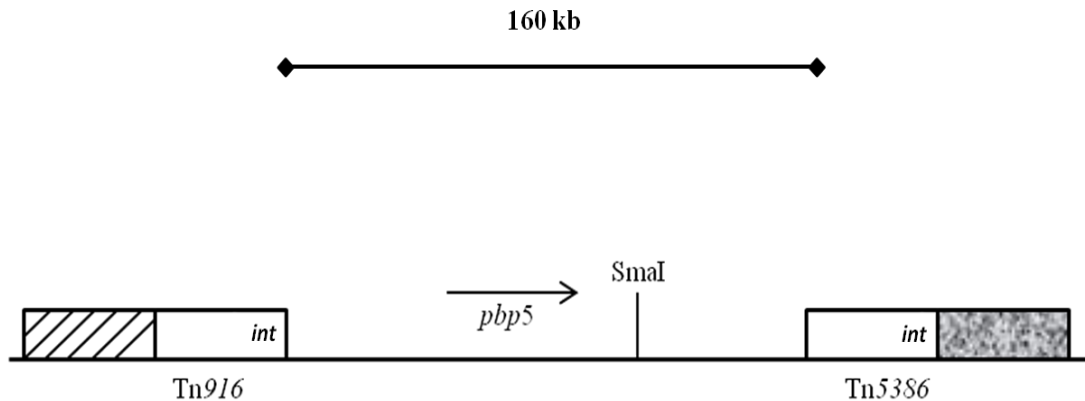


Figura 6. Estrutura da plataforma genética proposta para a disseminação horizontal da resistência à ampicilina não associada a Tn5382. As localizações dos transposões Tn916 e Tn5386, assim como do gene *pbp5*, estão devidamente assinaladas (adaptado de (Rice *et al.* 2005a)).

6.3. Imunidade contra a inserção de DNA externo

Recentemente, foram descobertos nos organismos procariotas mecanismos de defesa que lhes conferem imunidade contra vírus, plasmídeos e outros elementos genéticos móveis (Terns & Terns 2011). Um desses mecanismos é mediado por pequenas moléculas de RNA e respectivas proteínas provenientes de sequências genômicas CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*) e genes *Cas* (CRISPR-associated) (Terns & Terns 2011). Os *loci* CRISPR são caracterizados por possuírem pequenas repetições de 30 a 40 nucleótidos, sendo essas repetições separadas por sequências variáveis de tamanho semelhante (Terns & Terns 2011). As sequências variáveis são provenientes de vírus, plasmídeos e outros elementos genéticos externos à bactéria que conferem imunidade contra esses mesmos elementos genéticos móveis (Bolotin *et al.* 2005; Garneau *et al.* 2010; Marraffini & Sontheimer 2008). O mecanismo detalhado de defesa ainda não é conhecido por completo (ver Figura 7), mas presume-se que um segmento de um elemento genético móvel seja incorporado dentro das sequências CRISPR, entre as repetições palindrômicas (Barrangou *et al.* 2007). A sequência que contém o elemento genético móvel é transcrita num RNA de pequeno tamanho, denominado crRNA (Brouns *et al.* 2008). Este crRNA vai depois associar-se a nucleases, codificadas pelos genes *cas*, finalizando com a inativação de posteriores

elementos genéticos móveis, derivados do elemento incorporado nas sequências CRISPR, que entram na bactéria (Barrangou *et al.* 2007; Brouns *et al.* 2008).

Em *E. faecalis* foi possível verificar que as estirpes que adquirem novos fenótipos por intermédio dos elementos genéticos móveis possuem sistemas de defesa ineficazes, resultando em estirpes bacterianas multirresistentes a diversas classes de antibióticos, portadoras de genes de virulência, entre outras características (Palmer & Gilmore 2010).

No caso de *E. faecium*, isolados pertencentes a CC17 possuem pouca imunidade contra a entrada de elementos genéticos móveis (Palmer & Gilmore 2010). Verificou-se que os plasmídeos da família Inc18 e o transposão conjugativo Tn916 (portador do gene *tetM*) não foram observados na região das sequências variáveis entre as repetições palindrômicas de *E. faecalis* (Flannagan *et al.* 2003; Palmer & Gilmore 2010), tendo sido sugerido que esses elementos genéticos móveis têm a capacidade de evadir os mecanismos protetores dos *loci* CRISPR (Palmer & Gilmore 2010).

Os dados disponíveis parecem apontar que os elementos genéticos móveis e os mecanismos de imunidade para o DNA exógeno têm a função de estabilizar o genoma dos *Enterococcus* spp e torná-lo mais diversificado. A dinâmica entre estes fatores opostos é importante na evolução bacteriana, sendo que o uso intensivo de antibióticos fez com que essa mesma dinâmica fosse direcionada numa aquisição mais elevada de elementos genéticos móveis que conferem resistência a esses agentes antibacterianos (Palmer & Gilmore 2010).

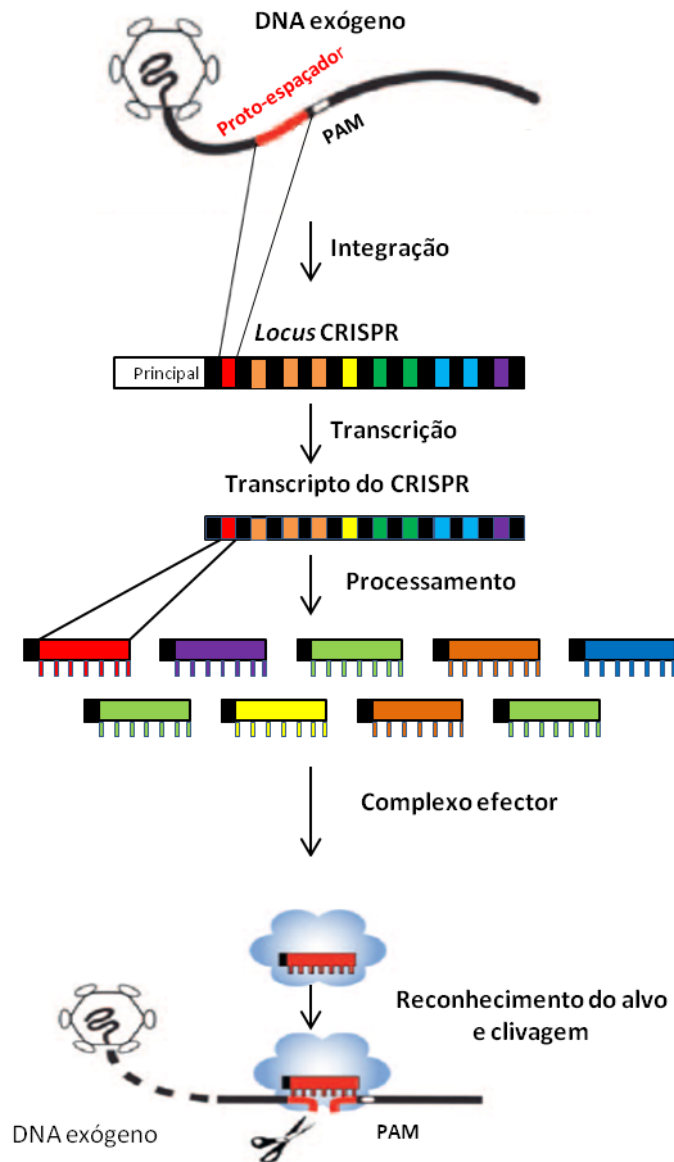


Figura 7. Representação esquemática do mecanismo de defesa promovido pelos *loci* CRISPR (adaptado de (Terns & Terns 2011)).

II. OBJETIVOS

Apesar do género bacteriano *Enterococcus* apresentar uma resistência natural aos β -lactâmicos, a ampicilina é usada eficazmente no tratamento das infeções promovidas por essas bactérias. No entanto, a partir da década de 80, os níveis de resistência à ampicilina aumentaram, em particular em estirpes de *E. faecium* nosocomiais de diferentes partes do globo.

Neste trabalho coloca-se a hipótese do gene *pbp5* ser frequentemente mobilizado entre *E. faecium*, justificando as elevadas taxas de resistência à ampicilina observadas. Para comprovar esta hipótese, o objetivo geral deste trabalho consistiu em estudar a mobilização de *pbp5* a partir de estirpes pertencentes a vários complexos clonais e nichos ecológicos, e caracterizar as plataformas genéticas móveis que transportam este gene.

Os objetivos específicos focaram-se em:

- Avaliar se a resistência à ampicilina mediada pelo gene *pbp5* é disseminada por transferência horizontal para bactérias recetoras com diferentes contextos genéticos (diferentes STs, *pbp5*⁺ e *pbp5*⁻) a partir de isolados de *E. faecium* oriundos dos nichos humano, animal e ambiental.
- Determinar se a transferência horizontal do gene *pbp5* está associada a linhagens clonais específicas.
- Avaliar a estabilidade da resistência à ampicilina na presença e ausência de pressão seletiva.
- Verificar se o fenótipo de resistência à ampicilina é semelhante em estirpes selvagens e transconjugantes obtidos de diferentes bactérias recetoras (*pbp5*⁺ e *pbp5*⁻) e se a transferência da resistência à ampicilina se procede conjuntamente com a resistência a outras classes de antibióticos.

- Identificar a localização genómica dos elementos genéticos móveis responsáveis pela resistência à ampicilina.
- Avaliar se a transferência do gene *pbp5* está ou não associada à presença de transposões conjugativos previamente relacionados com a sua mobilização e outros comumente encontrados em bactérias de Gram positivo.
- Comparar a diversidade de mutações e do ambiente genético de *pbp5* em *E. faecium* de vários nichos ecológicos, STs, e com e sem capacidade de mobilizar este gene.
- Integrar os dados obtidos com outros previamente descritos na literatura e/ou em bases de dados de genes e elementos genéticos.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Isolados bacterianos

Foram estudados 78 isolados de *Enterococcus faecium* resistentes à ampicilina obtidos entre 1996 e 2009, dos seguintes nichos ecológicos de Portugal:

- Quatro suiniculturas com produção intensiva, localizadas em distintas regiões geográficas do Norte, Centro e Sul. As bactérias foram isoladas de águas de lagonagem (n=5), águas residuais (n=5), pó das instalações (n=4), fezes dos animais (n=3) e alimento medicamentoso (n=1).
- Interior de carcaças de três frangos e um peru para consumo humano, adquiridos em dois locais de venda da cidade do Porto (n=4 isolados).
- Cinco hospitais localizados em distintas regiões geográficas do Norte e Centro. As bactérias foram isoladas de diferentes pacientes e das seguintes amostras biológicas: urina (n=13); sangue (n=7); exsudados (n=7); líquido cefalorraquidiano (n=1); catéter (n=3) e amostra biológica desconhecida (n=8).
- Fezes de dois humanos saudáveis residentes no Norte do país (n=2 isolados). Os indivíduos não consumiram antibióticos ou contactaram com o ambiente hospitalar 3 e 12 meses antes da colheita, respetivamente.
- Águas residuais colhidas a montante (n=2 isolados) e a jusante (n=13 isolados) de 4 unidades hospitalares da cidade do Porto.

2. Pesquisa de β -lactamases

A produção de β -lactamases nas bactérias selvagens de *E. faecium* de diferentes nichos ecológicos foi avaliada pelo teste de nitrocefim. De uma solução de nitrocefim retiraram-se 5 μ l e colocaram-se sobre as colónias bacterianas que cresceram à volta de um disco de ampicilina. A presença de β -lactamases foi confirmada pela alteração de cor do nitrocefim de amarelo para vermelho.

3. Avaliação da capacidade de transferência horizontal de *pbp5*

3.1. Ensaio de conjugação

Numa primeira fase dos ensaios de conjugação incluíram-se os isolados selvagens descritos no ponto 1. e a estirpe *E. faecium* GE1 (ATCC 51558; *pbp5*⁻) como bactéria recetora (Tabelas 4 e 5). Os isolados selvagens e a recetora foram inoculados separadamente em 5 ml de BHI (*Brain Heart Infusion*, OXOID) em caldo. Os caldos das bactérias selvagens incluíram ampicilina na concentração de 2 µg/ml. Após incubação (37°C/18h), os isolados selvagens e a recetora foram misturados na proporção de 1:1 e 0,2 ml desta mistura foram inoculados no centro de uma placa de BHI agar (37°C/18h). O crescimento resultante foi transferido para 1 ml de soro fisiológico estéril e 0,1 ml desta suspensão foi inoculada em placas de BHI agar suplementadas com rifampicina (30 mg/L), ácido fusídico (25 mg/L) e ampicilina (10 mg/L) (24-48h/37°C). De cada placa suplementada com antibióticos foram selecionadas entre 1 a 5 colónias para BHI agar. Estes ensaios de conjugação foram repetidos num máximo de três vezes para cada uma das bactérias.

Com o objetivo de avaliar se *pbp5* era também transferível para bactérias que já possuíam este gene, os ensaios de conjugação acima descritos foram repetidos usando os isolados selvagens, em que foi observada a transferência do gene *pbp5* para *E. faecium* GE1, e as bactérias recetoras *E. faecium* BM4105RF e *E. faecium* 64/3 (Tabelas 4 e 5). Os ensaios foram realizados uma única vez.

3.2. Confirmação de transconjugantes

3.2.1. Avaliação da suscetibilidade a antibióticos

A confirmação das bactérias transconjugantes foi efetuada pela observação da diminuição de suscetibilidade à ampicilina (10 µg), resistência à rifampicina (5 µg) e ácido fusídico (10 µg), através do método de difusão em agar em meio de Mueller-Hinton II (BioMérieux, Marcy l'Étoile, França) e usando as recomendações de *Clinical*

and Laboratory Standards Institute (CLSI 2010). Este método foi também usado para a avaliação da cotransferência da resistência a outros antibióticos (Oxoid e Liofilchem) que incluíram a vancomicina (30 µg), teicoplanina (30 µg), eritromicina (15 µg), quinupristina-dalfopristina (15 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (120 µg), estreptomicina (300 µg) e tetraciclina (30 µg; este antibiótico foi utilizado apenas em transconjugantes gerados de *E. faecium* BM4105RF e *E. faecium* 64/3).

Tabela 4. Bactérias recetoras utilizadas nos ensaios de conjugação.

Bactérias recetoras	Perfil de resistência aos antibióticos	Referência bibliográfica
<i>E. faecium</i> GE1 (ATCC 51558)	Rifampicina ^R , Ácido fusídico ^R , Tetraciclina ^R , <i>tetM</i> , CW459 <i>tetM</i> ; ausência do gene <i>pbp5</i>	(Eliopoulos, Wennersten & Moellering 1982)
<i>E. faecium</i> BM4105RF	Rifampicina ^R , Ácido fusídico ^R ; presença do gene <i>pbp5</i>	(Carlier & Courvalin 1990; Tomita <i>et al.</i> 2002; Aarestrup 2000)
<i>E. faecium</i> 64/3	Rifampicina ^R , Ácido fusídico ^R ; presença do gene <i>pbp5</i>	(Werner <i>et al.</i> 2003)

R-Resistente

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) à ampicilina foi também estudada pelo método de diluição em agar em meio de Mueller-Hinton II (CLSI 2010), no sentido de avaliar a variabilidade de fenótipo de resistência entre bactérias recetoras, transconjugantes e isolados selvagens. As concentrações limite para a ampicilina usadas neste ensaio variaram entre 2 µg/ml e 512 µg/ml. A menor concentração de antibiótico com a capacidade de inibir o crescimento bacteriano foi registada como sendo a CMI, classificando os isolados estudados nas categorias sensível ou resistente, de acordo com os critérios definidos (CLSI 2010) para *Enterococcus* spp.

Tabela 5. Bactérias selvagens resistentes à ampicilina e bactérias recetoras usadas nos diferentes ensaios de conjugação.

Bactérias	Origem	Nº de isolados	Bactérias recetoras usadas nos ensaios de conjugação
Selvagens	Hospitalar	39	<i>E. faecium</i> GE1
	Humanos saudáveis	2	
	Águas residuais	15	
	Suiculturas	18	
	Aves para consumo humano	4	
Selvagens com capacidade de transferir o gene <i>pbp5</i> para <i>E. faecium</i> GE1	Hospitalar	6	<i>E. faecium</i> BM4105RF e <i>E. faecium</i> 64/3
	Humanos saudáveis	1	
	Águas residuais	4	
	Suiculturas	3	
	Aves para consumo humano	0	

3.2.2. Métodos moleculares

A confirmação da presença de transconjugantes foi também avaliada através da técnica de PFGE (*Pulsed-Field-Gel-Electrophoresis*), em que se comparou o perfil de restrição (*Sma*I) das bactérias recetoras, selvagens e transconjugantes (para mais detalhes ver ponto 4.1.).

No caso dos transconjugantes associados a *E. faecium* GE1 (*pbp5*⁻) foi ainda realizada a pesquisa do gene *pbp5* pelo método de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Em 30 µl de água ultrapura estéril foi preparada uma suspensão bacteriana com uma concentração superior a 2 *McFarland*. Desta suspensão foram retirados 2 µl diretamente para a mistura de reagentes de PCR (volume final de 25 µl) necessária à amplificação do gene *pbp5*. O DNA foi diretamente extraído na mistura de reagentes através de lise térmica (95°C durante 10 min), num passo prévio ao programa de amplificação do DNA. Foram incluídos controlos positivos (*E. faecium* BM4105RF) e negativos (*E. faecium* GE1) em

todas as reações de amplificação. A sequência dos *primers* *pbp5F* e *pbp5R*, concentração dos reagentes e condições amplificação encontram-se descritas na Figura 8. Os termocicladores utilizados foram o *BioRad iCycler* e o *BioRad MyCycler*.

Concluído o processo de amplificação, transferiram-se 10 µL de produto de PCR para um gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1X, suplementado com 0,01% de *Sybr Safe* (Invitrogen). A eletroforese foi realizada a uma voltagem de 110V durante 45 minutos. A visualização das bandas de DNA foi efetuada num transiluminador e os resultados foram adquiridos digitalmente com o programa *Quantity One version 4.6.1 Buidl 055* (Bio-Rad). O tamanho dos amplicões foi determinado por comparação com o controlo positivo e com um marcador de fragmentos de DNA com tamanho conhecido (HypperLadder IV, Bioline).

4. Avaliação da relação clonal

4.1. Eletroforese em campo pulsado

A relação clonal dos isolados selvagens com capacidade de transferir o gene *pbp5*, dos isolados suspeitos de serem transconjugantes e respectivas estirpes recetoras foi avaliada por eletroforese em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*-PFGE), segundo condições previamente descritas (Kaufmann 1998). Inoculou-se o meio de BHI caldo com uma colónia bacteriana, sendo posteriormente incubado em banho-maria a 37°C, com agitação e durante um período de 18 horas. Após crescimento bacteriano, o meio de BHI caldo foi centrifugado durante 12 minutos a 4000 rpm. O *pellet* foi ressuspenso em 1,5 ml de solução PIV (10 mM Tris-HCl pH=7,6; 1M NaCl) e 0,5 ml desta solução foram adicionados a 0,5ml de agarose (Seakem Gold Agarose, FMC Bioproducts) a 2%. Esta mistura foi colocada num molde e depois transferida para o frigorífico durante 15 minutos. Depois de solidificada, a mistura agarose-bactéria foi retirada dos moldes e colocada em contacto com a solução de lise EC (6 mM tris HCl pH=7,6; 1M NaCl; 100 mM EDTA pH=7,5; 0,5% Brij-58; 0,2% ácido desoxicólico; 0,5% sarcosil; 20 mg/L RNase; 1 mg/ml lisozima) e incubada a 37°C durante um período de 18 horas num banho-maria com agitação. A solução EC foi rejeitada, tendo-se seguido uma fase de desproteínização usando-se a solução ESP (0,5M EDTA pH=9,

1% sarcosil, 50 mg/L proteinase K) e um tempo de 24-48 horas em banho-maria a 50°C, com agitação. Esta última solução foi rejeitada, seguindo-se uma lavagem dos blocos de agarose com uma solução de TE (10 mM Tris-HCl pH=7,5; 0,1 mM EDTA) em 3 períodos de 30 minutos a 37°C num banho-maria com agitação. Fragmentos de cerca de 3-4 mm de agarose-DNA foram digeridos com a enzima de restrição *Sma*I (20 U/ μ l) durante um período de 18 horas.

A eletroforese foi realizada num aparelho CHEF DR-III (BioRad, LaJolla, CA), usando-se um gel de agarose a 1,5% (Seakem Gold Agarose, FMC Bioproducts), em tampão TBE 0,5X (445 mM de Tris base, 445 mM de ácido bórico, 10 mM de EDTA), pulsos de 1-20 segundos, voltagem de 6 V/cm² e temperatura do tampão a 14°C, durante 26 horas. O gel foi corado com brometo de etídio (10 μ g/ml) durante 30 minutos e, quando necessário, descorado com água pelo período de tempo de 10-15 minutos. Os resultados foram adquiridos com o *software Kodak Digital Science 1D* ou *Quantity One version 4.6.1 Build 055* (Bio-Rad). O marcador de DNA utilizado foi o *Low Range PFG Marker* (New England Biolabs, Inc). As relações clonais foram estabelecidas seguindo os critérios propostos previamente descritos (Tenover *et al.* 1995). Os diferentes pulsotipos foram designados com números ou letras distintos. Os subtipos foram definidos colocando um número a seguir à designação do pulsotipo, indicando o número de bandas que diferem do perfil de PFGE inicial.

4.2. Multi Locus Sequence Typing (MLST)

O estudo da estrutura populacional das bactérias selvagens de *E. faecium* com (n=11) e sem capacidade de transferir o gene *pbp5* (n=32) foi realizado por MLST para identificar se as sequências tipo (ST) associadas à transferência de *pbp5* estavam incluídas em complexos clonais específicos. O ST de algumas destas bactérias (n=22) foi previamente determinado (Freitas *et al.* 2009b).

4.2.1. Extração do DNA

A extração de DNA genómico foi realizada pelo método de lise pelo calor. As células bacterianas após crescimento em BHI (37°C/18h) foram inoculadas num tampão de lise (0,25% SDS; 0,05N NaOH) e sujeitas a uma temperatura de 100°C durante 15 minutos. O lisado celular foi diluído (10 mM Tris-HCl, pH=8,5), centrifugado e o sobrenadante guardado a -20°C.

4.2.2. Amplificação dos ácidos nucleicos

Foram efetuados PCRs para a amplificação de sete genes conservados (*purK*, *gdh*, *atpA*, *gyd*, *ddl*, *pst* e *adk*) que codificam para funções celulares fundamentais à bactéria, usando condições previamente descritas (Homan *et al.* 2002). A sequência dos *primers*, a concentração dos reagentes e as condições amplificação encontram-se descritas na Tabela 6. Para todas as reações foram usados controlos positivos (*E. faecium* BM4105RF).

Os produtos de amplificação foram submetidos a uma eletroforese e depois visualizados através de *software* de aquisição de imagem, tal como descrito no ponto 3.2.2. Os amplicões foram sequenciados (empresa Stabvida, Oeiras-Portugal) utilizando-se os *primers* usados nas reações de amplificação, de modo a detetar variantes alélicas de cada um dos genes amplificados.

A análise e edição das sequências foi efetuada no programa Chromas (Chromas n.d.). Com o software ClustalW (ClustalW2 n.d.), a sequência foi comparada com o alelo 1 de cada um dos sete genes conservados (*purK*, *gdh*, *atpA*, *gyd*, *ddl*, *pst* e *adk*). A avaliação da Sequencia Tipo (ST) foi posteriormente determinada através da inserção da informação obtida na base de dados *eBurst* (*eBURST V3* n.d.).

5. Avaliação da estabilidade da resistência à ampicilina

Com este ensaio pretendeu-se verificar se os isolados selvagens e os transconjugantes de *E. faecium* GE1 mantinham a resistência à ampicilina quer na ausência quer na presença da pressão seletiva. Inicialmente, procedeu-se à inoculação das bactérias em placas de BHI suplementadas com 16 µg/ml de ampicilina. Após 24 horas a 37°C, as bactérias foram semeadas para meios de BHI agar e meios de BHI agar suplementados com 16 µg/ml de ampicilina. Estas inoculações foram diariamente repetidas até um número máximo de 30x. Após incubação de cada nova inoculação, a avaliação da suscetibilidade à ampicilina foi determinada pelo método de difusão em agar com discos, segundo os procedimentos recomendados pelo CLSI (CLSI 2010). Em caso de suscetibilidade, a presença/ausência do gene *pbp5* foi avaliada pelo método de PCR (ver ponto 3.2.2).

6. Pesquisa da localização genómica do gene *pbp5*

A pesquisa da localização plasmídica ou cromossomal do gene *pbp5* foi realizada nos isolados selvagens com capacidade de transferirem *pbp5*, nas bactérias recetoras e seus respetivos transconjugantes. Os procedimentos realizados foram os seguintes:

a) PFGE - A preparação do DNA para a corrida de eletroforese em campo pulsado, condições gerais da eletroforese e visualização do perfil de restrição estão descritos no ponto 4.1. Especificamente para a localização do gene *pbp5*, o DNA total foi digerido com a enzima de restrição *I-CeuI* (1,25 U/µl) (New England Biolabs, Inc) durante um período de 18h. Esta enzima reconhece apenas pontos de corte no DNA cromossomal, deixando o DNA plasmídico intacto. O DNA digerido foi sujeito a uma separação utilizando-se pulsos de 5-30s (22h).

Posteriormente, procedeu-se também à realização de um novo PFGE de DNA sujeito a restrição com *SmaI* (20 U/µl, 18h). Esta enzima tem uma maior frequência de corte, permitindo avaliar com uma maior precisão a heterogeneidade de tamanho nos

fragmentos de DNA que incluem *pbp5*. As condições de separação dos fragmentos obtidos estão descritas no ponto 4.1.

b) *Southern blotting* – Após o PFGE, os fragmentos de DNA foram transferidos para uma membrana de nylon (Ge Healthcare; Amersham Hybond-N+ 0,45 µm). O DNA foi posteriormente fixado à membrana com luz ultravioleta durante 2 min. Uma sonda de 1984 pb específica para o gene *pbp5* foi produzida por PCR usando-se os *primers* *pbp5F* e *pbp5R*. A sequência dos *primers* e condições de amplificação estão descritos na Figura 8. A hibridação desta sonda foi feita no DNA sujeito a restrição quer com enzima *I-CeuI*, quer com a enzima *SmaI*, tendo sido usado como controlo negativo a bactéria *E. faecium* GE1. Adicionalmente, uma sonda de 669pb, específica para o DNA da subunidade 23S ribossomal (23SrDNA), foi produzida com o objetivo de confirmar se as bandas obtidas com a enzima *I-CeuI* eram realmente cromossomais, uma vez que esta sonda não se liga ao DNA plasmídico.

As duas sondas referidas foram produzidas usando o DNA genómico da bactéria transconjugante TCSN71.1 GE1. Para cada uma das duas sondas mencionadas foi efetuada a respetiva marcação para a hibridação. Este procedimento iniciou-se com a diluição de 1:10 do DNA a ser marcado (10 ng/µL) com água fornecida pelo kit de marcação de sondas (ECLTM Random Prime Labelling). Posteriormente procedeu-se à desnaturação do DNA durante 5 minutos a 99° C num termociclador. Depois, o DNA desnaturado foi colocado em gelo durante 5 minutos. Adicionou-se a esse DNA os reagentes do kit para marcação de sondas (água, tampão da reação, reagente de marcação e um *cross-linker*) recomendados e fornecidos pelo kit utilizado (ECLTM Random Prime Labelling). Após homogeneizar bem a solução resultante, efetuou-se uma incubação a 37° C num banho de água durante 30 minutos. Antes de adicionar cada uma das sondas à membrana que contém os fragmentos de DNA separados por PFGE, efetuou-se um pré-aquecimento do tampão de hibridação (NaCl e *Blocking reagent*), colocando a membrana nesse tampão pré-aquecido durante 15 minutos. Após esse procedimento adicionou-se a sonda já marcada, colocando-se em contacto com a membrana, deixando-se a hibridar a uma temperatura de 70°C durante a noite. No dia seguinte removeu-se o tampão de hibridação com a sonda marcada e colocou-se no

congelador. Posteriormente transferiu-se para a membrana 50 mL de um Tampão Primário pré-aquecido (ureia; SDS; 0,5M Nafosfato pH=7; NaCl, *Blocking reagent*, 1M MgCl₂), colocando-se depois no forno durante 10 minutos. Os últimos dois procedimentos (adição de tampão primário pré-aquecido e incubação durante 10 minutos num forno) foram repetidos mais uma vez. O Tampão Primário foi rejeitado, sendo que depois foi adicionado à membrana 100 mL de Tampão Secundário (Tris-base, NaCl e MgCl₂), lavando-se com agitação durante 5 minutos à temperatura ambiente. Rejeitou-se depois o Tampão Secundário repetindo-se novamente o processo de lavagem atrás referido. Após os processos de lavagem, colocou-se a membrana em papel de filtro, deixou-se a secar durante 5 minutos, colocou-se em papel aderente e adicionou-se cerca de 3 mL de Reagente de Detecção (Amersham Life Science), deixando-se atuar durante 4 minutos. Depois cobriu-se a superfície da membrana com uma película aderente, retirando-se o excesso de reagente. Por fim, numa câmara escura, colocou-se uma película de filme em contacto com a membrana, tendo-se aguardado 2h para o processo de revelação.

7. Caracterização da variabilidade alélica do gene *pbp5* e do seu ambiente genético

7.1. Variabilidade alélica do gene *pbp5*

A avaliação do tipo de mutações presentes no gene *pbp5* foi realizada nas bactérias transconjugantes de *E. faecium* GE1 e em 10 bactérias selvagens que não transferiram este gene nos ensaios de conjugação e representativas dos diferentes nichos ecológicos. Assim, procedeu-se a uma amplificação completa do gene *pbp5* pelo método de PCR, sendo que este processo juntamente com as condições de eletroforese encontra-se descrito no ponto 3.2.2. Neste método de PCR, uma vez que se pretendeu uma amplificação completa do gene *pbp5*, utilizaram-se os pares de *primers* *ftsWF*(P3)/*pbp5R*(P2) e *pbp5RInv*(P4)/*EFLKRInv*(P5). A sequência dos *primers*, concentração dos reagentes e condições de amplificação encontra-se descrita na Figura 8.

Após a confirmação da amplificação da região genômica, os respectivos produtos de PCR foram purificados com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) e sequenciados (Stabvida.com) por *primer walking* com o objetivo de analisar a presença de mutações.

As sequências nucleotídicas obtidas foram traduzidas com a ferramenta de tradução “*Translate a DNA Sequence*” (*Translate a DNA Sequence* n.d.). Posteriormente com o programa ClustalW, as sequências aminoacídicas das bactérias estudadas (selvagens e transconjugantes) foram comparadas com a sequência aminoacídica do isolado *E. faecium* BM4107 suscetível à ampicilina (Nº de acesso ao GenBank AF364092.1).

7.2. Estudo do ambiente genético da região de inserção do gene *pbp5*

Com este ensaio pretendeu-se avaliar a variabilidade da região publicada no GenBank de 8 kb que incluía os genes *N-acyl-glucosamine-6-phosphate-2-epimerase*, proteínas hipotéticas, *ftsW*, *psr*, *pbp5* e uma bomba de efluxo de iões. Nestes ensaios, foram incluídas as bactérias recetoras e seus transconjugantes e alguns *E. faecium* representativos dos isolados que não transferiram *pbp5*.

Foram efetuados PCRs com a finalidade de amplificar as regiões entre os genes *ftsW* e *pbp5*, *pbp5* e bomba de efluxo de iões (*EFLK*), bomba de efluxo de iões (*EFLK*) e a proteína hipotética pb264557 (Número de Acesso EEV52222.1) e *ftsW* e *N-acyl-glucosamine-6-phosphate-2-epimerase* (ver Figura 8). A síntese dos *primers* foi baseada no ambiente genético do gene *pbp5* descrito na sequência do genoma de *E. faecium* 1,231,410 supercont1.1 depositada no GenBank (NZ_GG692468.1).

Antes da amplificação, o DNA foi extraído pelo mesmo método usado no ponto 3.2.2. As sequências dos *primers* [P1 (*pbp5F*), P2 (*pbp5R*), P3 (*ftsWF*), P4 (*pbp5RInv*), P5 (*EFLKRInv*), P6 (*N-acylFInv*), P7 (*ftsWRInv*), P8 (*EFLKR*) e P9 (*HPIIEFLKF*)] e condições de amplificação estão descritas na Figura 8. Os produtos amplificados com um peso molecular inferior a 2500 pb foram submetidos a uma eletroforese como

descrito no ponto 3.2.2. Para os fragmentos de tamanho superior a 2500 pb, a eletroforese foi realizada num gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X, suplementado com 0,01% *Sybr Safe* (Invitrogen), tendo sido aplicada uma voltagem de 110V durante 110 minutos.

Para os produtos amplificados com um peso molecular igual ou diferente do esperado, usou-se o método RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), sendo os fragmentos digeridos com as enzimas de restrição *DdeI* (5 U/ μ l-New England BioLabs; 37°C/18h) ou *AluI* (5 U/ μ l-New England BioLabs; 37°C/18h). Estas enzimas foram selecionadas de acordo com a sequência nucleotídica do fragmento amplificado, previsto nas sequências disponíveis no GenBank (Número de Acesso AF117609.1). Relativamente ao perfil de restrição previsto para estas enzimas, usou-se o programa *NEB cutter V2.0-New England BioLabs* (NEBcutter V2.0 n.d.). Posteriormente os produtos digeridos foram transferidos para um gel de agarose a 2% em tampão TAE 1X, suplementado com 0,01% *Sybr Safe* (Bioline). Nesse gel aplicou-se uma voltagem de 40 volts durante 3 horas, sendo a visualização dos fragmentos efetuada como descrito no ponto 3.2.2. A cada perfil de RFLP foi atribuída uma letra. Um representante de cada perfil de RFLP foi sequenciado (Stabvida.com) por *primer walking*.

8. Estudos bioinformáticos

Com o objetivo de avaliar se as plataformas genéticas encontradas ou as alterações aminoacídicas de *pbp5* se encontravam em outros *E. faecium* com outras características epidemiológicas (nicho ecológico, diferentes anos de isolamento e regiões geográficas) efetuou-se uma comparação nucleotídica e aminoacídica com sequências publicadas na base de dados GenBank. Para isso utilizaram-se as ferramentas *nucleotide Blast* e *Blastx* (NCBI n.d.).

9. Outros estudos moleculares

9.1. Pesquisa de transposões conjugativos

O objetivo deste ensaio foi pesquisar a presença de transposões conjugativas (CTn) frequentes em bactérias de Gram positivo e que pudessem estar relacionados com eventos de transposição que incluíam o gene *pbp5*. Nesta pesquisa foram incluídos transposões que conferem resistência aos seguintes agentes antimicrobianos:

-Tetraciclina-Tn916/Tn1545, Tn5397 e Tn6000. Tn916 foi previamente associado à transferência horizontal do gene *pbp5* (Rice *et al.* 2007).

-Vancomicina-Tn5382, previamente associado à transferência horizontal do gene *pbp5* (Carias *et al.* 1998).

-Cloranfenicol-Tn4451/Tn4453 (Lyras *et al.* 1998).

-Lantibióticos-Tn5386, previamente associado à transferência horizontal de *pbp5* (Rice *et al.* 2005a).

Na análise destes elementos genéticos utilizaram-se bactérias dadoras e transconjugantes. Para a pesquisa dos CTn foram apenas incluídos marcadores genéticos específicos e não a totalidade do elemento genético. Assim, analisaram-se as integrases e excisases para os transposões Tn916, Tn5386, Tn6000, a integrase para Tn5397, a relaxase para o Tn4451/Tn4453, e a região esquerda (que não a integrase) de Tn5382 descrita em *E. faecium* C68 (AF117609).

A amplificação das sequências específicas dos diversos CTn foi realizada por PCR, usando-se o método de extração de DNA descrito no ponto 3.2.2. Os reagentes utilizados, a sua concentração e as condições de amplificação encontram-se descritas na Tabela 6. Todas as reações incluíram controlos positivos e negativos. Os produtos de amplificação foram submetidos a uma eletroforese horizontal tal como descrito no ponto 3.2.2.

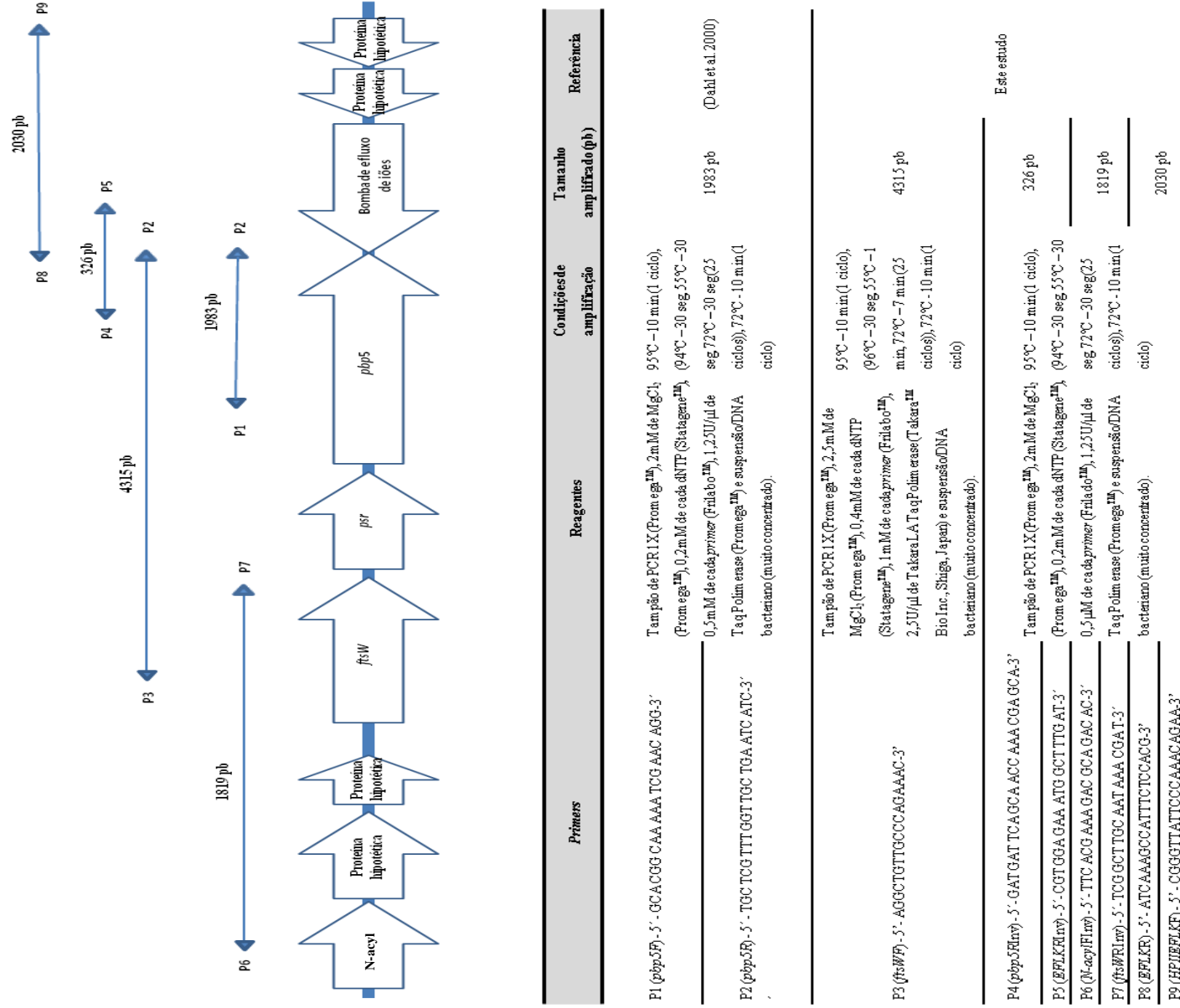


Figura 8. Descrição da sequência nucleotídica dos primers e das condições de amplificação usadas nas reações de PCR no estudo da variabilidade do ambiente genético da região de inserção de *pfp5*. Na parte superior da imagem aparece uma representação esquemática do posicionamento dos primers usados para a caracterização do ambiente genético de *pfp5*, assim como o tamanho dos fragmentos amplificados.

Tabela 6. Descrição da sequência nucleotídica dos *primers* e das condições de amplificação usadas nas reações de PCR para o método MLST e na pesquisa de transposões conjugativos.

Objetivo	Primers	Reagentes	Condições de amplificação	Tamanho amplificado (pb)	Referência
MLST- amplificação de genes conservados	<i>purKF</i> -5'-GCA GAT TGG CAC ATT GAA AGT-3'	Tampão de PCR 1X (Promega™), 2mM de MgCl ₂ (Promega™), 0,2mM de cada dNTP (Statagene™), 0,5mM de cada <i>primer</i> (Firilabo™), 1,25U/μl de Taq Polimerase (Promega™) e suspensão/DNA bacteriano (muito concentrado).	95°C – 10 min (1 ciclo), (94°C – 30 seg, 55°C – 30 seg, 72°C – 30 seg (25 ciclos)), 72°C - 10 min (1 ciclo)	492 pb	(Homan <i>et al.</i> 2002)
	<i>purKR</i> -5'-TAC ATA AAT CCC CCT GTT TY-3'			530 pb	
	<i>gdhF</i> -5'-GGC GCA CTA AAA GAT ATG GT-3'			556 pb	
	<i>gdhR</i> -5'-CCA AGA TTG GGC AAC TTC GTC CCA-3'			395 pb	
	<i>atpAF</i> -5'-CGG TTC ATA CGG AAT GGC ACA-3'			465 pb	
	<i>atpAR</i> -5'-AAG TTC ACG ATA AGC CAC GG-3'			437 pb	
	<i>gydF</i> -5'-CAA ACT GCT TAG CTC CAA GG C-3'			583 pb	
	<i>gydR</i> -5'-CAT TTC GTT GTC ATA CCA AGC-3'				
	<i>ddlF</i> -5'-GAG ACA TTG AAT ATG CCT TAT G-3'				
	<i>ddlR</i> -5'-AAA AAG AAA TCG CAC CG-3'				
Pesquisa de integrase e excisasse de Tn916	<i>adkF</i> -5'-TAT GAA CCT CAT TTT AAT GGG-3'			1096 pb	(Doherty <i>et al.</i> 2000)
	<i>adkR</i> -5'-GTT GAC TGC CAA ACG ATT TT-3'			194 pb	
	<i>pstSF</i> -5'-TTG AGC CAA GTC GAA GCT GGA G-3'				
	<i>pstSR</i> -5'-CGT GAT CAC GTT CTA CTT CC-3'				
	<i>IntF</i> -5'-GCG TGA TTG TAT CTC ACT-3'				
	<i>IntR</i> -5'-GAG GCT CCT GTT GCT TCT-3'				
	<i>XisF</i> -5'-AAG CAG ACT GAC ATT CCT A-3'				
	<i>XisR</i> -5'-GCG TCC AAT GTA TCT ATA A-3'				

Tabela 6. (Continuação).

Objetivo	Primers	Reagentes	Condições de amplificação	Tamanho amplificado (pb)	Referência
Pesquisa de transposasse e excisase de	<i>4451/4453.1</i> -5'-GGA TAT GAG TTG TGC AAG GG-3'			261 pb	(Novais <i>et al.</i> 2009)
	<i>4451/4453.2</i> -5'-GTT CAC ATC AAT CAC AAT CTC-3'				
Tn4451/Tn4453 e Tn5397	<i>indXF</i> -5'-ATG ATG GGT TGG ACA AAG A-3' <i>indXR</i> -5'-CTT TGC TCGATA GGC TCT A-3'	Tampão de PCR 1X (Promega™), 2mM de MgCl ₂ (Promega™),	95°C – 10 min (1 ciclo), (94°C – 30 seg, 55°C – 30 seg, 72°C – 30 seg (25 ciclos)), 72°C - 10 min (1 ciclo)	609 pb	(Agero, Pedersen & Aarestrup 2006)
		0,2mM de cada dNTP (Statagene™), 0,5mM de cada primer (Firilabo™), 1,25U/μl de Taq Polimerase (Promega™) e suspensão/DNA bacteriano (muito concentrado).			
Pesquisa de integrase e excisase de	<i>Int</i> _{Tn6000} F-5'-CAT CGA GTC TAA CCG ATT GT-3'	0,2mM de cada dNTP (Statagene™), 0,5mM de cada primer (Firilabo™), 1,25U/μl de Taq Polimerase (Promega™) e suspensão/DNA bacteriano (muito concentrado).	95°C – 10 min (1 ciclo), (94°C – 30 seg, 55°C – 30 seg, 72°C – 30 seg (25 ciclos)), 72°C - 10 min (1 ciclo)	869 pb	(Novais <i>et al.</i> 2009)
	<i>Int</i> _{Tn6000} R-5'-GAC CCA AAC GAA CTT GTA CT-3'				
	<i>Xis</i> _{Tn6000} F-5'-CGA AGT ATT AAC CGA ACA GA-3'				
	<i>Xis</i> _{Tn6000} R-5'-TAT CAT CGC GAT CAA AAC GA-3'				
Tn6000 e Tn5386	<i>Int</i> _{Tn5386} F-5'-CTT GTT CCT ACG GAC AGA GT-3' <i>Int</i> _{Tn5386} R-5'-AG CCG TGA GCG TAA TAA TTC-3' <i>Xis</i> _{Tn5386} F-5'-ATA CTG ATG TGC CTG TAT GG-3' <i>Xis</i> _{Tn5386} R-5'-TCG CTT TAT CTG AAT ACG G-3'			1025 pb	
Pesquisa da região esquerda (não integrase) de Tn5382	<i>Tn5382 like</i> F-5'-GTT CTT ATT CCG CAG GTG GTG ATT-3' <i>Tn5382 like</i> R-5'-ACG CCA TGC TAT TTA CTT CCG GC-3'			311 pb	(Carias <i>et al.</i> 1998)

IV. RESULTADOS

1. Transferência horizontal do gene *pbp5* para a bactéria recetora *E. faecium* GE1 (*pbp5*⁻)

A transferência horizontal da resistência à ampicilina para a bactéria recetora *E. faecium* GE1 ocorreu em 15% (n=12/78) dos *E. faecium* testados. Estes isolados foram obtidos de diferentes nichos ecológicos, incluindo de amostras clínicas, de águas residuais hospitalares, de humanos saudáveis e de suiniculturas (Tabela 7). Todos os transconjugantes apresentaram resistência à ampicilina (CMI=16 a 128 mg/L) e resistência à rifampicina, ácido fusídico e tetraciclina (três antibióticos marcadores de *E. faecium* GE1). Nenhum dos isolados selvagens capaz de transferir a resistência à ampicilina era produtor de β -lactamases.

Tabela 7. Características epidemiológicas das bactérias selvagens que transferiram a resistência à ampicilina para *E. faecium* GE1 e CMI para a ampicilina das estirpes selvagens e respetivos transconjugantes.

Isolado	Nicho ecológico	Amostra	Ano	CMI Ampicilina do isolado selvagem (mg/L)	CMI Ampicilina do transconjugante (mg/L)
70411	Hospital B	Urina	1997	32	32
28798	Hospital B	Sangue	1999	64	32
H323	Hospital C	Urina	2002	128	32
H207	Hospital C	Exsudado	2002	32	32
HPH2	Hospital A	Urina	2007	128	64
E169	Esgoto do hospital C	Águas residuais	2001	64	32
E49	Esgoto do hospital E	Águas residuais	2001	128	32
E4	Esgoto do hospital E	Águas residuais	2001	128	16
E233	Esgoto do hospital E	Águas residuais	2002	64	32
VD79C1	Humano saudável	Fezes	2001	128	128
SN71	Suinicultura IV	Água de lagonagem	2006	64	64
SN133	Suinicultura IV	Fezes de animais	2006	64	64

A transferência do gene *pbp5* para as bactérias transconjugantes de *E. faecium* GE1 foi confirmada através da sua amplificação por PCR (Figura 9).

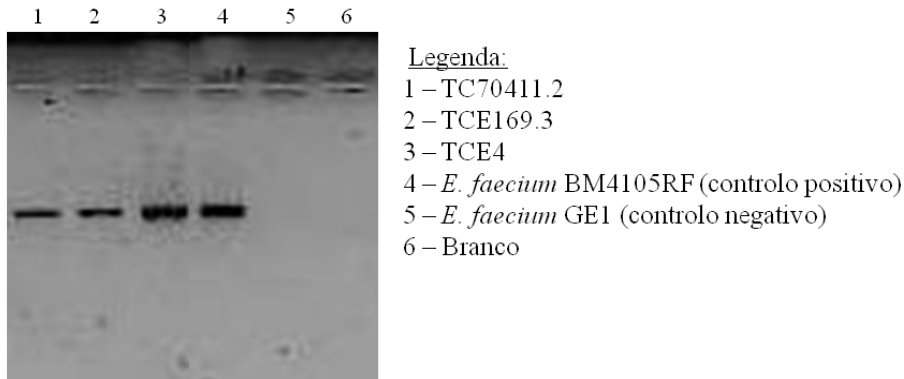


Figura 9. Imagem representativa da amplificação do gene *pbp5* por PCR em alguns dos transconjugantes de *E. faecium* GE1 obtidos. A banda amplificada corresponde a um fragmento de 1983 pb.

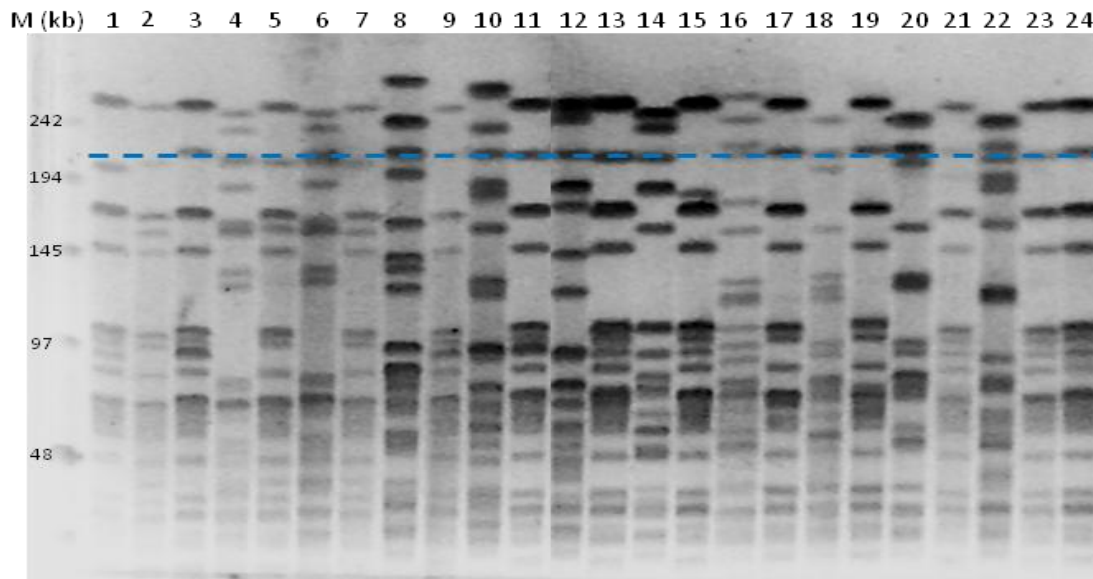


Figura 10. Comparação dos perfis de restrição de bactérias selvagens, transconjugantes e recetora *E. faecium* GE1 por PFGE. M - Marcador (*Low Range PFG Marker*); *E. faecium* GE1 (perfil 1), transconjugantes de *E. faecium* GE1 (perfis 3-TCVD79C1.5 GE1; 5-TCSN71.1GE1; 7-TCSN133.3 GE1; 9-TCHPH2.1 GE1; 11-TCH323.3 GE1; 13-TC70411.2 GE1; 15-TCH207.1 GE1; 17-TCE49.1 GE1; 19-TCE233.1 GE1; 21-TCE169.3 GE1; 23-TCE4.1 GE1; 24-TC28798.1 GE1) e selvagens (perfis 2-VD79C1; 4-SN71; 6-SN133; 8-HPH2; 10-H323; 12-70411; 14-H207; 16-E49; 18-E233; 20-E169; 22-E4). A linha azul assinala a banda adquirida pela maioria dos transconjugantes e ausente em *E. faecium* GE1.

A presença de transconjugantes foi também confirmada pela comparação do seu DNA genómico sujeito a restrição com *Sma*I e separado por PFGE com o da recetora *E. faecium* GE1, tendo-se observado um perfil muito semelhante entre recetora e transconjugantes (diferem em menos de 7 bandas; isolados 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 24 da Figura 10). De uma forma global conseguiu detetar-se a presença de um fragmento de aproximadamente de 200-210 kb (representado por um tracejado a azul na Figura 10) que não se encontra na recetora *E. faecium* GE1.

A relação clonal dos isolados selvagens será abordada no subcapítulo 5.

2. Transferência horizontal do gene *pbp5* para as recetoras de *E. faecium* BM4105RF e 64/3 (*pbp5*⁺)

A transferência horizontal da resistência à ampicilina para a bactéria recetora *E. faecium* BM4105RF ocorreu em 36% (n=5/14) das estirpes selvagens que previamente tinham transferido *pbp5* para *E. faecium* GE1. Neste grupo estavam incluídos dois isolados clínicos, um isolado de águas residuais hospitalares, um isolado de um humano saudável e um isolado de uma suinicultura. Os transconjugantes obtidos apresentaram uma CMI que variou entre 8 e 128 mg/L (Tabela 8). A transferência de *pbp5* para *E. faecium* 64/3 ocorreu em 14% (n=2/14) dos casos e foi detetada a partir de um isolado clínico e um isolado do ambiente de uma suinicultura. Os dois transconjugantes obtidos apresentaram uma CMI que variou entre 8 e 64 mg/L (Tabela 8).

Os transconjugantes obtidos de *E. faecium* BM4105RF e *E. faecium* 64/3 também foram confirmados por PFGE pela comparação do seu perfil de restrição com aquele obtido para as respetivas recetoras (Figura 11). Os transconjugantes obtidos de *E. faecium* BM4105RF diferenciaram da recetora entre 2-3 bandas e os transconjugantes obtidos de *E. faecium* 64/3 em 1-2 bandas. O único caso em que claramente se consegue detetar o mesmo perfil de restrição da bactéria recetora com a aquisição de um fragmento adicional é no transconjugante TCHPH2.4 64/3 (banda adicional de cerca de 170 kb). Em todos os outros transconjugantes consegue observar-se o desaparecimento de

bandas que aparecem no perfil original da recetora a acompanhar o aparecimento de bandas em novas posições nos transconjugantes (Figura 11).

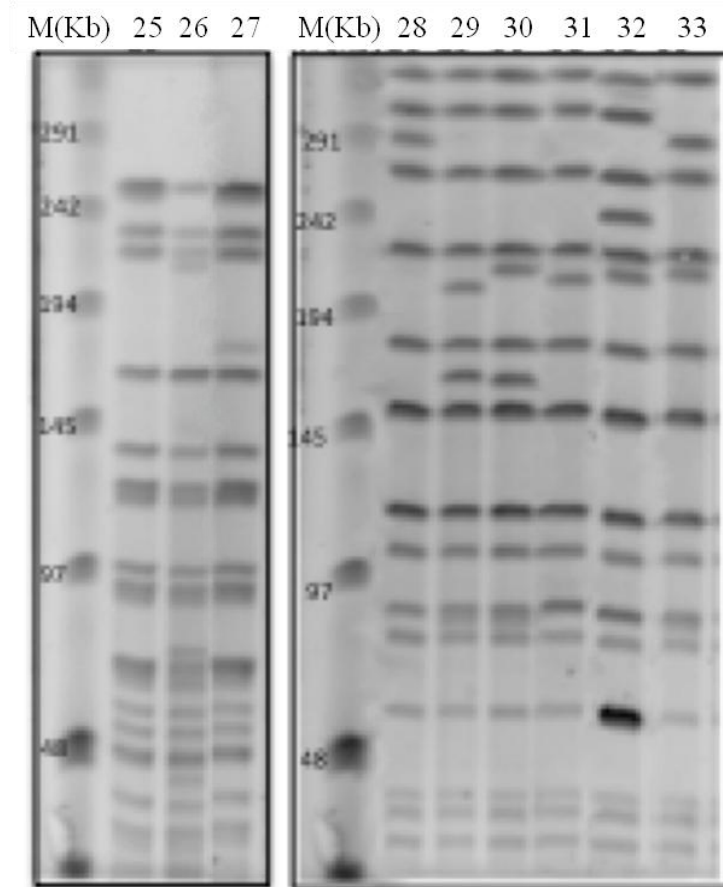


Figura 11. PFGE em que foi usada a enzima de restrição *Sma*I para bactérias transconjugantes de *E. faecium* BM4105RF e de *E. faecium* 64/3 e bactérias recetoras. M-Marcador (*Low Range PFG Marker*); *E. faecium* 64/3 (perfil 25), transconjugantes de *E. faecium* 64/3 (perfis 26-TCSN71.1 64/3; 27-TCHPH2.4 64/3). *E. faecium* BM4105RF (perfil 28), transconjugantes de *E. faecium* BM4105RF (perfis 29-TCSN71.1 BM; 30-TCH207.3 BM; 31-TC70411.5 BM; 32-TCE169.3 BM; 33-TCVD79C1.6 BM).

3. Análise da estabilidade da resistência à ampicilina

A avaliação da estabilidade da resistência à ampicilina foi realizada nos isolados selvagens e respetivos transconjugantes obtidos de *E. faecium* GE1. A resistência à ampicilina manteve-se nos dois grupos de isolados após 30 inoculações quer na presença quer na ausência de pressão seletiva (BHI sem ampicilina).

Tabela 8. Características epidemiológicas das bactérias selvagens que transferiram a resistência à ampicilina para *E. faecium* BM4105RF e *E. faecium* 64/3 e CMI para a ampicilina das estirpes selvagens e respectivos transconjugantes.

Isolado	Nicho ecológico	Amostra	Ano	CMI Ampicilina isolado selvagem (mg/L)	CMI Ampicilina (mg/L)	
					Transconjugante de <i>E. faecium</i> BM4105RF	Transconjugante de <i>E. faecium</i> 64/3
70411	Hospital B	Urina	1997	32	8	
H207	Hospital C	Exsudado	2002	32	8	
HPH2	Hospital A	Urina	2007	128		8
E169	Esgoto do hospital C	Águas residuais	2001	64	8	
VD79C1	Humano saudável	Fezes	2001	128	128	
SN71	Suicultura IV	Água de lagonagem	2006	64	8	64

4. Avaliação da cotransferência da resistência a diferentes classes de antibióticos

A cotransferência da resistência a outros antibióticos para além da ampicilina detetou-se em diferentes transconjugantes (Tabela 9). Nos transconjugantes oriundos de *E. faecium* GE1 observou-se resistência aos glicopéptidos (n=6), eritromicina (n=5), estreptomina (n=1) e/ou gentamicina (n=1). As resistências à tetraciclina, ácido fusídico e rifampicina não foram valorizadas dado que são características da recetora *E. faecium* GE1.

Nos transconjugantes de *E. faecium* BM4105RF identificou-se a resistência aos glicopéptidos (n=2), eritromicina (n=1) e tetraciclina (n=1), enquanto nos transconjugantes de *E. faecium* 64/3 não se visualizou a transferência da resistência a outros antibióticos para além da ampicilina. Como referido acima, a resistência à rifampicina e ao ácido fusídico não é relevante, uma vez que a resistência a esses antibióticos faz parte do perfil fenotípico das bactérias recetoras *E. faecium* BM4105RF e *E. faecium* 64/3.

5. Análise da estrutura populacional de *E. faecium* que transferem e não transferem o gene *pbp5*

A análise da relação clonal por PFGE e MLST está representada na Tabela 10 e na Figura 10 (Ver capítulo III, secção 4.). Entre as bactérias selvagens que conseguiram transferir *pbp5* observam-se 9 clones distintos através da técnica PFGE. Dos 12 isolados estudados, o mesmo clone SN208 foi detetado em amostras diferentes da mesma suinicultura (fezes e ambiente) e o clone 88 em isolados clínicos e de águas residuais hospitalares de três hospitais distintos.

Tabela 9. Resistências a diferentes famílias de antibióticos cotransferidas com a resistência à ampicilina para os transconjugantes obtidos.

Isolado	Nicho ecológico	Amostra	Ano	Perfil de resistência aos antibióticos			
				Bactérias selvagens	Bactérias transconjugantes		
					<i>E. faecium</i> GE1	<i>E. faecium</i> BM4105RF	<i>E. faecium</i> 64/3
70411	Hospital B	Urina	1997	AMP, VAN, TEC, TET, ERI, Q/D, ESTR	AMP, VAN, TEC, TET, ERI, RIF, AF	AMP, VAN, TEC, TET, ERI, RIF, FA	
28798	Hospital B	Sangue	1999	AMP, VAN, TEC, TET, ERI, Q/D, CIP, GEN, ESTR	AMP, VAN, TEC, TET, ERI, ESTR, RIF, AF		
H323	Hospital C	Urina	2002	AMP, VAN, TEC, ERI, CIP, GEN, ESTR	AMP, VAN, TEC, TET, ERI, RIF, AF		
H207	Hospital C	Exsudado	2002	AMP, TET, ERI, CIP, GEN, ESTR	AMP, TET, RIF, AF	AMP, RIF, FA	
HPH2	Hospital A	Urina	2007	AMP, VAN, TEC, ERI, CIP, NIT	AMP, VAN, TEC, TET, ERI, RIF, AF	AMP, RIF, FA	
E169	Esgoto do hospital C	Águas residuais	2001	AMP, ERI, CIP, GEN, ESTR	AMP, TET, RIF, AF	AMP, RIF, FA	
E49	Esgoto do hospital E	Águas residuais	2001	AMP, VAN, TEC, ERI, CIP, ESTR	AMP, VAN, TEC, TET, RIF, AF		

Tabela 9. (Continuação).

Isolado	Nicho ecológico	Amostra	Ano	Perfil de resistência aos antibióticos			
				Bactérias selvagens	Bactérias transconjugantes		
					<i>E. faecium</i> GE1	<i>E. faecium</i> BM4105RF	<i>E. faecium</i> 64/3
E4	Esgoto do hospital E	Águas residuais	2001	AMP, TET, ERI, CIP, GEN, ESTR	AMP, TET, RIF, AF		
E233	Esgoto do hospital E	Águas residuais	2002	AMP, ERI, CIP, GEN, ESTR	AMP, TET, RIF, AF		
VD79C1	Humano saudável	Fezes	2001	AMP, VAN, TEC, TET, ERI, CIP, GEN	AMP, VAN, TEC, TET, ERI, GEN, RIF, AF	AMP, VAN, TEC, RIF, FA	
SN71	Suicultura IV	Água de lagonagem	2006	AMP, TET, ERI, ESTR, NIT	AMP, TET, RIF, AF	AMP, RIF, FA	AMP, RIF, FA
SN133	Suicultura IV	Fezes de animais	2006	AMP, TET, ERI, ESTR, NIT	AMP, TET, RIF, AF		

Legenda: AMP-Ampicilina, VAN-Vancomicina, TEC-Teicoplanina, TET-Tetraciclina, ERI-Eritromicina, CIP-Ciprofloxacina, GEN-Gentamicina, NIT-Nitrofurantóina, ESTR-Estreptomicina, RIF-Rifampicina, AF-Ácido fusídico.

Pelo método de MLST verificou-se que todas as bactérias selvagens que transferiram o gene *pbp5*, pertenciam a seis ST incluídos no CC17. O ST132 foi observado em isolados de águas residuais de dois hospitais (isolados E169, E233, E49 e E4), e o ST280 em dois isolados clínicos (H323 e H207) do mesmo hospital com distintos tipos de PFGE. O ST670 (isolado 70411) foi detetado pela primeira vez neste estudo num isolado clínico. Este ST difere apenas no alelo *gyd* de ST17. Os outros ST encontrados foram ST18, ST125 e ST393.

Na análise de MLST também se incluíram isolados representativos de *E. faecium* resistentes à ampicilina que não transferiram o gene *pbp5* nos ensaios realizados. Nesse grupo foram identificados STs (ST16, ST18, ST80, ST132, ST280, ST368 e ST390) pertencentes ao CC17 correspondentes a isolados pertencentes a diferentes nichos (três clínicos, um de suinicultura e outro de águas residuais de um hospital). Adicionalmente, foram identificados mais 11 isolados (clínicos, de origem animal e ambiental) que pertenciam a outras linhagens não incluídas em CC17 (ST150, ST190, ST366, ST367, ST148/CC9, 4 isolados com *purK6*, 2 com *purK3* e um com *purK14*).

Tabela 10. Estrutura populacional de *E. faecium* que transferem o gene *pbp5* para as bactérias recetoras.

MLST	PFGE	Data	Nicho ecológico	Bactérias selvagens
ST125	126	2007	Hospital A	HPH2
ST280	100	2002	Hospital C	H323
	150	2002		H207
ST670	90	1997	Hospital B	70411
	88	1999		28798
ST132	88.2	2001	Água residual de hospital C	E169
	88.1	2002		E233
	C3	2001	Água residual de hospital E	E49
	Z	2001		E4
ST18	59	2001	Fezes de humano saudável	VD79C1
ST393	SN208	2006	Suinicultura IV	SN71
				SN133

6. Avaliação da localização genômica do gene *pbp5*

Todos os isolados selvagens e transconjugantes de *E. faecium* GE1 revelaram a presença do gene *pbp5* no cromossoma bacteriano, após hibridação de uma sonda específica deste gene com o DNA genômico das amostras sujeitas a restrição com a enzima *I-CeuI*, e posterior separação por PFGE (Figura 12). Dado que a hibridação da sonda do gene *pbp5* ocorreu na banda do gel de maior tamanho, considerou-se não ser necessária a hibridação com a sonda do gene 23SrDNA para se classificarem as bandas hibridadas como cromossomais.

A identificação da localização do gene *pbp5* numa banda de elevado peso molecular não permitiu avaliar a presença de uma possível heterogeneidade na região de inserção do elemento que transporta este gene nos diversos isolados estudados. Desta forma procedeu-se à hibridação de géis de PFGE cujo DNA foi sujeito à restrição com a enzima *SmaI* (enzima com elevada capacidade de corte). Para este ensaio foram incluídos *E. faecium* selvagens e transconjugantes obtidos de todas as recetoras utilizadas neste estudo (Figura 13).

Neste ensaio de hibridação observou-se alguma heterogeneidade (fragmentos entre 170-250 kb) no tamanho das bandas que contêm o gene *pbp5*, em particular nas bactérias transconjugantes provenientes das bactérias recetoras que já possuíam esse gene (*E. faecium* BM4105RF e *E. faecium* 64/3). Na maioria dos isolados selvagens, o gene *pbp5* estava localizado numa banda com tamanho aproximado de 210 kb. A exceção aconteceu nos isolados VD79C1, SN71 e SN133 (estas duas últimas do mesmo clone) com uma banda mais baixa de aproximadamente 200 kb (Tabela 11).

Na maioria dos transconjugantes obtidos de *E. faecium* GE1, a sonda de *pbp5* hibridou com uma banda de tamanho aproximado de 210 kb. No caso dos isolados TCH207.1 GE1 e TSN71.1 GE1/TSN133.1 GE1 observaram-se bandas de tamanho mais reduzido, 180 kb e 200 kb, respetivamente. Na recetora *E. faecium* GE1 não se observou qualquer hibridação do gene.

Nos transconjugantes obtidos de *E. faecium* 64/3 *pbp5* hibridou com uma banda de 210 kb (isolado TCSN71.1 64/3) e com bandas de 170 e 250 kb (isolado TCHPH2.4 64/3). A banda de 250 kb tem o mesmo tamanho daquela encontrada na recetora *E. faecium* 64/3 que hibrida com o gene *pbp5* originalmente presente nesta estirpe (Figura 13).

Na recetora *E. faecium* BM4105RF *pbp5* hibridou com uma banda de aproximadamente 290 kb. Esta banda não foi detetada em nenhum dos transconjugantes. Nestes, *pbp5* hibridou em alguns casos com um fragmento de menor tamanho (entre 200 e 210 kb), enquanto noutros isolados hibridou com dois fragmentos (170+200 kb no isolado TC70411.5 BM e 200+240 kb no isolado TCVD79C1.6 BM).

7. Pesquisa de transposões conjugativos

A presença de integrases, excisases e outros fragmentos específicos dos transposões conjugativos Tn916/Tn1545, Tn5397, Tn6000, Tn5382, Tn4451/Tn4453 ou Tn5386 não foi detetada em nenhum dos isolados selvagens que transferiram o gene *pbp5* após o processo de amplificação por PCR.

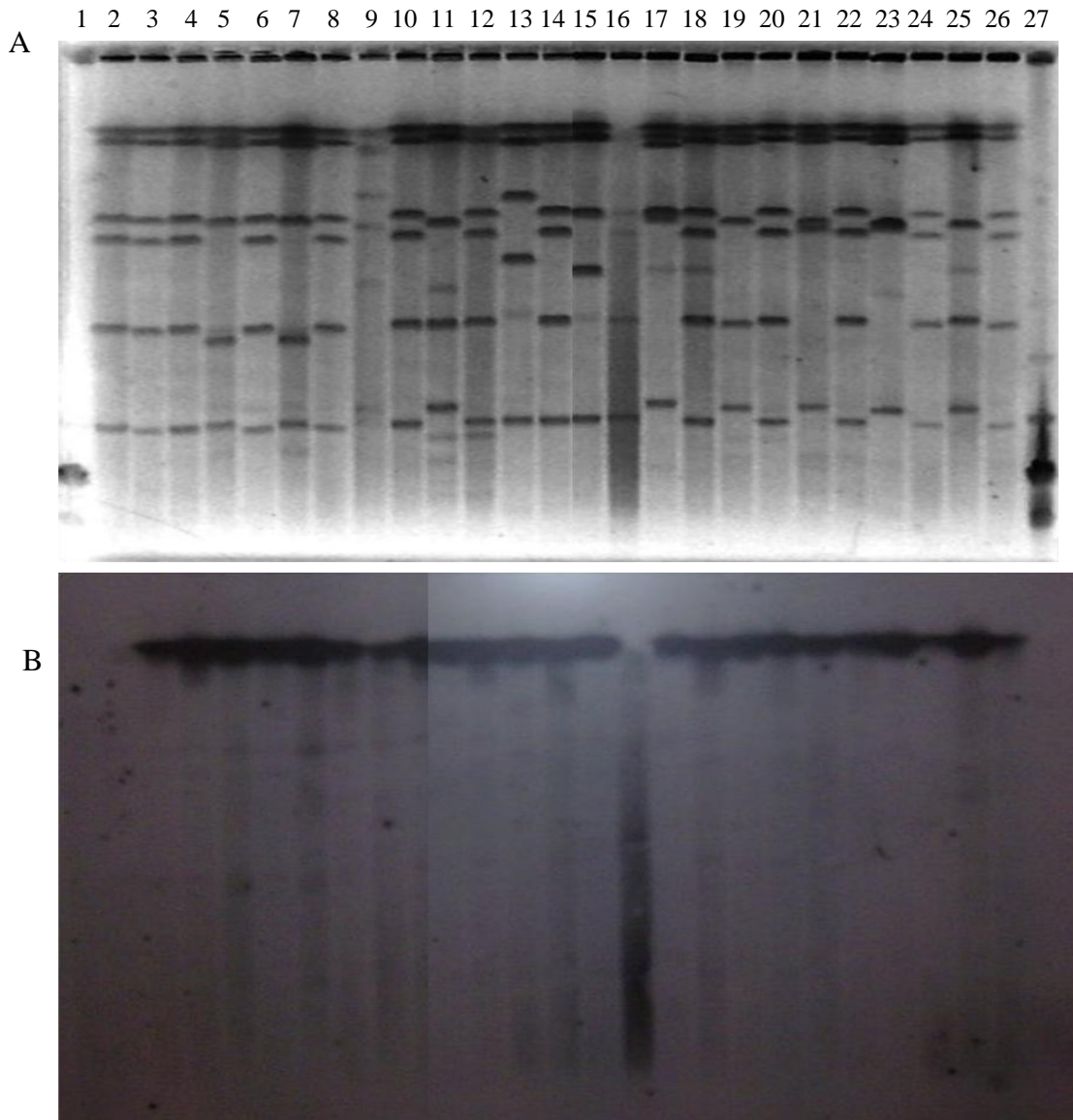


Figura 12. A-PFGE do DNA genómico sujeito a restrição com *I-CeuI* de isolados selvagens, recetora *E. faecium* GE1 e respetivos transconjugantes. B- Ensaio de hibridação sobre uma membrana obtida a partir do gel da figura A em que foi usada uma sonda para o gene *pbp5* (primers P1 e P2 da Figura 8 da secção 9.1 do capítulo III). 1,27-Marcador (*Low Range PFG Marker*); *E. faecium* GE1 (perfil 2), transconjugantes (perfis 4-TCVD79C1.5 GE1; 6-TCSN71.1 GE1; 8-TCSN133.3 GE1; 10-TCHPH2.1 GE1; 12-TC28798.1 GE1; 14-TCH323.3 GE1; 16-TC70411.2 GE1; 18-TCH207.1 GE1; 20-TCE49.1 GE1; 22- TCE233.1 GE1; 24- TCE169.3 GE1; 26- TCE4.1 GE1) e selvagens (perfis 3-VD79C1; 5-SN71; 7-SN133; 9-HPH2; 11-28798; 13- H323; 15-70411; 17-H207; 19-E49; 21-E233; 23-E169; 25-E4).

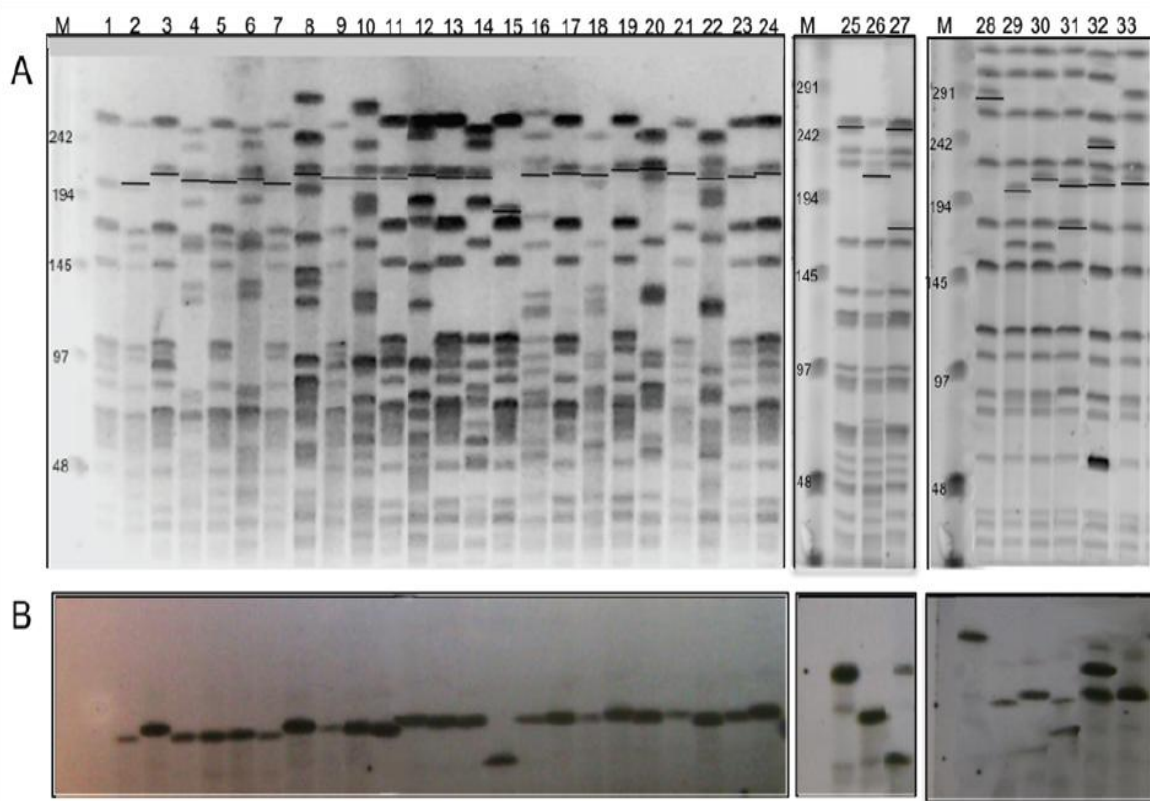


Figura 13. A-PFGE do DNA genômico sujeito a restrição com *Sma*I de isolados selvagens, receptoras *E. faecium* GE1, *E. faecium* BM4105RF e *E. faecium* 64/3 e respectivos transconjugantes. As linhas por baixo das bandas correspondem aos locais em que ocorreu hibridação com a sonda do gene *pbp5*. B-Ensaio de hibridação sobre uma membrana obtida a partir do gel da figura A, em que foi usada uma sonda para o gene *pbp5* (primers P1 e P2 Figura 8 da secção 9.1 do capítulo III). M-Marcador (*Low Range PFG Marker*); *E. faecium* GE1 (perfil 1), *E. faecium* 64/3 (perfil 25), *E. faecium* BM4105RF (perfil 28), transconjugantes de *E. faecium* GE1 (perfis 3-TCVD79C1.5 GE1; 5-TCSN71.1GE1; 7-TCSN133.3 GE1; 9-TCHPH2.1 GE1; 11-TCH323.3 GE1; 13-TC70411.2 GE1; 15-TCH207.1 GE1; 17-TCE49.1 GE1; 19-TCE233.1 GE1; 21-TCE169.3 GE1; 23-TCE4.1 GE1; 24-TC28798.1 GE1), transconjugantes de *E. faecium* 64/3 (perfis 26-TCSN71.1 64/3; 27-TCHPH2.4 64/3), transconjugantes de *E. faecium* BM4105RF (perfis 29-TCSN71.1 BM; 30-TCH207.3 BM; 31-TC70411.5 BM; 32-TCE169.3 BM; 33-TCVD79C1.6 BM) e selvagens (perfis 2-VD79C1; 4-SN71; 6-SN133; 8-HPH2; 10-H323; 12-70411; 14-H207; 16-E49; 18-E233; 20-E169; 22-E4).

Tabela 11. Avaliação do tamanho dos fragmentos que hibridaram com *pbp5* em *E. faecium* selvagens de vários nichos ecológicos e STs (CC17), e respectivos transconjugantes.

MLST	PFGE	Data	Nicho ecológico	Bactérias (selvagens/transconjugantes)	Tamanho dos fragmentos (hibridação do gene <i>pbp5</i>) (kb)	
				HPH2	210	
ST125	126	2007	Hospital A	TCHPH2.1 GE1	210	
				TCHPH2.4 64/3	170 + 250	
ST280	100	2002	Hospital C	H323	210	
				TCH323.3 GE1	210	
	150	2002		H207	210	
				TCH207.1 GE1	180	
				TCH207.3 BM	210	
ST670	90	1997	Hospital B	70411	210	
				TC70411.2 GE1	210	
				TC70411.5 BM	170 + 200	
	88	1999		28798	210	
				TC28798.1 GE1	210	
ST132	88.2	2001	Água residual de hospital C	E169	210	
				TCE169.3 GE1	210	
				TCE169.3 BM	200 + 240	
	88.1	2002	Água residual de hospital E	E233	210	
				TCE233.1 GE1	210	
	C3	2001		E49	210	
				TCE49.1 GE1	210	
	Z	2001		E4	210	
				TCE4.1 GE1	210	
ST18	59	2001		Fezes de humano saudável	VD79C1	200
					TCVD79C1.5 GE1	210
					TCVD79C1.6 BM	200
ST393	SN208	2006	Suinicultura IV	SN71	200	
				TCSN71.1 GE1	200	
				TCSN71.1 64/3	210	
				TCSN71.1 BM	200	
				SN133	200	
				TCSN133.3 GE1	200	

8. Avaliação da variabilidade alélica do gene *pbp5*

Várias mutações foram encontradas nos diferentes genes de *pbp5* sequenciados, tendo sido traduzidas nas alterações aminoacídicas descritas na Tabela 15. As sequências aminoacídicas foram comparadas com aquelas de *E. faecium* BM4107 (AF364092.1), um isolado suscetível à ampicilina. Foram detetados 12 conjuntos de alterações aminoacídicas (denominados de C1 a C12) nos *E. faecium* incluídos neste estudo (Tabelas 12 e 15). Nestas combinações, as alterações aminoacídicas nas posições 24, 25, 27, 34, 39, 66, 85, 100, 144, 172, 177, 204, 216, 324, 496, 499, 525 e 644 foram encontradas em todos os isolados resistentes à ampicilina.

No grupo dos isolados de *E. faecium* que transferiram o gene *pbp5* para as respectivas recetoras, verificou-se que apresentavam as combinações de mutações C4, C7, C8, C9 e C12. No caso de isolados representativos que não disseminaram esse gene de resistência aos β -lactâmicos observaram-se as combinações C1, C2, C3, C4, C5, C6, C8, C10 e C11 (Tabela 12). Comparando esses dois grupos verifica-se ainda que ocorre a partilha das combinações C4 e C8.

Quando se efetuou a análise das sequências aminoacídicas de cada combinação específica e se estabeleceu uma comparação entre os dois grupos de isolados que transferiram e não transferiram o gene *pbp5*, verificou-se que nas combinações C1 e C2 (presentes nos isolados que não transferiram a resistência à ampicilina) a ausência das alterações aminoacídicas nas posições 485, 497, 629 e 667. Na combinação C3 não foi detetada alteração na posição 485. As alterações nas posições 401 (C1 e C2) e 642 (C2) foram apenas observadas no grupo de bactérias que não transferiu a resistência à ampicilina

Quando se procedeu à análise da distribuição das diferentes combinações de alterações aminoacídicas pelos nichos ecológicos observou-se que as combinações C4 e C12 apenas apareciam em isolados clínicos (2 hospitais), o mesmo acontecendo com a combinação C9 que estava presente apenas em isolados da suinicultura IV. Por outro lado, as combinações C7 e C8 encontram-se partilhadas entre diferentes nichos

ecológicos, estando o C7 presente em isolados de águas residuais de hospitais e fezes de humanos saudáveis, enquanto o C8 está associado a isolados de hospitais e águas residuais de hospitais.

Relativamente à análise da distribuição das combinações de alterações aminoacídicas pelos diversos STs incluídos em CC17 de isolados que transferiram e não transferiram o gene *pbp5*, verificou-se a presença de mais do que uma combinação de alterações aminoacídicas por ST. O ST132 inclui isolados com as combinações C7 e C8, o ST18 isolados com as combinações C5 e C7 e o ST280 isolados com as combinações C4 e C12. Verificou-se ainda que o ST132 partilha com o ST18 e o ST368 as combinações C7 e C8. Os ST670 e ST280 possuem em comum a combinação C4 e o ST280 e ST125 contêm ambos a combinação C12.

9. Caracterização do ambiente genético do gene *pbp5*

9.1. Amplificação de fragmentos de DNA das regiões que flanqueiam o gene *pbp5* por PCR

A amplificação das regiões que flanqueiam o gene *pbp5* foi realizada através das reações de PCR representadas na Figura 15 (*primers* P1 a P9). Todas as combinações de *primers* foram utilizadas para as bactérias recetoras, selvagens que transferiram *pbp5* e respetivos transconjugantes. Para representantes das bactérias que não transferiram *pbp5* apenas se realizaram os PCRs com os pares de *primers* P2-P3 e P4-P5 para a identificação do tipo de plataforma presente.

Tabela 12. Distribuição das diferentes combinações de alterações aminoacídicas em PBP5 e tipo de ambiente genético observados em *E. faecium* que transferem e não transferem *pbp5* pertencentes a diferentes nichos ecológicos e STs.

MLST	PFGE	Data	Nicho ecológico	Bactérias (selvagens/ transconjugantes)	CMI _{Amp} (mg/L)	Tipo de ambiente genético (<i>pbp5</i>)	Combinação de alterações aminoacídicas	
Transferiram o gene <i>pbp5</i> CCI7	ST670	90	1997	Hospital B	70411	32	ND	
					TC70411.2 GE1	32	II	C4
					TC70411.5 BM	8	II	C4
	ST132	88	1999	Hospital B	28798	64	ND	
					TC28798.1 GE1	32	III	C8
		88.1	2002	Água residual de hospital E	E233	64	ND	
					TCE233.1 GE1	32	III	
		88.2	2001	Água residual de hospital C	E169	64	ND	
					TCE169.3 GE1	32	ND	
	C3	2001	Água residual de hospital E	TCE169.3 BM	8	ND		
				E49	128	ND		
				TCE49.1 GE1	32	III	C8	
Z	2001	Água residual de hospital E	E4	128	ND			
			TCE4.1 GE1	16	II	C7		
ST18	59	2001	Fezes de humano saudável	VD79C1	128	ND		
				TCVD79C1.5 GE1	128	II	C7	
				TCVD79C1.6 BM	128	II	C7	
ST280	100	2002	Hospital C	H323	128	ND		
				TCH323. 3GE1	32	I	C12	

Tabela 12. (Continuação).

		MLST	PFGE	Data	Nicho ecológico	Bactérias (selvagens/transconjugantes)	CMI _{Amp} (mg/L)	Tipo de ambiente genético (<i>pbp5</i>)	Combinação de alterações aminoacídicas
Transferiram o gene <i>pbp5</i>	CC17	ST280	150	2002	Hospital C	H207	32	II	C4
						TCH207. 1GE1	32	Desconhecido	
						TCH207.3 BM	8	ND	
		ST393	SN208	2006	Suinicultura IV	SN71	64	ND	
						TCSN71.1 GE1	64	I	C9
						TCSN71.1 BM	8	ND	
						TCSN71.1 64/3	64	ND	
						SN133	64	ND	
		ST125	126	2007	Hospital A	TCSN133.3 GE1	64	I	C9
HPH2	128					ND			
TCHPH2.1 GE1	64					I	C12		
				TCHPH2.4 64/3	8	ND			
Não transferiram o gene <i>pbp5</i>	Não CC17	ST16	74	2000	Hospital A	HPH6	>64	II	C6
		ST280	71	2000	Hospital B	529940	>32	II	C4
		ST368	H4	2001	Hospital D	H196	>32	III	C8
		ST390	129	2002		H352	>32	IV	C1
		ST18	128	2007	Suinicultura IV	SN446	>32	II	C5
		ST132	H119.5	2007	Água residual de hospital C	E197	>32	III	C8
		ST190	98	1998	Hospital B	164306	32	IV	C2
		ST148/CC9	36.2	2001	Fezes de humanos saudáveis	C373	>32	I	C11
		<i>purK6</i>	ND	2001	Aves para consumo humano	SE97F1	>32	I	C10
		<i>purK6</i>	ND	2006	Suinicultura IV	SN194	32	IV	C3

As ampliações correspondentes ao gene *pbp5* (P1-P2), região da bomba de efluxo de iões/proteína hipotética (P8-P9) e região *N-acyl-glucosamine-6-phosphate-2-epimerase*/gene *ftsW* (P6-P7) deram o tamanho esperado para todos os isolados testados. Para a amplificação das regiões *pbp5*/bomba de efluxo de iões (P4-P5) a maioria dos isolados deu o tamanho de 326 pb esperado. Os isolados 28798, TC28798.2 GE1, E49, TCE49.1 GE1, E233, TCE233.1 GE, E169 e TCE169.3 GE1 apresentaram uma banda de cerca de 2000 pb. Os ensaios de RFLP com a enzima *AluI* revelaram um perfil de corte igual entre estes isolados (RFLP tipo E; Tabela 13). Os resultados dos ensaios de sequenciação estão representados na Figura 15 e descritos na secção 7. do capítulo III.

A caracterização da região *ftsW*/gene *pbp5* (P3-P2) também revelou variedade nos tamanhos amplificados (entre cerca de 4,5 kb e 7 kb). Exceção foi o transconjugante TCH207.1 GE1 em que não foi possível obter amplificação desta região. Os ensaios de RFLP com *DdeI* revelaram também variedade de perfis, representados na Tabela 13 e Figura 14. Dentro dessa variabilidade verificou-se que as bactérias recetoras *E. faecium* BM4105RF e *E. faecium* 64/3 apresentaram perfis de RFLP designados de A e B, distintos das restantes bactérias estudadas. Adicionalmente observou-se também que as bactérias transconjugantes de *E. faecium* BM4105RF e de *E. faecium* 64/3 tinham um perfil de RFLP igual à das bactérias dadoras e diferente das bactérias recetoras. Os resultados dos ensaios de sequenciação estão representados na Figura 15 e descritos na secção 7. do capítulo III.

Tabela 13. Bactérias selvagens, recetoras e transconjugantes em que se caracterizou por PCR e RFLP a região genómica entre os genes *N-acetylglucosamine-6-phosphate-2-epimerase* e *ftsW* (primers P6 e P7), *ftsW*, *psr* e *pbp5* (primers P2 e P3), *pbp5* e bomba de efluxo de iões (primers P4 e P5) e bomba de efluxo de iões e proteína hipotética (primers P8 e P9). Legenda : N.D. – Não determinado, (-) – Sem Amplificação.

Bactérias (selvagens, transconjugantes e recetoras)	ST/CC	Nicho ecológico	PCR P6-P7 (kb)	PCR P3-P2 (kb)	RFLP (<i>DdeI</i> ; P3-P2)	PCR P4-P5 (kb)	RFLP (<i>AluI</i> ; P4-P5)	PCR P8-P9 (kb)
<i>E. faecium</i> GE1	ST515	Laboratório	(-)	(-)		(-)	ND	(-)
<i>E. faecium</i> BM4105RF	ST172	Laboratório	1,8	4,5	A	0,32	ND	2
<i>E. faecium</i> 64/3	ST21	Laboratório	1,8	4,5	B	0,32	ND	ND
E49			1,8	7	D	2	E	2
TCE49.1 GE1			1,8	7	D	2	E	2
E4		Água residual	1,8	7	D	0,32	ND	2
TCE4.1 GE1		de hospital E	1,8	7	D	0,32	ND	2
E233	ST132/CC17		1,8	7	D	2	E	2
TCE233.1 GE1			1,8	7	D	2	E	2
E169		Água residual	1,8	7	D	2	E	2
TCE169.3 GE1		de hospital C	1,8	7	D	2	E	2
VD79C1		Fezes de	1,8	7	D	0,32	ND	2
TCVD79C1.5 GE1	ST18/CC17	humano	1,8	7	D	0,32	ND	2
TCVD79C1.6 BM		saudável	1,8	7	D	0,32	ND	2

Tabela 13. (Continuação).

Bactérias (selvagens, transconjugantes e receptoras)	ST/CC	Nicho ecológico	PCR P6-P7 (kb)	PCR P3-P2 (kb)	RFLP (<i>DdeI</i> ; P3-P2)	PCR P4-P5 (kb)	RFLP (<i>AluI</i> ; P4-P5)	PCR P8-P9 (kb)
H207			1,8	4,5	C	0,32		2
TC H207.1 GE1	ST280/CC17	Hospital C	(-)	(-)	ND	0,32		2
TC H207.3 BM			1,8	4,5	ND	0,32		2
HPH2			1,8	4,5	C	0,32		2
TC HPH2.1GE1	ST125/CC17	Hospital A	1,8	4,5	C	0,32		2
70411			1,8	6,5	D	0,32		2
TC70411.2 GE1	ST132/CC17	Hospital B	1,8	7	D	0,32		2
TC70411.5 BM			(-)	7	D	0,32		ND
28798			1,8	7	ND	2	E	2
TC28798GE1	ST132/CC17	Hospital B	1,8	7	ND	2	E	2
H323			1,8	4,5	C	0,32	ND	2
TCH323. 3GE1	ST280/CC17	Hospital C	1,8	4,5	C	0,32	ND	2
SN71			1,8	4,5	C	0,32	ND	2
TCSN71.1 GE1			1,8	4,5	C	0,32	ND	2
TCSN71.1 BM	ST393/CC17	Suicultura	1,8	4,5	C	0,32	ND	2
TCSN71.1 64/3		IV	1,8	4,5	C	0,32	ND	2
SN133			1,8	4,5	C	0,32	ND	2
TCSN133.3 GE1			1,8	4,5	C	0,32	ND	2

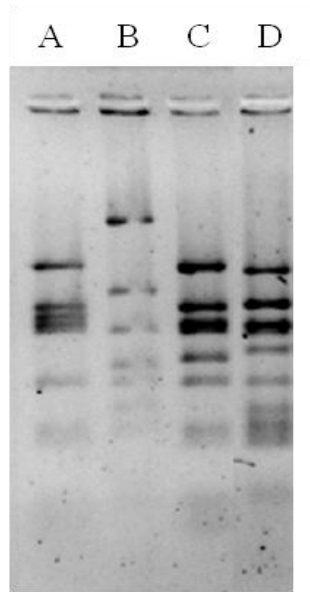


Figura 14. Representação dos perfis de RFLP (enzima *DdeI*) obtidos após amplificação do fragmento entre os genes *ftsW* e *pbp5* (primers P2 e P3).

9.2. Sequenciação das regiões que flanqueiam *pbp5*

A sequenciação das regiões que flanqueiam o gene *pbp5* revelou a presença de diversas sequências de inserção (IS), acompanhadas ou não de outros genes (Figura 15). Para distinguir a variedade das plataformas genéticas encontradas foi atribuída uma designação de I-IV.

Na plataforma I não se detetou a inserção de IS a flanquear o gene *pbp5*. Esta plataforma foi considerada o protótipo do ambiente genético deste gene. A plataforma I foi encontrada em isolados oriundos da comunidade, clínicos e de suiniculturas, que conseguem ou não transferir o gene *pbp5* e que pertencem a diversos ST (incluídos ou não em CC17) (Tabela 14).

Na plataforma II detetou-se a inserção da *ISEfmI* e dos genes que codificam para as enzimas acetiltransferase e histidinol-fosfato fosfatase entre os genes *pbp5* e *psr*. Esta plataforma foi observada em isolados da comunidade, clínicos e de águas residuais

hospitalares. Todos os isolados pertencem a diferentes STs do CC17 e estão incluídos no grupo que transferem e não transferem a resistência à ampicilina.

A plataforma III difere da plataforma II, uma vez que possui *ISEfa11* inserida entre o gene *pbp5* e um gene que codifica uma bomba de efluxo de iões. Os isolados desta plataforma pertencem a diferentes nichos ecológicos (isolados clínicos, águas residuais de hospitais e suiniculturas). Estes *E. faecium* (que transferem e não transferem o gene *pbp5*) pertencem a ST132 e ST368, ambos pertencentes ao CC17.

O grupo de genes *ISEfm1*+gene que codifica para as enzimas acetiltransferase ou histidinol-fosfato fosfatase e a *ISEfa11* das plataformas II e III integraram-se na mesma posição nucleotídica (lado 5' de 5'-TTTTATTATGTTAGAATAACA3') nos isolados estudados.

Por fim, na plataforma IV, foi detetada a *ISEfl* entre os genes *pbp5* e *psr*. A sua inserção nucleotídica foi variável entre os isolados estudados. Estes *E. faecium* são também provenientes de diferentes ambientes, tais como isolados clínicos, de suiniculturas e águas residuais e pertencem a STs incluídos ou não no CC17. Nenhum destes isolados transferiu *pbp5* para as bactérias recetoras.

10. Estudos de bioinformática

10.1. Variedade do ambiente genético de *pbp5*

A análise *in silico* efetuada com sequências genómicas de outras bactérias de *E. faecium* disponíveis no GenBank, permitiu a identificação de cinco plataformas genéticas onde está inserido o gene *pbp5*. Três delas (I, II, IV) correspondiam aquelas encontradas na bactérias incluídas neste estudo (Figura 15 e Tabela 14). A plataforma III foi apenas detetada nos isolados deste trabalho. A plataforma V, foi apenas identificada num isolado do GenBank (*E. faecium* C68) que possui o transposição conjugativo Tn5382 (contém o gene *vanB2*), responsável pela mobilização de *pbp5*. As plataformas II, IV e

V foram detetadas em isolados resistentes à ampicilina. A plataforma I foi detetada quer em isolados resistentes quer suscetíveis à ampicilina.

Todas as bactérias disponíveis no GenBank para as quais foi possível fazer uma comparação com os nossos isolados foram obtidas de doentes hospitalizados, quer associados a infeção quer a colonização, e de humanos saudáveis provenientes da Holanda e Estados Unidos (Tabela 14).

10.2. Alterações aminoacídicas em PBP5

Foram detetadas diversas alterações aminoacídicas em PBP5 (Tabelas 14 e 15) codificado pelo gene *pbp5* inserido nas várias plataformas (I, II, IV e V) detetadas em isolados publicados do GenBank.

As combinações de alterações aminoacídicas de PBP5 são diferentes para as cinco plataformas descritas. Exceção é a combinação C7 detetada na plataforma I de um isolado clínico dos Estados Unidos (*E. faecium* 1,230,933; GenBank: GG692537.1) e na plataforma II de isolados deste estudo (E4 e VD79C1). Outra combinação de alterações aminoacídicas comuns às detetadas em isolados deste estudo foi a combinação C11 observada em *E. faecium* 1,231,408 (Nº de acesso do GenBank GG688547) e num isolado das fezes de um humano saudável de ST148/CC9 (Tabelas 12 e 14). As combinações C13 a C18 foram apenas detetadas em isolados publicados no GenBank.

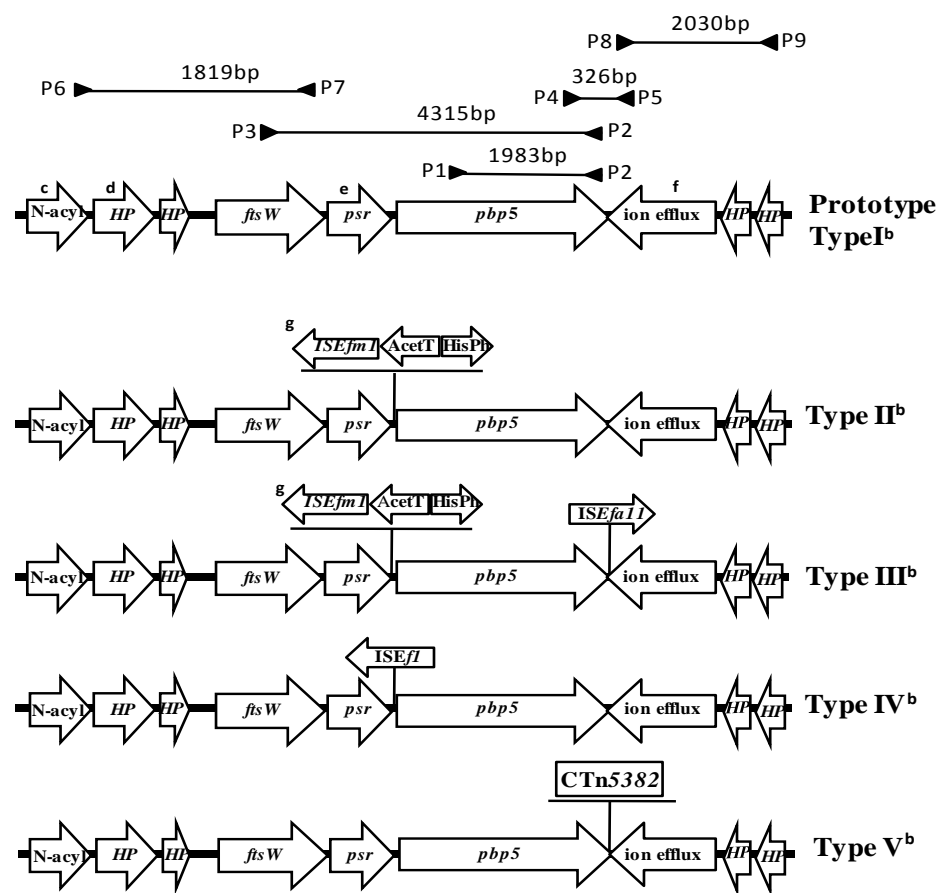


Figura 15. Caracterização do ambiente genético do gene *pbp5* de *E. faecium* por PCR e sequenciação. A numeração romana apresentada (I, II, III, IV e V) representa as diferentes estruturas genéticas encontradas. O símbolo (+) representa uma amplificação positiva e (++) uma amplificação cujo produto possui maior tamanho que o esperado. ^aOs diferentes tipos de plataformas foram designados de acordo com a diversidade de seqüências de inserção ou transposões conjugativos nas regiões intergênicas. Mutações ou recombinações dentro dos genes ou regiões intergênicas não foram consideradas. ^b *N*-acetyl-glucosamine-6-phosphate-2-epimerase (*N*-acyl) é referido no GenBank como “*N*-acetylmannosamine-6-P”. Essas seqüências têm 98% de homologia (NZ_GG692468.1; ABQI01000087.1). ^cA proteína hipotética conservada (HP) é designada no GenBank como a proteína conservada YwrF. Essas seqüências têm 100% de homologia (NZ_GG692468.1; ABQI01000087.1). ^dO repressor da síntese de PBP5 (*psr*) é denominado no GenBank como um repressor da transcrição de um invólucro celular. Essas seqüências possuem 98% de homologia aminoacídica (NZ_GG692468.1, NZ_ABQI01000087.1). ^eO gene representado como um bomba de efluxo de iões é designado no GenBank também como um sistema proteico de efluxo de potássio, antiportador Na⁺/H⁺ e proteína transportadora monovalente de catiões e protões da família de antiportadores 2. Estas seqüências têm 98% de homologia de aminoácidos (NZ_GG692468.1; AECJ010000122.1; ABQI01000087.1). ^fA transposase *ISEfm1* é mencionada no GenBank também como *IS4*, *IS9*, *ISEfm3* ou transposase. Todas as seqüências têm 100% de homologia aminoacídica (AF138282.1; AY887084.1; EAN11146.1; EEV43591.1; <http://www-is.biotoul.fr/is.html>).

Abreviaturas: *N*-acyl, *N*-acetyl-glucosamine-6-phosphate-2-epimerase; PH, proteína hipotética; *ftsW*, proteína do ciclo celular FtsW; *psr*, repressor da síntese de *pbp5*; *pbp5*, “penicillin binding protein 5”; AceT, Acetiltransferase; HisPh – Histidinol-fosfato fosfatase.

Tipo	PCR				
	Primers				
	P1 – P2	P3 – P2	P4 – P5	P6 – P7	P8-P9
I	+	+	+	+	+
II	+	++	+	+	+
III	+	++	++	+	+
IV	+	++	+	+	+

Tabela 14. Caracterização das diferentes plataformas genéticas (I-V) que incluem o gene *pbp5* obtidas de isolados deste estudo e após pesquisa *in silico* de sequências disponíveis no GenBank.

Tipo de plataforma genética	^a Estirpes de <i>E. faecium</i>	Suscetibilidade à ampicilina	Nicho ecológico	Região geográfica	Data	Combinação de alterações aminoacídicas	Referência
I	Este estudo, 1,230,933; 1,231,408; 1,231,502; 1,231,410; UO317	Resistente	Comunidade, vigilância hospitalar, isolados clínicos, animais	Portugal, Holanda, Estados Unidos	2001-2006	C7, C9, C10, C11, C12, C15, C16	Este estudo, (Palmer <i>et al.</i> 2010; van Schaik <i>et al.</i> 2010)
	E1071, E1039	Suscetível		Holanda	1998-2000	C13, C14	(van Schaik <i>et al.</i> 2010)
II	Este estudo, TX0133a01	Resistente	Vigilância da comunidade, isolados clínicos, águas residuais de hospitais	Portugal, Estados Unidos	1997-2007	C4, C5, C6, C7	Este estudo, (Arias <i>et al.</i> 2007)
III	Este estudo	Resistente	Isolados clínicos, águas residuais de hospitais, suiniculturas	Portugal	1997-2007	C8	Este estudo
IV	Este estudo, DO	Resistente	Isolados clínicos, águas residuais de suiniculturas	Portugal, Estados Unidos	1991-2004	C1, C2, C3, C17	Este estudo, (Arduino, Murray & Rakita 1994)
V	C68	Resistente	Isolados clínicos	Estados Unidos	1996	C18	(Carias <i>et al.</i> 1998)

^aSequências analisadas no Genbank: *E. faecium* 1,230,933 (GG692537.1); 1,231,408 (GG688547); 1,231,502 (NZ_GG688486.1); 1,231,410 (NZ_GG692468.1); E1071 (NZ_ABQI01000087.1); U0317 (NZ_ABSW01000111.1); E1039 (ACOS01000009.1); TX0133a01 (AECJ01000122.1); DO (AAAK03000030.1), C68 (NZ_GG703717.1).

Tabela 15. Substituições de aminoácidos da proteína PBP5 detetadas em isolados de *E. faecium* deste estudo e em sequências disponíveis no GenBank.

Combinação de mutações	Substituições de aminoácidos em PBP5																																					
	24	25	27	34	39	66	68	85	100	144	172	177	204	216	324	350	398	401	405	408	461	462	Depois de 466	485	496	497	499	525	546	558	582	586	629	632	642	644	667	
BM4107 ^a	V	T	S	R	S	G	A	E	E	K	T	L	D	A	T	K	D	A	N	Q	Q	V	Nenhum	M	N	F	A	E	N	A	G	V	E	K	P	D	P	
BM4105RF ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N
C1	A	A	G	Q	T	E	-	E	Q	Q	A	I	G	S	A	R	-	S	-	-	-	-	-	-	-	K	-	I	D	-	-	-	-	-	-	-	N	-
C2	A	A	G	Q	T	E	-	E	Q	Q	A	I	G	S	A	R	-	S	-	-	-	-	-	-	-	K	-	I	D	-	-	-	-	-	-	H	N	-
C3	A	A	G	Q	T	E	T	D	Q	Q	A	I	G	S	A	R	-	-	-	-	-	-	D	-	K	L	T	D	-	-	-	-	V	-	-	N	S	
C4	A	A	G	Q	T	E	T	D	Q	Q	A	I	G	S	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	K	-	T	D	-	-	-	L	V	-	-	N	S
C5	A	A	G	Q	T	E	T	D	Q	Q	A	I	G	S	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	K	L	T	D	-	-	-	L	V	-	-	N	S
C6	A	A	G	Q	T	E	T	D	Q	Q	A	I	G	S	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	K	-	T	D	-	-	-	L	V	-	-	N	S
C7	A	A	G	Q	T	E	T	D	Q	Q	A	I	G	S	A	-	-	-	-	-	K	-	-	-	A	K	-	T	D	-	-	-	L	V	-	-	N	S
C8	A	A	G	Q	T	E	T	D	Q	Q	A	I	G	S	A	-	-	-	D	-	K	-	-	-	A	K	-	T	D	-	-	-	L	V	-	-	N	S
C9	A	A	G	Q	T	E	T	D	Q	Q	A	I	G	S	A	-	-	-	-	-	K	-	S	-	A	K	-	T	D	-	-	-	-	V	-	-	N	S
C10	A	A	G	Q	T	E	T	D	Q	Q	A	I	G	S	A	-	-	-	-	-	K	-	S	-	A	K	I	T	D	-	-	-	-	V	-	-	N	S
C11	A	A	G	Q	T	E	T	D	Q	Q	A	I	G	S	A	-	-	-	-	-	-	-	S	-	A	K	-	T	D	-	-	-	-	V	-	-	N	S
C12	A	A	G	Q	T	E	T	D	Q	Q	A	I	G	S	A	-	-	-	-	H	-	-	-	-	A	K	I	T	D	-	-	-	L	V	-	-	N	S
C13	A	-	G	Q	T	E	T	D	Q	Q	A	I	G	S	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	T	D	-	-	-	-	-	-	-	N	S
C14	A	A	G	Q	T	E	-	-	Q	Q	A	I	-	S	A	-	N	S	-	-	-	-	-	-	-	K	I	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C15	A	A	G	Q	T	E	T	D	Q	Q	A	I	G	S	A	-	-	-	-	H	-	A	S	-	A	K	-	T	D	T	T	S	-	V	Q	L	N	S
C16	A	A	G	Q	T	E	T	D	Q	Q	A	I	G	S	A	-	-	-	-	-	-	-	S	-	A	K	-	T	D	-	-	-	-	V	Q	-	N	S
C17	A	A	G	Q	T	E	T	D	Q	Q	A	I	G	S	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	T	D	-	-	-	-	-	-	-	N	S
C18	A	A	G	Q	T	E	T	D	Q	Q	A	I	G	S	A	-	-	-	-	-	-	-	S	-	A	K	L	T	D	-	-	-	-	V	-	-	N	S

^aSequência aminoacídica da estirpe de *E. faecium* BM4107 (AF364092.1) suscetível à ampicilina.

^bNa bases de dados do GenBank só está disponível a sequência aminoacídica de *E. faecium* BM4105RF entre os aminoácidos 461 e 644 (AF375986.1).

V. DISCUSSÃO

Atualmente, a maioria dos isolados de *E. faecium* associados a infecções nosocomiais são resistentes à ampicilina (sobretudo através da presença do gene *pbp5* mutado) e pertencem a STs incluídos em CC17 (Willems *et al.* 2011). Apesar das elevadas taxas de resistência a este antibiótico encontradas em várias regiões geográficas, pouco se conhece sobre o papel da transferência horizontal na disseminação do gene *pbp5* entre isolados de *E. faecium* (Rice *et al.* 2005b).

Neste trabalho avaliou-se a capacidade da transferência horizontal do gene *pbp5* em *E. faecium* provenientes de diferentes nichos ecológicos (humano, animal e ambiental), a diversidade de linhagens clonais em que isto ocorreu e caracterizaram-se as plataformas genéticas em que o gene *pbp5* estava inserido.

1. A transferência horizontal da resistência à ampicilina ocorreu entre isolados de *E. faecium* provenientes de diferentes nichos ecológicos e estirpes recetoras com diferentes contextos genéticos

Um número significativo de isolados de *E. faecium* incluídos neste estudo transferiu o gene *pbp5* para bactérias recetoras portadoras (*E. faecium* BM4105RF e *E. faecium* 64/3) e não portadoras (*E. faecium* GE1) deste gene. A transferência do gene *pbp5* em *E. faecium* foi previamente descrita mas apenas num número reduzido de estudos (Carias *et al.* 1998; Hanrahan, Hoyen & Rice 2000) que incluíam fundamentalmente isolados clínicos e, numa ocasião, também *E. faecium* de origem animal (Rice *et al.* 2005b). Os dados obtidos no presente estudo vêm mostrar que a transferência da resistência à ampicilina mediada pelo gene *pbp5* parece ser mais comum do que inicialmente se pensava, ocorrendo em isolados de *E. faecium* oriundos de diversos nichos ecológicos (e não apenas em isolados nosocomiais) e em outras regiões geográficas para além daquelas inicialmente descritas nos Estados Unidos (Rice *et al.* 2005b; Hanrahan, Hoyen & Rice 2000; Carias *et al.* 1998), mostrando ser um fenómeno global e não regional.

Estudos prévios observaram a transferência do gene *pbp5* para *E. faecium* GE1 (sem *pbp5*) (Rice *et al.* 2005b; Carias *et al.* 1998; Hanrahan, Hoyen & Rice 2000). Em condições naturais este gene está presente em *E. faecium* tendo sido fundamental averiguar a sua transferência para isolados já portadores de *pbp5*. Rice *et al.* (2005b) confirmaram esta hipótese usando estirpes isogénicas com e sem *pbp5*. O presente estudo para além de corroborar a capacidade de *pbp5* ser transferido para bactérias com este gene, vem também mostrar que isto ocorre entre bactérias que não são isogénicas e que possuem diferentes contextos genéticos (ver ponto 3 da discussão).

Embora *pbp5* tenha sido transferido para diferentes bactérias recetoras, a expressão da resistência à ampicilina foi heterogénea entre os diferentes transconjugantes (8-128 mg/L). Esta variabilidade na expressão da resistência à ampicilina após a transferência de *pbp5* foi também observada noutros estudos (Rice *et al.* 2005b; Carias *et al.* 1998; Hanrahan, Hoyen & Rice 2000), desconhecendo-se ainda a razão deste fenómeno. Possivelmente a aquisição de outros genes para além de *pbp5*, ou outros fatores presentes na bactéria recetora, podem interferir na regulação da resistência à ampicilina.

Se a deteção de alguns transconjugantes com valores de CMI abaixo do limite mínimo de resistência (observada neste e em outros estudos) refletir o que se passa na natureza, a transferência da resistência à ampicilina (*pbp5*) para diferentes *Enterococcus* ou para outras espécies pode ter uma frequência ainda maior do que aquela avaliada laboratorialmente. De facto, as concentrações de ampicilina usadas neste e noutros estudos (Rice *et al.* 2005b; Hanrahan, Hoyen & Rice 2000), embora dentro dos critérios de suscetibilidade à ampicilina, podem ser demasiado altas para permitir a deteção de alguns transconjugantes. Desconhece-se também qual a evolução da expressão da resistência destas bactérias com CMI mais reduzidas quando sujeitas a ambientes de elevada pressão seletiva.

Apesar da frequência de conjugação não ter sido determinada, a obtenção de transconjugantes apenas após dois ou três ensaios de conjugação e o crescimento de um número reduzido de colónias nas placas de seleção sem diluição, sugere a ocorrência de uma frequência de transferência de *pbp5* reduzida nas condições laboratoriais utilizadas

Assim, serão necessários mais estudos que nos permitam avaliar a possível existência de fatores químicos ou físicos que favoreçam a transferência do gene *pbp5*, no sentido de compreender melhor a dispersão deste gene na natureza.

2. A transferência horizontal da resistência à ampicilina ocorreu juntamente com a transferência de resistência a outras classes de antibióticos

A disseminação da resistência à ampicilina foi acompanhada pela transferência da resistência a outras classes de antibióticos (glicopéptidos, eritromicina, estreptomicina e gentamicina) em alguns isolados. Resultados semelhantes foram publicados por Hanrahan, Høyen & Rice (2000) que detetaram a transferência da resistência à ampicilina juntamente com a resistência a outros antibióticos como a eritromicina, estreptomicina e tetraciclina.

A cotransferência da resistência à ampicilina e vancomicina foi previamente reportada (Carias *et al.* 1998), encontrando-se associada à presença de Tn5382. Contudo, este transposão conjugativo não foi detetado nos isolados deste estudo. Este resultado já era esperado uma vez que nenhum dos *E. faecium* incluídos era portador do gene *vanB*, mas sim do gene *vanA*. Embora a localização de *vanA* não tenha sido um dos objetivos deste estudo, este gene foi previamente localizado em plasmídeos (Freitas *et al.* 2009a), ou seja, em elementos genéticos distintos daqueles que transferem o gene *pbp5* (localização cromossomal).

A cotransferência da resistência à ampicilina e tetraciclina, associada ao Tn916 também foi previamente descrita (Rice *et al.* 2005a). Este e outros transposões portadores do gene *tet(M)* não foram detetados em *E. faecium* deste estudo, sugerindo a presença de outros elementos genéticos associados à resistência à tetraciclina. No isolado SN71 (incluído em outros trabalhos em curso) foi detetada a presença dos genes *tet(M)* e *erm(B)* em plasmídeos, ou seja, em elementos distintos daqueles que mobilizam o gene *pbp5* (Silveira *et al.* 2011).

A cotransferência da resistência a outras classes de antibióticos sugere que o uso intensivo de ampicilina pode levar à seleção de bactérias com resistência múltipla a

agentes antimicrobianos, nomeadamente àqueles que são importantes no tratamento de infeções enterocócicas (ex. glicopéptidos ou aminoglicosídeos).

3. *E. faecium* com capacidade de transferirem horizontalmente *pbp5* pertencem a diversos ST de CC17

Embora o estudo de Rice *et al.* (2005b) tenha demonstrado a transferência da resistência à ampicilina em *E. faecium* (doentes hospitalizados n=8; perús n=3) com diferentes tipos de PFGE, outros estudos de tipagem não foram realizados. Os resultados deste trabalho demonstram que a transferência da resistência à ampicilina ocorre entre isolados pertencentes a CC17 e uma diversidade de bactérias recetoras incluídas no CC17 (isolados selvagens que adquiriram o gene na natureza) e não-CC17 [bactérias recetoras (ST21, ST172, ST515) usadas neste estudo].

O facto de nem todos os *E. faecium*-CC17 terem transferido *pbp5* para as bactérias recetoras pode ser justificado por uma reduzida frequência de conjugação com ocorrência de falsos negativos ou pela perda de capacidade de mobilização das plataformas genéticas previamente adquiridas.

A resistência à ampicilina em *E. faecium* tem sido largamente associada a isolados identificados dentro de CC17 (Willems *et al.* 2005), e é considerada um marcador importante deste complexo clonal. Embora a resistencia à ampicilina esteja largamente associada à expansão clonal de *E. faecium*, a capacidade que estes isolados parecem ter em mobilizar plataformas com *pbp5* pode ajudar a compreender os elevados níveis de resistência a este antibiótico observados ao longo dos últimos anos (Top, Willems & Bonten 2008).

A manutenção da resistência à ampicilina nas bactérias selvagens CC17 e nos respetivos transconjugantes de *E. faecium* GE1 (não CC17) após várias passagens em BHI não suplementado com antibióticos indica que as plataformas genéticas que contêm *pbp5* podem persistir na ausência de pressão seletiva em hospedeiros incluídos ou não no

CC17. No entanto, ficou ainda por esclarecer a razão pela qual a resistência à ampicilina não é detetada frequentemente em *E. faecium* não CC17 na natureza.

4. O gene *pbp5* é mobilizado em plataformas genéticas de inserção cromossomal

Uma banda cromossômica de 200-210 kb portadora do gene *pbp5* foi identificada na maioria dos transconjugantes de *E. faecium* GE1, BM4105RF e 64/3, e suas correspondentes estirpes selvagens. Como a estirpe recetora *E. faecium* GE1 já contém uma banda de tamanho semelhante (Figura 13) foi difícil inferir com precisão o tamanho da sequência adquirida a partir de experiências em que se utilizou esta recetora. No entanto, uma banda extra única de 170 kb identificada num transconjugante de *E. faecium* 64/3 (estirpe TCHPH2.4 64/3; ver Figura 13), pode corresponder ao tamanho previamente sugerido para as plataformas adquiridas que contêm o gene *pbp5* (Rice *et al.* 2005b).

Diferentes eventos associados à transferência de *pbp5* têm sido sugeridos em estudos anteriores, utilizando uma única estirpe recetora (*pbp5*⁺/*pbp5*⁻), que incluiu a substituição das plataformas naturais de *pbp5* por outras com integração em local específico ou através de recombinação homóloga mediada por elementos genéticos da família de CTn916 (Rice *et al.* 2005a). Embora estes dados sejam também sugeridos pelo tamanho semelhante do fragmento que hibrida com *pbp5* na maioria dos transconjugantes de *E. faecium* GE1 (*pbp5*⁻), os ensaios de conjugação com as bactérias recetoras *E. faecium* BM4105RF e *E. faecium* 64/3 (*pbp5*⁺) parecem não apontar para a substituição da plataforma de *pbp5* natural nos transconjugantes em todos os casos. Esta hipótese é sugerida pela presença de duas cópias de *pbp5* em alguns dos transconjugantes, sendo mais claramente demonstrada pela hibridação da sonda de *pbp5* com o gene natural (banda de 250 kb) e um fragmento extra de 170 kb num dos transconjugantes de *E. faecium* 64/3.

No entanto, a similaridade dos tipos de PFGE observada nos transconjugantes obtidos de diferentes bactérias selvagens com eventuais plataformas de *pbp5* heterogêneas pode

indicar também um processo de recombinação homóloga numa região comum do genoma de *E. faecium*.

Neste trabalho não foi possível associar a transferência de *pbp5* a vários transposões comuns em bactérias de Gram positivo, incluindo CTn5382, CTn916, ou CTn5386 previamente responsabilizados pela mobilização de plataformas genéticas portadoras de *pbp5* (Rice *et al.* 2005a; Carias *et al.* 1998; Rice *et al.* 2005b). A suspeita da presença de plataformas heterogêneas portadoras deste gene foi também previamente detetada através de ensaios de hibridação e sondas específicas para as zonas que flanqueiam *pbp5* (Rice *et al.* 2005b).

5. O gene *pbp5* está inserido em plataformas genéticas heterogêneas dispersas em diferentes nichos, anos e regiões geográficas, sendo maioritariamente caracterizadas pela presença de variadas sequências de inserção (IS)

A análise da região vizinha (8-10 kb) de *pbp5* em isolados representativos (selvagens e transconjugantes) deste trabalho e disponíveis no GenBank permitiram a identificação de cinco plataformas (I-V) geradas por diferentes inserções de DNA (IS, fragmentos genômicos e transposões conjugativos) (Figura 15).

A plataforma I, observada quer em *E. faecium* resistentes e suscetíveis à ampicilina parece ser a mais ancestral. A plataforma II parece derivar da I, uma vez que mantém a mesma estrutura base, adquirindo o fragmento *ISEfm1*-acetiltransferase-histidinol fosfato fosfatase, entre os genes *pbp5* e *psr*. Por sua vez a plataforma III parece derivar da II, uma vez que para além da estrutura atrás mencionada apresenta a sequência de inserção *ISEfa11* (família *ISL3*) entre os genes *pbp5* e o gene da bomba de efluxo de iões.

Presume-se que as outras duas plataformas têm origens diferentes, sendo que a plataforma IV deverá derivar da I pela introdução da sequência de inserção *ISEfl* (família *IS256*) entre os genes *pbp5* e *psr*, enquanto a plataforma V deriva da I pela

aquisição do transposão conjugativo Tn5382 entre o gene *pbp5* e o gene que codifica para a bomba de efluxo de iões.

A manutenção dos limites (IR-*Inverted Repeats*) de todas as IS detetadas sugere que são de aquisição recente pela plataforma I. Estas IS foram previamente observadas nos genomas de *Enterococcus* spp (Dahl *et al.* 2000a; Rice *et al.* 2010; Lopez *et al.* 2010; Boyd *et al.* 2000), mas a deteção de ISE*fa11* a flanquear *pbp5* foi observada pela primeira vez neste estudo.

Especificamente nos *E. faecium* incluídos neste trabalho, observaram-se quatro plataformas genéticas (I a IV). A comparação dos resultados obtidos com as sequências disponíveis no GenBank permitiu verificar a existência das plataformas I, II e IV em diversos genomas de *Enterococcus* provenientes de diferentes regiões geográficas, nichos ecológicos e pelo menos desde a década de 90 do século XX (Figura 15). Estes dados demonstram não só a sua dispersão global, mas também a estabilidade da sintenia deste fragmento de 8-10 kb em isolados de diferentes nichos, sendo que a cocirculação destes fragmentos tem ocorrido ao longo dos anos, desde que a resistência à ampicilina e o CC17 tiveram um incremento de incidência nas unidades hospitalares.

A exceção foi a plataforma III, apenas observada neste trabalho e a plataforma V que não foi detetada nos *E. faecium* estudados. Embora esta plataforma V tenha sido apenas detetada no *E. faecium* C68 (Nº acesso ao GenBank NZ_GG703717.1) a sua dispersão na natureza é frequente, dado o número de publicações a descrever a presença de Tn5382 em *E. faecium* (Valdezate *et al.* 2009; Torres *et al.* 2006; Lu *et al.* 2005; Carias *et al.* 1998).

Sabe-se que as IS são importantes na evolução dos genomas bacterianos (expressão e mobilização de genes) (Hegstad *et al.* 2010). No entanto, desconhece-se qual a importância da manutenção das IS encontradas (sobretudo o grupo de genes mais frequente ISE*fm1*-acetiltransferase-histidinol fosfato fosfatase) na expressão da resistência à ampicilina, pelo que outros estudos deverão ser desenvolvidos. Contudo, na posição em que foram encontradas, não deverão ter um papel na mobilização do gene

pbp5, uma vez que a plataforma mobilizada para as estirpes recetoras vai para além de IS-*pbp5*-IS. De facto, a recetora *E. faecium* GE1 não possui os genes pesquisados nas plataformas de 8-10 kb, posteriormente observados nos seus tranconjugantes.

6. Os genes *pbp5* transferidos horizontalmente possuem variedade alélica entre si e parecem coevoluir com as plataformas em que estão inseridos ou outros genes do genoma de *E. faecium*

À semelhança de outros estudos, as combinações aminoacídicas encontradas foram semelhantes entre os isolados resistentes à ampicilina mas significativamente diferentes de isolados com suscetibilidade a este antibiótico (*E. faecium* BM4107) (Galloway-Pena, Rice & Murray 2011; Rybkine *et al.* 1998; Sifaoui *et al.* 2001). Também se detetou que a presença da inserção de uma serina após o aminoácido da posição 466 e Met-485-Ala/Thr não são necessárias para a expressão da resistência à ampicilina como previamente descrito (Poeta *et al.* 2007b; Galloway-Pena, Rice & Murray 2011; Rybkine *et al.* 1998; Rice *et al.* 2004). Estes resultados também corroboram os dados recentemente publicados (Galloway-Pena, Rice & Murray 2011). De facto, a maioria dos isolados com resistência à ampicilina (CMI \geq 32mg/L) possuíam apenas Met-485-A/T (C4, C5, C6, C7, C8, C12) ou nenhuma destas alterações aminoacídicas (C1, C2 e C3).

Não foi possível identificar diferenças significativas entre os isolados de *E. faecium* resistentes à ampicilina que transferiram e que não transferiram o gene *pbp5*. As combinações C4 e C8 foram inclusivamente partilhadas por ambos os grupos. Embora estes dados sugiram que a mobilização de plataformas com *pbp5* não esteja exclusivamente implicada na ocorrência de determinados alelos deste gene, não se pode descartar a possibilidade de alguns dos isolados do grupo que não transferem *pbp5* o possam fazer em outras condições usadas nos ensaios de conjugação, ou que tenham adquirido a plataforma com *pbp5* que posteriormente perdeu capacidade de mobilização.

Ao contrário das plataformas I, II e IV (em que se detetaram diferentes alelos de *pbp5* em diferentes isolados), na plataforma III só se observaram alterações aminoacídicas correspondentes a C8. Adicionalmente, a plataforma III está associada a isolados pertencentes a ST132 ou ao seu SLV ST368, sugerindo que esta plataforma e seu *pbp5* podem estar a ser disseminados sobretudo por expansão clonal de *E. faecium*. A similaridade de alterações aminoacídicas de *pbp5* em isolados com a plataforma V foi também previamente descrita (Hanrahan, Hoyen & Rice 2000).

A presença de um elevado polimorfismo entre as sequências de *pbp5* analisadas parece ser frequente na natureza (neste estudo e em outras sequencias publicadas no GeneBank). Esta variabilidade pode refletir a disseminação de um fragmento de DNA de elevado tamanho portador de *pbp5* que evoluiu independentemente em diferentes hospedeiros que estão sob pressão seletiva. Esta hipótese é sugerida pela variabilidade de sequências de *pbp5* localizadas em regiões com um conteúdo em IS semelhante e pertencendo a linhagens genéticas próximas (STs de CC17 que são *single locus variants*-SLV entre eles).

De facto, a plataforma II portadora das combinações C4, C5, C6 e C7 (diferem entre 1 a 3 aminoácidos) inclui isolados que pertencem a STs (ST16, ST18, ST132, ST280, ST460) distintos entre si num único alelo (*ddl* ou *gyd*), sendo que essas diferenças se manifestam maioritariamente pela alteração de uma base nucleotídica (ex: *gyd* de ST18 vs ST132/ST460; *ddl* de ST18 vs ST16) (*eBURST V3* n.d.)

Se compararmos os isolados que possuem a plataforma II com aqueles que possuem a plataforma III (que parece evoluir da II) verifica-se que os isolados desta última pertencem a STs que mais uma vez diferem de ST18 em apenas um nucleótido (alelo *gyd* (ST132) ou *ddl* (ST368) e cuja combinação de aminoácidos C8 apenas difere da C7 (plataforma II) em um único aminoácido localizado na posição 405. A combinação C7, a única partilhada entre duas plataformas (I e II), é também detetada apenas em *E. faecium* de ST18 (plataforma I e II) e ST132 (plataforma II).

A semelhança do conteúdo em IS com IRs intactas, do seu posicionamento nucleotídico, das combinações aminoacídicas e dos STs sugere uma evolução recente das plataformas II e III. A expansão clonal de *E. faecium* com estas plataformas associada à sua capacidade de mobilização horizontal pode facilitar a dispersão da resistência à ampicilina e justificar o elevado número de isolados em que foram encontradas. A evolução de *pbp5* juntamente com outros genes que codificam para proteínas da parede celular e de superfície presentes no genoma de *E. faecium* foi também recentemente proposta (Galloway-Pena, Rice & Murray 2011).

Em contraste, as plataformas I e IV estão localizadas em *E. faecium* que pertencem a STs com maiores diferenças evolutivas, que não transferem *pbp5* (plataforma IV) e que, de um modo geral, incluem isolados com maiores variações nas combinações de alterações aminoacídicas. Sendo a plataforma I possivelmente a forma mais ancestral, pode refletir um processo evolutivo mais antigo justificando os resultados encontrados. No entanto, a manutenção dos limites de *ISEfI* da plataforma IV sugere uma aquisição recente para esta IS. Ao contrário de *ISEfmI* e *ISEfalI* que se posicionam no mesmo nucleótido das plataformas móveis II e III, *ISEfI* insere-se em diferentes posições nucleotídicas da plataforma não transferível IV, refletindo possivelmente uma aquisição independente desta IS por diferentes variantes da plataforma I.

VI. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo documentam a transferência frequente de largos fragmentos de DNA portadores do gene *pbp5* (que confere resistência à ampicilina) entre *E. faecium* nosocomiais e da comunidade pertencentes a CC17 e *E. faecium* não CC17. A sua evolução pode ser independente ou acompanhar a das plataformas ou de outros genes do genoma de *E. faecium* em que estão inseridos, levando à existência de vários polimorfismos, ambientes genéticos que flanqueiam o *pbp5* e linhagens genéticas em que estão inseridos.

A manutenção do elemento adquirido na ausência de pressão seletiva e a sua transferência sob concentrações subinibitórias de ampicilina pode explicar a rápida expansão da resistência a este antibiótico entre *E. faecium* nosocomiais ao longo das últimas décadas. Para a melhor compreensão deste fenómeno, a identificação e caracterização dos elementos genéticos e dos fatores que promovem a mobilização mais fácil das plataformas portadoras de *pbp5* é fundamental.

O uso de ampicilina pode também ter facilitado a transferência de outros elementos genéticos portadores de genes que codificam para a resistência a diferentes classes de antibióticos, contribuindo desta forma para o aumento do *fitness* e evolução do CC17 em diferentes nichos.

VII. BIBLIOGRAFIA

Aarestrup, FM 2000, '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', *J Clin Microbiol*, vol. 38, no. 7, pp. 2774-7.

Aarestrup, FM, Agerso, Y, Gerner-Smidt, P, Madsen, M & Jensen, LB 2000, 'Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark', *Diagn Microbiol Infect Dis*, vol. 37, no. 2, pp. 127-37.

Agerso, Y, Pedersen, AG & Aarestrup, FM 2006, 'Identification of Tn5397-like and Tn916-like transposons and diversity of the tetracycline resistance gene *tet(M)* in enterococci from humans, pigs and poultry', *J Antimicrob Chemother*, vol. 57, no. 5, pp. 832-9.

Arduino, RC, Murray, BE & Rakita, RM 1994, 'Roles of antibodies and complement in phagocytic killing of enterococci', *Infect Immun*, vol. 62, no. 3, pp. 987-93.

Arias, CA, Torres, HA, Singh, KV, Panesso, D, Moore, J, Wanger, A & Murray, BE 2007, 'Failure of daptomycin monotherapy 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', *Clin Infect Dis*, vol. 45, no. 10, pp. 1343-6.

Arias, CA, Panesso, D, Singh, KV, Rice, LB & Murray, BE 2009, 'Cotransfer of antibiotic resistance genes and a *hylEfm*-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 53, no. 10, pp. 4240-6.

Arias, CA, Contreras, GA & Murray, BE 2010, 'Management of multidrug-resistant enterococcal infections', *Clin Microbiol Infect*, vol. 16, no. 6, pp. 555-62.

Arthur, M, Molinas, C, Depardieu, F & Courvalin, P 1993, 'Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147', *J Bacteriol*, vol. 175, no. 1, pp. 117-27.

Arvanitidou, M, Katsouyannopoulos, V & Tsakris, A 2001, 'Antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from coastal bathing waters', *J Med Microbiol*, vol. 50, no. 11, pp. 1001-5.

Banai, M & LeBlanc, DJ 1984, '*Streptococcus faecalis* R plasmid pJH1 contains an erythromycin resistance transposon (Tn3871) similar to transposon Tn917', *J Bacteriol*, vol. 158, no. 3, pp. 1172-4.

Barrangou, R, Fremaux, C, Deveau, H, Richards, M, Boyaval, P, Moineau, S, Romero, DA & Horvath, P 2007, 'CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes', *Science*, vol. 315, no. 5819, pp. 1709-12.

Barton, MD 2000, 'Antibiotic use in animal feed and its impact on human health', *Nutr Res Rev*, vol. 13, no. 2, pp. 279-99.

Bell, J, Turnidge, J, Coombs, G & O'Brien, F 1998, 'Emergence and epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in Australia', *Commun Dis Intell*, vol. 22, no. 11, pp. 249-52.

Beres, SB & Musser, JM 2007, 'Contribution of exogenous genetic elements to the group A *Streptococcus* metagenome', *PLoS One*, vol. 2, no. 8, p. e800.

Bolotin, A, Quinquis, B, Sorokin, A & Ehrlich, SD 2005, 'Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin', *Microbiology*, vol. 151, no. Pt 8, pp. 2551-61.

Bonafede, ME, Carias, LL & Rice, LB 1997, 'Enterococcal transposon Tn5384: evolution of a composite transposon through cointegration of enterococcal and staphylococcal plasmids', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 41, no. 9, pp. 1854-8.

Bonora, MG, Ligozzi, M, Luzzani, A, Solbiati, M, Stepan, E & Fontana, R 2006, 'Emergence of linezolid resistance in *Enterococcus faecium* not dependent on linezolid treatment', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, vol. 25, no. 3, pp. 197-8.

Bonora, MG, Oliosio, D, Lo Cascio, G & Fontana, R 2007, 'Phylogenetic analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* genotypes associated with outbreaks or sporadic infections in Italy', *Microb Drug Resist*, vol. 13, no. 3, pp. 171-7.

Bonten, MJ, Willems, R & Weinstein, RA 2001, 'Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from?', *Lancet Infect Dis*, vol. 1, no. 5, pp. 314-25.

Bourgogne, A, Garsin, DA, Qin, X, Singh, KV, Sillanpaa, J, Yerrapragada, S, Ding, Y, Dugan-Rocha, S, Buhay, C, Shen, H, Chen, G, Williams, G, Muzny, D, Maadani, A, Fox, KA, Gioia, J, Chen, L, Shang, Y, Arias, CA, Nallapareddy, SR, Zhao, M, Prakash, VP, Chowdhury, S, Jiang, H, Gibbs, RA, Murray, BE, Highlander, SK & Weinstock, GM 2008, 'Large scale variation in *Enterococcus faecalis* illustrated by the genome analysis of strain OG1RF', *Genome Biol*, vol. 9, no. 7, p. R110.

Boyd, DA, Conly, J, Dedier, H, Peters, G, Robertson, L, Slater, E & Mulvey, MR 2000, 'Molecular characterization of the *vanD* gene cluster and a novel insertion element in a vancomycin-resistant enterococcus isolated in Canada', *J Clin Microbiol*, vol. 38, no. 6, pp. 2392-4.

Britannica, E. Available from:
<<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/190204/episome>>. [Visualizado em dezembro de 2011].

Brochet, M, Couve, E, Glaser, P, Guedon, G & Payot, S 2008, 'Integrative conjugative elements and related elements are major contributors to the genome diversity of *Streptococcus agalactiae*', *J Bacteriol*, vol. 190, no. 20, pp. 6913-7.

Brouns, SJ, Jore, MM, Lundgren, M, Westra, ER, Slijkhuis, RJ, Snijders, AP, Dickman, MJ, Makarova, KS, Koonin, EV & van der Oost, J 2008, 'Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes', *Science*, vol. 321, no. 5891, pp. 960-4.

Brown, AR, Townsley, AC & Amyes, SG 2001, 'Diversity of Tn1546 elements in clinical isolates of glycopeptide-resistant enterococci from Scottish hospitals', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 45, no. 4, pp. 1309-11.

Camargo, IL, Zanella, RC, Brandileone, MC, Pignatari, AC, Goldman, GH, Woodford, N & Darini, AL 2005, 'Occurrence of insertion sequences within the genomes and Tn1546-like elements of glycopeptide-resistant enterococci isolated in Brazil, and identification of a novel element, ISEfa5', *Int J Med Microbiol*, vol. 294, no. 8, pp. 513-9.

Carias, LL, Rudin, SD, Donskey, CJ & Rice, LB 1998, 'Genetic linkage and cotransfer of a novel, *vanB*-containing transposon (Tn5382) and a low-affinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolate', *J Bacteriol*, vol. 180, no. 17, pp. 4426-34.

Carrier, C & Courvalin, P 1990, 'Emergence of 4',4"-aminoglycoside nucleotidyltransferase in enterococci', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 34, no. 8, pp. 1565-9.

Casey, J, Daly, C & Fitzgerald, GF 1991, 'Chromosomal integration of plasmid DNA by homologous recombination in *Enterococcus faecalis* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* hosts harboring Tn919', *Appl Environ Microbiol*, vol. 57, no. 9, pp. 2677-82.

Chen, YG, Qu, TT, Yu, YS, Zhou, JY & Li, LJ 2006, 'Insertion sequence ISEcp1-like element connected with a novel *aph(2")* allele [*aph(2")*-Ie] conferring high-level gentamicin resistance and a novel streptomycin adenylyltransferase gene in *Enterococcus*', *J Med Microbiol*, vol. 55, no. Pt 11, pp. 1521-5.

Chouchani, C, Salabi, AE, Marrakchi, R, Ferchichi, L & Walsh, TR 2011, 'First report of *mefA* and *msrA/msrB* multidrug efflux pumps associated with *bla*(TEM-1) beta-lactamase in *Enterococcus faecalis*', *Int J Infect Dis*.

Chromas. Available from: <<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>>. [Visualizado em setembro de 2010].

Clewell, DB, Yagi, Y, Dunny, GM & Schultz, SK 1974, 'Characterization of three plasmid deoxyribonucleic acid molecules in a strain of *Streptococcus faecalis*: identification of a plasmid determining erythromycin resistance', *J Bacteriol*, vol. 117, no. 1, pp. 283-9.

Clewell, DB, An, FY, White, BA & Gawron-Burke, C 1985, '*Streptococcus faecalis* sex pheromone (cAM373) also produced by *Staphylococcus aureus* and identification of a conjugative transposon (Tn918)', *J Bacteriol*, vol. 162, no. 3, pp. 1212-20.

CLSI 2010, *Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing*, Clinical and Laboratory Standards Institute., Wayne, USA.

ClustalW2, *Multiple Sequence Alignment*. Available from: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>. [Visualizado em setembro de 2010].

Coburn, PS, Baghdayan, AS, Dolan, GT & Shankar, N 2007, 'Horizontal transfer of virulence genes encoded on the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island', *Mol Microbiol*, vol. 63, no. 2, pp. 530-44.

Coburn, PS, Baghdayan, AS, Craig, N, Burroughs, A, Tendolkar, P, Miller, K, Najjar, FZ, Roe, BA & Shankar, N 2010, 'A novel conjugative plasmid from *Enterococcus faecalis* E99 enhances resistance to ultraviolet radiation', *Plasmid*, vol. 64, no. 1, pp. 18-25.

Cole, ST, Eiglmeier, K, Parkhill, J, James, KD, Thomson, NR, Wheeler, PR, Honore, N, Garnier, T, Churcher, C, Harris, D, Mungall, K, Basham, D, Brown, D, Chillingworth, T, Connor, R, Davies, RM, Devlin, K, Duthoy, S, Feltwell, T, Fraser, A, Hamlin, N, Holroyd, S, Hornsby, T, Jagels, K, Lacroix, C, Maclean, J, Moule, S, Murphy, L, Oliver, K, Quail, MA, Rajandream, MA, Rutherford, KM, Rutter, S, Seeger, K, Simon, S, Simmonds, M, Skelton, J, Squares, R, Squares, S, Stevens, K, Taylor, K, Whitehead, S, Woodward, JR & Barrell, BG 2001, 'Massive gene decay in the leprosy bacillus', *Nature*, vol. 409, no. 6823, pp. 1007-11.

Comenge, Y, Quintiliani, R, Jr., Li, L, Dubost, L, Brouard, JP, Hugonnet, JE & Arthur, M 2003, 'The CroRS two-component regulatory system is required for intrinsic beta-lactam resistance in *Enterococcus faecalis*', *J Bacteriol*, vol. 185, no. 24, pp. 7184-92.

Coque, TM, Willems, R, Canton, R, Del Campo, R & Baquero, F 2002, 'High occurrence of esp among ampicillin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* clones from hospitalized patients', *J Antimicrob Chemother*, vol. 50, no. 6, pp. 1035-8.

Coudron, PE, Markowitz, SM & Wong, ES 1992, 'Isolation of a beta-lactamase-producing, aminoglycoside-resistant strain of *Enterococcus faecium*', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 36, no. 5, pp. 1125-6.

Dahl, KH, Simonsen, GS, Olsvik, O & Sundsfjord, A 1999, 'Heterogeneity in the *vanB* gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 43, no. 5, pp. 1105-10.

Dahl, KH, Lundblad, EW, Rokenes, TP, Olsvik, O & Sundsfjord, A 2000a, 'Genetic linkage of the *vanB2* gene cluster to Tn5382 in vancomycin-resistant enterococci and characterization of two novel insertion sequences', *Microbiology*, vol. 146 (Pt 6), no. 6, pp. 1469-79.

Dahl, KH, Lundblad, EW, Rokenes, TP, Olsvik, O & Sundsfjord, A 2000b, 'Genetic linkage of the *vanB2* gene cluster to Tn5382 in vancomycin-resistant enterococci and characterization of two novel insertion sequences', *Microbiology*, vol. 146 (Pt 6), pp. 1469-79.

De Boever, EH, Clewell, DB & Fraser, CM 2000, '*Enterococcus faecalis* conjugative plasmid pAM373: complete nucleotide sequence and genetic analyses of sex pheromone response', *Mol Microbiol*, vol. 37, no. 6, pp. 1327-41.

de Fatima Silva Lopes, M, Ribeiro, T, Abrantes, M, Figueiredo Marques, JJ, Tenreiro, R & Crespo, MT 2005, 'Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci', *Int J Food Microbiol*, vol. 103, no. 2, pp. 191-8.

de Kraker, M & van de Sande-Bruinsma, N 2007, 'Trends in antimicrobial resistance in Europe: update of EARSS results', *Euro Surveill*, vol. 12, no. 3, p. E070315 3.

De Leener, E, Martel, A, Decostere, A & Haesebrouck, F 2004, 'Distribution of the *erm* (B) gene, tetracycline resistance genes, and Tn1545-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans', *Microb Drug Resist*, vol. 10, no. 4, pp. 341-5.

Derbise, A, de Cespedes, G & el Solh, N 1997, 'Nucleotide sequence of the *Staphylococcus aureus* transposon, Tn5405, carrying aminoglycosides resistance genes', *J Basic Microbiol*, vol. 37, no. 5, pp. 379-84.

Doherty, N, Trzcinski, K, Pickerill, P, Zawadzki, P & Dowson, CG 2000, 'Genetic diversity of the *tet*(M) gene in tetracycline-resistant clonal lineages of *Streptococcus pneumoniae*', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 44, no. 11, pp. 2979-84.

Donabedian, SM, Thal, LA, Hershberger, E, Perri, MB, Chow, JW, Bartlett, P, Jones, R, Joyce, K, Rossiter, S, Gay, K, Johnson, J, Mackinson, C, Debess, E, Madden, J, Angulo, F & Zervos, MJ 2003, 'Molecular characterization of gentamicin-resistant Enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food', *J Clin Microbiol*, vol. 41, no. 3, pp. 1109-13.

Donabedian, SM, Perri, MB, Abdujamilova, N, Gordoncillo, MJ, Naqvi, A, Reyes, KC, Zervos, MJ & Bartlett, P 2010, 'Characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from swine in three Michigan counties', *J Clin Microbiol*, vol. 48, no. 11, pp. 4156-60.

Duez, C, Zorzi, W, Sapunarcic, F, Amoroso, A, Thamm, I & Coyette, J 2001, 'The penicillin resistance of *Enterococcus faecalis* JH2-2r results from an overproduction of the low-affinity penicillin-binding protein PBP4 and does not involve a *psr*-like gene', *Microbiology*, vol. 147, no. Pt 9, pp. 2561-9.

Eagle, H 1951, 'Further observations on the zone phenomenon in the bactericidal action of penicillin', *J Bacteriol*, vol. 62, no. 5, pp. 663-8.

eBURST V3, 16/02/2006. Available from: <<http://eburst.mlst.net/>>. [Visualizada em julho de 2010].

el Kharroubi, A, Jacques, P, Piras, G, Van Beeumen, J, Coyette, J & Ghuyesen, JM 1991, 'The *Enterococcus hirae* R40 penicillin-binding protein 5 and the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* penicillin-binding protein 2' are similar', *Biochem J*, vol. 280 (Pt 2), pp. 463-9.

Eliopoulos, GM, Wennersten, C & Moellering, RC, Jr. 1982, 'Resistance to beta-lactam antibiotics in *Streptococcus faecium*', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 22, no. 2, pp. 295-301.

Emilia, C 2011, 'Enterococcus: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España', *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 29, Supplement 5, no. 0, pp. 59-65.

Euzéby, JP, n.d., *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus Enterococcus*. Available from: <<http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>>.

Feizabadi, MM, Shokrzadeh, L, Sayady, S & Asadi, S 2008, 'Transposon Tn5281 is the main distributor of the aminoglycoside modifying enzyme gene among isolates of *Enterococcus faecalis* in Tehran hospitals', *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 54, no. 10, pp. 887-890. [2011/12/03].

Feldgarden, M, Byrd, N & Cohan, FM 2003, 'Gradual evolution in bacteria: evidence from *Bacillus* systematics', *Microbiology*, vol. 149, no. Pt 12, pp. 3565-73.

Fisher, JF, Meroueh, SO & Mobashery, S 2005, 'Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity', *Chem Rev*, vol. 105, no. 2, pp. 395-424.

Fisher, K & Phillips, C 2009, 'The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*', *Microbiology*, vol. 155, no. Pt 6, pp. 1749-57.

Flahaut, S, Frere, J, Boutibonnes, P & Auffray, Y 1996, 'Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis*', *Appl Environ Microbiol*, vol. 62, no. 7, pp. 2416-20.

Flannagan, SE, Chow, JW, Donabedian, SM, Brown, WJ, Perri, MB, Zervos, MJ, Ozawa, Y & Clewell, DB 2003, 'Plasmid content of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolate from a patient also colonized by *Staphylococcus aureus* with a *VanA* phenotype', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 47, no. 12, pp. 3954-9.

Fletcher, HM, Marri, L & Daneo-Moore, L 1989, 'Transposon-916-like elements in clinical isolates of *Enterococcus faecium*', *J Gen Microbiol*, vol. 135, no. 11, pp. 3067-77.

Fontana, R, Cerini, R, Longoni, P, Grossato, A & Canepari, P 1983, 'Identification of a streptococcal penicillin-binding protein that reacts very slowly with penicillin', *J Bacteriol*, vol. 155, no. 3, pp. 1343-50.

Fontana, R, Grossato, A, Rossi, L, Cheng, YR & Satta, G 1985, 'Transition from resistance to hypersusceptibility to beta-lactam antibiotics associated with loss of a low-affinity penicillin-binding protein in a *Streptococcus faecium* mutant highly resistant to penicillin', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 28, no. 5, pp. 678-83.

Fontana, R, Canepari, P, Lleo, MM & Satta, G 1990, 'Mechanisms of resistance of enterococci to beta-lactam antibiotics', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, vol. 9, no. 2, pp. 103-5.

Fontana, R, Aldegheri, M, Ligozzi, M, Lopez, H, Sucari, A & Satta, G 1994, 'Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 38, no. 9, pp. 1980-3.

Foulquie Moreno, MR, Sarantinopoulos, P, Tsakalidou, E & De Vuyst, L 2006, 'The role and application of enterococci in food and health', *Int J Food Microbiol*, vol. 106, no. 1, pp. 1-24.

Francia, MV, Haas, W, Wirth, R, Samberger, E, Muscholl-Silberhorn, A, Gilmore, MS, Ike, Y, Weaver, KE, An, FY & Clewell, DB 2001, 'Completion of the nucleotide sequence of the *Enterococcus faecalis* conjugative virulence plasmid pAD1 and identification of a second transfer origin', *Plasmid*, vol. 46, no. 2, pp. 117-27.

Franke, AE & Clewell, DB 1981, 'Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid', *J Bacteriol*, vol. 145, no. 1, pp. 494-502.

Freitas, AR, Novais, C, Francia, MV, Peixe, L, Coque, TM 2009a, 'Plasmid analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from hospitals and aquatic environments in Portugal (1996-2008)', in *19th ECCMID*, In Clinical Microbiology and Infection, vol. 15, no. s4, pp. S213-S214, Helsinki, Finland.

Freitas, AR, Novais, C, Ruiz-Garbajosa, P, Coque, TM & Peixe, L 2009b, 'Dispersion of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* isolates belonging to major clonal complexes in different Portuguese settings', *Appl Environ Microbiol*, vol. 75, no. 14, pp. 4904-8.

Freitas, AR, Tedim, AP, Novais, C, Ruiz-Garbajosa, P, Werner, G, Laverde-Gomez, JA, Canton, R, Peixe, L, Baquero, F & Coque, TM 2010, 'Global spread of the *hyl*(Efm) colonization-virulence gene in megaplasms of the *Enterococcus faecium* CC17 polyclonal subcluster', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 54, no. 6, pp. 2660-5.

Freitas, AR, Coque, TM, Novais, C, Hammerum, AM, Lester, CH, Zervos, MJ, Donabedian, S, Jensen, LB, Francia, MV, Baquero, F & Peixe, L 2011a, 'Human and swine hosts share vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* CC17 and CC5 and *Enterococcus faecalis* CC2 clonal clusters harboring Tn1546 on indistinguishable plasmids', *J Clin Microbiol*, vol. 49, no. 3, pp. 925-31.

Freitas, AR, Novais, C, Correia, R, Monteiro, M, Coque, TM & Peixe, L 2011b, 'Non-susceptibility to tigecycline in enterococci from hospitalised patients, food products and community sources', *International journal of antimicrobial agents*, vol. 38, no. 2, pp. 174-176.

Galloway-Pena, J, Roh, JH, Latorre, M, Qin, X & Murray, BE 2012, 'Genomic and SNP Analyses Demonstrate a Distant Separation of the Hospital and Community-Associated Clades of *Enterococcus faecium*', *PLoS One*, vol. 7, no. 1, p. e30187.

Galloway-Pena, JR, Nallapareddy, SR, Arias, CA, Eliopoulos, GM & Murray, BE 2009, 'Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States', *J Infect Dis*, vol. 200, no. 10, pp. 1566-73.

Galloway-Pena, JR, Rice, LB & Murray, BE 2011, 'Analysis of PBP5 of early U.S. isolates of *Enterococcus faecium*: sequence variation alone does not explain increasing ampicillin resistance over time', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 55, no. 7, pp. 3272-7.

Gambarotto, K, Ploy, MC, Turlure, P, Grelaud, C, Martin, C, Bordessoule, D & Denis, F 2000, 'Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and nonhospitalized controls in a cattle-rearing area of France', *J Clin Microbiol*, vol. 38, no. 2, pp. 620-4.

Garneau, JE, Dupuis, ME, Villion, M, Romero, DA, Barrangou, R, Boyaval, P, Fremaux, C, Horvath, P, Magadan, AH & Moineau, S 2010, 'The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA', *Nature*, vol. 468, no. 7320, pp. 67-71.

Garnier, F, Taourit, S, Glaser, P, Courvalin, P & Galimand, M 2000, 'Characterization of transposon Tn1549, conferring *VanB*-type resistance in *Enterococcus* spp', *Microbiology*, vol. 146 (Pt 6), pp. 1481-9.

Georgopapadakou, NH 1993, 'Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to beta-lactams', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 37, no. 10, pp. 2045-53.

Gevers, D, Vandepoele, K, Simillon, C & Van de Peer, Y 2004, 'Gene duplication and biased functional retention of paralogs in bacterial genomes', *Trends Microbiol*, vol. 12, no. 4, pp. 148-54.

Goffin, C & Ghuysen, JM 1998, 'Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs', *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 62, no. 4, pp. 1079-93.

Grady, R & Hayes, F 2003, 'Axe-Txe, a broad-spectrum proteic toxin-antitoxin system specified by a multidrug-resistant, clinical isolate of *Enterococcus faecium*', *Mol Microbiol*, vol. 47, no. 5, pp. 1419-32.

Guardabassi, L, Bronnum, PT, Dano, R, Forslund, A & Dalsgaard, A 2002, 'Dissemination of vancomycin-resistant enterococci harboring *vanA* through disposal of waste derived from industrial production of vancomycin', *Microb Drug Resist*, vol. 8, no. 4, pp. 401-6.

Guardabassi, L, Schwarz, S & Lloyd, DH 2004, 'Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria', *J Antimicrob Chemother*, vol. 54, no. 2, pp. 321-32.

Hacker, J & Carniel, E 2001, 'Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes', *EMBO Rep*, vol. 2, no. 5, pp. 376-81.

Hancock, LE & Perego, M 2004, 'Systematic inactivation and phenotypic characterization of two-component signal transduction systems of *Enterococcus faecalis* V583', *J Bacteriol*, vol. 186, no. 23, pp. 7951-8.

Handwerger, S & Skoble, J 1995, 'Identification of chromosomal mobile element conferring high-level vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 39, no. 11, pp. 2446-53.

Hanrahan, J, Hoyen, C & Rice, LB 2000, 'Geographic distribution of a large mobile element that transfers ampicillin and vancomycin resistance between *Enterococcus faecium* strains', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 44, no. 5, pp. 1349-51.

Harwood, VJ, Brownell, M, Perusek, W & Whitlock, JE 2001, 'Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. isolated from wastewater and chicken feces in the United States', *Appl Environ Microbiol*, vol. 67, no. 10, pp. 4930-3.

Heaton, MP, Discotto, LF, Pucci, MJ & Handwerger, S 1996, 'Mobilization of vancomycin resistance by transposon-mediated fusion of a *VanA* plasmid with an *Enterococcus faecium* sex pheromone-response plasmid', *Gene*, vol. 171, no. 1, pp. 9-17.

Hegstad, K, Mikalsen, T, Coque, TM, Werner, G & Sundsfjord, A 2010, 'Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*', *Clin Microbiol Infect*, vol. 16, no. 6, pp. 541-54.

Heikens, E, van Schaik, W, Leavis, HL, Bonten, MJ & Willems, RJ 2008, 'Identification of a novel genomic island specific to hospital-acquired clonal complex 17 *Enterococcus faecium* isolates', *Appl Environ Microbiol*, vol. 74, no. 22, pp. 7094-7.

Hendrickx, AP, van Wamel, WJ, Posthuma, G, Bonten, MJ & Willems, RJ 2007, 'Five genes encoding surface-exposed LPXTG proteins are enriched in hospital-adapted *Enterococcus faecium* clonal complex 17 isolates', *J Bacteriol*, vol. 189, no. 22, pp. 8321-32.

Hendrickx, AP, Willems, RJ, Bonten, MJ & van Schaik, W 2009, 'LPxTG surface proteins of enterococci', *Trends Microbiol*, vol. 17, no. 9, pp. 423-30.

Herman, DJ & Gerding, DN 1991, 'Screening and treatment of infections caused by resistant enterococci', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 35, no. 2, pp. 215-9.

Hidron, AI, Edwards, JR, Patel, J, Horan, TC, Sievert, DM, Pollock, DA & Fridkin, SK 2008, 'NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007', *Infect Control Hosp Epidemiol*, vol. 29, no. 11, pp. 996-1011.

Hiraga, N, Muratani, T, Naito, S & Matsumoto, T 2008, 'Genetic Analysis of Faropenem-resistant *Enterococcus faecalis* in Urinary Isolates', *J Antibiot*, vol. 61, no. 4, pp. 213-221.

Hirt, H, Manias, DA, Bryan, EM, Klein, JR, Marklund, JK, Staddon, JH, Paustian, ML, Kapur, V & Dunny, GM 2005, 'Characterization of the pheromone response of the *Enterococcus faecalis* conjugative plasmid pCF10: complete sequence and comparative analysis of the transcriptional and phenotypic responses of pCF10-containing cells to pheromone induction', *J Bacteriol*, vol. 187, no. 3, pp. 1044-54.

Hodel-Christian, SL & Murray, BE 1991, 'Characterization of the gentamicin resistance transposon Tn5281 from *Enterococcus faecalis* and comparison to staphylococcal transposons Tn4001 and Tn4031', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 35, no. 6, pp. 1147-52.

Homan, WL, Tribe, D, Poznanski, S, Li, M, Hogg, G, Spalburg, E, Van Embden, JD & Willems, RJ 2002, 'Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*', *J Clin Microbiol*, vol. 40, no. 6, pp. 1963-71.

Horaud, T, Delbos, F & de Cespedes, G 1990, 'Tn3702, a conjugative transposon in *Enterococcus faecalis*', *FEMS Microbiol Lett*, vol. 60, no. 1-2, pp. 189-94.

Hsieh, SE, Hsu, LL, Hsu, WH, Chen, CY, Chen, HJ & Liao, CT 2006, 'Importance of amino acid alterations and expression of penicillin-binding protein 5 to ampicillin resistance of *Enterococcus faecium* in Taiwan', *Int J Antimicrob Agents*, vol. 28, no. 6, pp. 514-9.

Huh, JY, Lee, WG, Lee, K, Shin, WS & Yoo, JH 2004, 'Distribution of insertion sequences associated with Tn1546-like elements among *Enterococcus faecium* isolates from patients in Korea', *J Clin Microbiol*, vol. 42, no. 5, pp. 1897-902.

Ingerman, M, Pitsakis, PG, Rosenberg, A, Hessen, MT, Abrutyn, E, Murray, BE & Levison, ME 1987, 'beta-Lactamase production in experimental endocarditis due to aminoglycoside-resistant *Streptococcus faecalis*', *J Infect Dis*, vol. 155, no. 6, pp. 1226-32.

Iversen, A, Kuhn, I, Franklin, A & Mollby, R 2002, 'High prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Swedish sewage', *Appl Environ Microbiol*, vol. 68, no. 6, pp. 2838-42.

Iversen, A, Kuhn, I, Rahman, M, Franklin, A, Burman, LG, Olsson-Liljequist, B, Torell, E & Mollby, R 2004, 'Evidence for transmission between humans and the environment of a nosocomial strain of *Enterococcus faecium*', *Environ Microbiol*, vol. 6, no. 1, pp. 55-9.

Jett, BD, Huycke, MM & Gilmore, MS 1994, 'Virulence of enterococci', *Clin Microbiol Rev*, vol. 7, no. 4, pp. 462-78.

Johnston, LM & Jaykus, LA 2004, 'Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from produce', *Appl Environ Microbiol*, vol. 70, no. 5, pp. 3133-7.

Juhas, M, van der Meer, JR, Gaillard, M, Harding, RM, Hood, DW & Crook, DW 2009, 'Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution', *FEMS Microbiol Rev*, vol. 33, no. 2, pp. 376-93.

Jureen, R, Top, J, Mohn, SC, Harthug, S, Langeland, N & Willems, RJ 2003, 'Molecular characterization of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from hospitalized patients in Norway', *J Clin Microbiol*, vol. 41, no. 6, pp. 2330-6.

Jureen, R, Mohn, SC, Harthug, S, Haarr, L & Langeland, N 2004, 'Role of penicillin-binding protein 5 C-terminal amino acid substitutions in conferring ampicillin resistance in Norwegian clinical strains of *Enterococcus faecium*', *APMIS*, vol. 112, no. 4-5, pp. 291-8.

Kaufmann, ME 1998, 'Molecular bacteriology.', in *Methods in molecular medicine.*, Humana Press, Totowa, N.J edn, vol. 15, ed. INWWaAJ (ed.), pp. p. 33-50.

Khan, MA, van der Wal, M, Farrell, DJ, Cossins, L, van Belkum, A, Alaidan, A & Hays, JP 2008, 'Analysis of *VanA* vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Saudi Arabian hospitals reveals the presence of clonal cluster 17 and two new Tn1546 lineage types', *J Antimicrob Chemother*, vol. 62, no. 2, pp. 279-83.

Klare, I, Rodloff, AC, Wagner, J, Witte, W & Hakenbeck, R 1992, 'Overproduction of a penicillin-binding protein is not the only mechanism of penicillin resistance in *Enterococcus faecium*', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 36, no. 4, pp. 783-7.

Klare, I, Konstabel, C, Badstubner, D, Werner, G & Witte, W 2003, 'Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*', *Int J Food Microbiol*, vol. 88, no. 2-3, pp. 269-90.

Klare, I, Konstabel, C, Mueller-Bertling, S, Werner, G, Strommenger, B, Kettlitz, C, Borgmann, S, Schulte, B, Jonas, D, Serr, A, Fahr, AM, Eigner, U & Witte, W 2005, 'Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, vol. 24, no. 12, pp. 815-25.

Klein, G 2003, 'Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract', *Int J Food Microbiol*, vol. 88, no. 2-3, pp. 123-31.

Kristich, CJ, Wells, CL & Dunny, GM 2007, 'A eukaryotic-type Ser/Thr kinase in *Enterococcus faecalis* mediates antimicrobial resistance and intestinal persistence', *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 9, pp. 3508-13.

Kristich, CJ, Little, JL, Hall, CL & Hoff, JS 2011, 'Reciprocal regulation of cephalosporin resistance in *Enterococcus faecalis*', *MBio*, vol. 2, no. 6, pp. e00199-11.

Kummerer, K 2004, 'Resistance in the environment', *J Antimicrob Chemother*, vol. 54, no. 2, pp. 311-20.

Laverde Gomez, JA, Hendrickx, AP, Willems, RJ, Top, J, Sava, I, Huebner, J, Witte, W & Werner, G 2011a, 'Intra- and interspecies genomic transfer of the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island', *PLoS One*, vol. 6, no. 4, p. e16720.

Laverde Gomez, JA, van Schaik, W, Freitas, AR, Coque, TM, Weaver, KE, Francia, MV, Witte, W & Werner, G 2011b, 'A multiresistance megaplasmid pLG1 bearing a *hylEfm* genomic island in hospital *Enterococcus faecium* isolates', *Int J Med Microbiol*, vol. 301, no. 2, pp. 165-75.

Lawrence, JG & Ochman, H 2002, 'Reconciling the many faces of lateral gene transfer', *Trends Microbiol*, vol. 10, no. 1, pp. 1-4.

Leavis, H, Top, J, Shankar, N, Borgen, K, Bonten, M, van Embden, J & Willems, RJ 2004, 'A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity', *J Bacteriol*, vol. 186, no. 3, pp. 672-82.

Leavis, HL, Bonten, MJ & Willems, RJ 2006, 'Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance', *Curr Opin Microbiol*, vol. 9, no. 5, pp. 454-60.

Leavis, HL, Willems, RJ, van Wamel, WJ, Schuren, FH, Caspers, MP & Bonten, MJ 2007, 'Insertion sequence-driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faecium*', *PLoS Pathog*, vol. 3, no. 1, p. e7.

Lee, WG & Kim, W 2003, 'Identification of a novel insertion sequence in *vanB2*-containing *Enterococcus faecium*', *Lett Appl Microbiol*, vol. 36, no. 3, pp. 186-90.

Leelaporn, A, Yodkamol, K, Waywa, D & Pattanachaiwit, S 2008, 'A novel structure of Tn4001-truncated element, type V, in clinical enterococcal isolates and multiplex PCR for detecting aminoglycoside resistance genes', *Int J Antimicrob Agents*, vol. 31, no. 3, pp. 250-4.

Ligozzi, M, Pittaluga, F & Fontana, R 1993, 'Identification of a genetic element (*psr*) which negatively controls expression of *Enterococcus hirae* penicillin-binding protein 5', *J Bacteriol*, vol. 175, no. 7, pp. 2046-51.

Ligozzi, M, Pittaluga, F & Fontana, R 1996, 'Modification of penicillin-binding protein 5 associated with high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 40, no. 2, pp. 354-7.

Liu, Y, Cao, B, Gu, L, Liu, K & Feng, Z 2011, 'Successful control of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* nosocomial outbreak in a teaching hospital in China', *Am J Infect Control*.

Lopez, M, Hormazabal, JC, Maldonado, A, Saavedra, G, Baquero, F, Silva, J, Torres, C & del Campo, R 2009a, 'Clonal dissemination of *Enterococcus faecalis* ST201 and *Enterococcus faecium* CC17-ST64 containing Tn5382-*vanB2* among 16 hospitals in Chile', *Clin Microbiol Infect*, vol. 15, no. 6, pp. 586-8.

Lopez, M, Saenz, Y, Rojo-Bezares, B, Martinez, S, del Campo, R, Ruiz-Larrea, F, Zarazaga, M & Torres, C 2009b, 'Detection of *vanA* and *vanB2*-containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425', *Int J Food Microbiol*, vol. 133, no. 1-2, pp. 172-8.

Lopez, M, Saenz, Y, Alvarez-Martinez, MJ, Marco, F, Robredo, B, Rojo-Bezares, B, Ruiz-Larrea, F, Zarazaga, M & Torres, C 2010, 'Tn1546 structures and multilocus sequence typing of *vanA*-containing enterococci of animal, human and food origin', *J Antimicrob Chemother*, vol. 65, no. 8, pp. 1570-5.

Lopez, M, Rezusta, A, Seral, C, Aspiroz, C, Marne, C, Aldea, MJ, Ferrer, I, Revillo, MJ, Castillo, FJ & Torres, C 2011, 'Detection and characterization of a ST6 clone of *vanB2-Enterococcus faecalis* from three different hospitals in Spain', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.

Lu, JJ, Chang, TY, Perng, CL & Lee, SY 2005, 'The *vanB2* gene cluster of the majority of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Taiwan is associated with the *pbp5* gene and is carried by Tn5382 containing a novel insertion sequence', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 49, no. 9, pp. 3937-9.

Lyras, D, Storie, C, Huggins, AS, Crellin, PK, Bannam, TL & Rood, JI 1998, 'Chloramphenicol resistance in *Clostridium difficile* is encoded on Tn4453 transposons that are closely related to Tn4451 from *Clostridium perfringens*', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 42, no. 7, pp. 1563-7.

Macedo, AS, Freitas, AR, Abreu, C, Machado, E, Peixe, L, Sousa, JC & Novais, C 2011, 'Characterization of antibiotic resistant enterococci isolated from untreated waters for human consumption in Portugal', *Int J Food Microbiol*, vol. 145, no. 1, pp. 315-9.

Malani P., K, M. Zervos. 2002, "Enterococcal disease, epidemiology and treatment. ", in *The enterococci-pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance.*, ed. IMG edn, Washington DC.

Maniatis, AN, Pournaras, S, Kanellopoulou, M, Kontos, F, Dimitroulia, E, Papafrangas, E & Tsakris, A 2001, 'Dissemination of clonally unrelated erythromycin- and glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolates in a tertiary Greek hospital', *J Clin Microbiol*, vol. 39, no. 12, pp. 4571-4.

Manson, JM, Hancock, LE & Gilmore, MS 2010, 'Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits', *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 27, pp. 12269-74.

Marraffini, LA & Sontheimer, EJ 2008, 'CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA', *Science*, vol. 322, no. 5909, pp. 1843-5.

Maruyama, F, Kobata, M, Kurokawa, K, Nishida, K, Sakurai, A, Nakano, K, Nomura, R, Kawabata, S, Ooshima, T, Nakai, K, Hattori, M, Hamada, S & Nakagawa, I 2009, 'Comparative genomic analyses of *Streptococcus mutans* provide insights into chromosomal shuffling and species-specific content', *BMC Genomics*, vol. 10, p. 358.

Massidda, O, Dardenne, O, Whalen, MB, Zorzi, W, Coyette, J, Shockman, GD & Daneo-Moore, L 1998, 'The PBP 5 synthesis repressor (*psr*) gene of *Enterococcus hirae* ATCC 9790 is substantially longer than previously reported', *FEMS Microbiol Lett*, vol. 166, no. 2, pp. 355-60.

Matsushima, A, Takakura, S, Yamamoto, M, Matsumura, Y, Shirano, M, Nagao, M, Ito, Y, Iinuma, Y, Shimizu, T, Fujita, N & Ichiyama, S 2011, 'Regional spread and control of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in Kyoto, Japan', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.

Mazaheri Nezhad Fard, R, Barton, MD & Heuzenroeder, MW 2011, 'Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci', *Letters in Applied Microbiology*, vol. 52, no. 6, pp. 559-564.

McBride, SM, Coburn, PS, Baghdayan, AS, Willems, RJ, Grande, MJ, Shankar, N & Gilmore, MS 2009, 'Genetic variation and evolution of the pathogenicity island of *Enterococcus faecalis*', *J Bacteriol*, vol. 191, no. 10, pp. 3392-402.

Mondino, SS, Castro, AC, Mondino, PJ, Carvalho Mda, G, Silva, KM & Teixeira, LM 2003, 'Phenotypic and genotypic characterization of clinical and intestinal enterococci isolated from inpatients and outpatients in two Brazilian hospitals', *Microb Drug Resist*, vol. 9, no. 2, pp. 167-74.

Montero, CI, Stock, F & Murray, PR 2008, 'Mechanisms of resistance to daptomycin in *Enterococcus faecium*', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 52, no. 3, pp. 1167-70.

Morrison, D, Woodford, N, Barrett, SP, Sisson, P & Cookson, BD 1999, 'DNA banding pattern polymorphism in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and criteria for defining strains', *J Clin Microbiol*, vol. 37, no. 4, pp. 1084-91.

Murray, BE & Mederski-Samaroj, B 1983, 'Transferable beta-lactamase. A new mechanism for in vitro penicillin resistance in *Streptococcus faecalis*', *J Clin Invest*, vol. 72, no. 3, pp. 1168-71.

Murray, BE 1992, 'Beta-lactamase-producing enterococci', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 36, no. 11, pp. 2355-9.

Murray, BE, Lopardo, HA, Rubeglio, EA, Frosolono, M & Singh, KV 1992, 'Intrahospital spread of a single gentamicin-resistant, beta-lactamase-producing strain of *Enterococcus faecalis* in Argentina', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 36, no. 1, pp. 230-2.

Nallapareddy, SR, Sillanpaa, J, Ganesh, VK, Hook, M & Murray, BE 2007, 'Inhibition of *Enterococcus faecium* adherence to collagen by antibodies against high-affinity binding subdomains of Acm', *Infect Immun*, vol. 75, no. 6, pp. 3192-6.

Nallapareddy, SR, Singh, KV, Okhuysen, PC & Murray, BE 2008, 'A functional collagen adhesin gene, *acm*, in clinical isolates of *Enterococcus faecium* correlates with the recent success of this emerging nosocomial pathogen', *Infect Immun*, vol. 76, no. 9, pp. 4110-9.

NCBI. Available from: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. [Visualizado em novembro de 2010].

NEBcutter V2.0. Available from: <<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>>. [Visualizado em setembro de 2010].

Nigutova, K, Styriak, I, Javorsky, P & Pristas, P 2008, 'Partial characterization of *Enterococcus faecalis* bacteriophage F4', *Folia Microbiol (Praha)*, vol. 53, no. 3, pp. 234-6.

Novais, C, Coque, TM, Sousa, JC, Baquero, F & Peixe, L 2004, 'Local genetic patterns within a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* clone isolated in three hospitals in Portugal', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 48, no. 9, pp. 3613-7.

Novais, C, Coque, TM, Ferreira, H, Sousa, JC & Peixe, L 2005, 'Environmental contamination with vancomycin-resistant enterococci from hospital sewage in Portugal', *Appl Environ Microbiol*, vol. 71, no. 6, pp. 3364-8.

Novais, C, Coque, TM, Sousa, JC & Peixe, LV 2006, 'Antimicrobial resistance among faecal enterococci from healthy individuals in Portugal', *Clin Microbiol Infect*, vol. 12, no. 11, pp. 1131-4.

Novais, C, Freitas, AR, Sousa, JC, Baquero, F, Coque, TM & Peixe, LV 2008, 'Diversity of Tn1546 and its role in the dissemination of vancomycin-resistant enterococci in Portugal', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 52, no. 3, pp. 1001-8.

Novais, C, Freitas, AR, Francia, MV, Peixe, L, Baquero, F & Coque, TM 2009, 'Characterization of Gram-positive conjugative transposons among international epidemic vancomycin-resistant isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*.', *Congr. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* .

Oancea, C, Klare, I, Witte, W & Werner, G 2004, 'Conjugative transfer of the virulence gene, *esp*, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*', *J Antimicrob Chemother*, vol. 54, no. 1, pp. 232-5.

Ono, S, Muratani, T & Matsumoto, T 2005, 'Mechanisms of resistance to imipenem and ampicillin in *Enterococcus faecalis*', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 49, no. 7, pp. 2954-8.

Palazzo, IC, Pitondo-Silva, A, Levy, CE & da Costa Darini, AL 2011, 'Changes in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing outbreaks in Brazil', *J Hosp Infect*, vol. 79, no. 1, pp. 70-4.

Palmer, KL, Carniol, K, Manson, JM, Heiman, D, Shea, T, Young, S, Zeng, Q, Gevers, D, Feldgarden, M, Birren, B & Gilmore, MS 2010, 'High-quality draft genome sequences of 28 *Enterococcus* sp. isolates', *J Bacteriol*, vol. 192, no. 9, pp. 2469-70.

Palmer, KL & Gilmore, MS 2010, 'Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-*cas*', *MBio*, vol. 1, no. 4.

Palmer, KL, Kos, VN & Gilmore, MS 2010, 'Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance', *Curr Opin Microbiol*, vol. 13, no. 5, pp. 632-9.

Patterson, JE, Colodny, SM & Zervos, MJ 1988, 'Serious infection due to beta-lactamase-producing *Streptococcus faecalis* with high-level resistance to gentamicin', *J Infect Dis*, vol. 158, no. 5, pp. 1144-5.

Patterson, JE, Masecar, BL & Zervos, MJ 1988, 'Characterization and comparison of two penicillinase-producing strains of *Streptococcus (Enterococcus) faecalis*', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 32, no. 1, pp. 122-4.

Patterson, JE, Wanger, A, Zscheck, KK, Zervos, MJ & Murray, BE 1990, 'Molecular epidemiology of beta-lactamase-producing enterococci', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 34, no. 2, pp. 302-5.

Paulsen, IT, Banerjee, L, Myers, GS, Nelson, KE, Seshadri, R, Read, TD, Fouts, DE, Eisen, JA, Gill, SR, Heidelberg, JF, Tettelin, H, Dodson, RJ, Umayam, L, Brinkac, L, Beanan, M, Daugherty, S, DeBoy, RT, 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, KA, Dougherty, BA & Fraser, CM 2003, 'Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*', *Science*, vol. 299, no. 5615, pp. 2071-4.

Piras, G, Raze, D, el Kharroubi, A, Hastir, D, Englebert, S, Coyette, J & Ghuysen, JM 1993, 'Cloning and sequencing of the low-affinity penicillin-binding protein 3r-encoding gene of *Enterococcus hirae* S185: modular design and structural organization of the protein', *J Bacteriol*, vol. 175, no. 10, pp. 2844-52.

Poeta, P, Costa, D, Igrejas, G, Rodrigues, J & Torres, C 2007a, 'Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in faecal enterococci from wild boars (*Sus scrofa*)', *Vet Microbiol*, vol. 125, no. 3-4, pp. 368-74.

Poeta, P, Costa, D, Igrejas, G, Saenz, Y, Zarazaga, M, Rodrigues, J & Torres, C 2007b, 'Polymorphisms of the *pbp5* gene and correlation with ampicillin resistance in *Enterococcus faecium* isolates of animal origin', *J Med Microbiol*, vol. 56, no. Pt 2, pp. 236-40.

Poyart-Salmeron, C, Trieu-Cuot, P, Carlier, C & Courvalin, P 1989, 'Molecular characterization of two proteins involved in the excision of the conjugative transposon Tn1545: homologies with other site-specific recombinases', *EMBO J*, vol. 8, no. 8, pp. 2425-33.

Quednau, M, Ahrne, S, Petersson, AC & Molin, G 1998, 'Antibiotic-resistant strains of *Enterococcus* isolated from Swedish and Danish retailed chicken and pork', *J Appl Microbiol*, vol. 84, no. 6, pp. 1163-70.

Quinteira, S, Novais, C, Antunes, P, Campos, AR, Freitas, AR, Abdulkadir, A, Monteiro, N & Peixe, L 2011, 'Tracking antibiotic resistance along the Silk Road', in *21st ECCMID/27th ICC conference.*, In *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 17, no. s4, pp. S58-S59, Milan, Italy.

Quintiliani, R, Jr. & Courvalin, P 1996, 'Characterization of Tn1547, a composite transposon flanked by the IS16 and IS256-like elements, that confers vancomycin resistance in *Enterococcus faecalis* BM4281', *Gene*, vol. 172, no. 1, pp. 1-8.

Raze, D, Dardenne, O, Hallut, S, Martinez-Bueno, M, Coyette, J & Ghuysen, JM 1998, 'The gene encoding the low-affinity penicillin-binding protein 3r in *Enterococcus hirae* S185R is borne on a plasmid carrying other antibiotic resistance determinants', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 42, no. 3, pp. 534-9.

Rice, LB, Eliopoulos, GM, Wennersten, C, Goldmann, D, Jacoby, GA & Moellering, RC, Jr. 1991, 'Chromosomally mediated beta-lactamase production and gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis*', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 35, no. 2, pp. 272-6.

Rice, LB & Marshall, SH 1992, 'Evidence of incorporation of the chromosomal beta-lactamase gene of *Enterococcus faecalis* CH19 into a transposon derived from staphylococci', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 36, no. 9, pp. 1843-6.

Rice, LB, Marshall, SH & Carias, LL 1992, 'Tn5381, a conjugative transposon identifiable as a circular form in *Enterococcus faecalis*', *J Bacteriol*, vol. 174, no. 22, pp. 7308-15.

Rice, LB & Marshall, SH 1994, 'Insertions of IS256-like element flanking the chromosomal beta-lactamase gene of *Enterococcus faecalis* CX19', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 38, no. 4, pp. 693-701.

Rice, LB, Carias, LL, Marshall, SH & Bonafede, ME 1996, 'Sequences found on staphylococcal beta-lactamase plasmids integrated into the chromosome of *Enterococcus faecalis* CH116', *Plasmid*, vol. 35, no. 2, pp. 81-90.

Rice, LB & Carias, LL 1998, 'Transfer of Tn5385, a composite, multiresistance chromosomal element from *Enterococcus faecalis*', *J Bacteriol*, vol. 180, no. 3, pp. 714-21.

Rice, LB, Carias, LL, Hutton-Thomas, R, Sifaoui, F, Gutmann, L & Rudin, SD 2001, 'Penicillin-binding protein 5 and expression of ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 45, no. 5, pp. 1480-6.

Rice, LB 2002, 'Association of different mobile elements to generate novel integrative elements', *Cell Mol Life Sci*, vol. 59, no. 12, pp. 2023-32.

Rice, LB, Carias, L, Rudin, S, Vael, C, Goossens, H, Konstabel, C, Klare, I, Nallapareddy, SR, Huang, W & Murray, BE 2003, 'A potential virulence gene, *hylEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin', *J Infect Dis*, vol. 187, no. 3, pp. 508-12.

Rice, LB, Bellais, S, Carias, LL, Hutton-Thomas, R, Bonomo, RA, Caspers, P, Page, MG & Gutmann, L 2004, 'Impact of specific *pbp5* mutations on expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium*', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 48, no. 8, pp. 3028-32.

Rice, LB, Carias, LL, Marshall, S, Rudin, SD & Hutton-Thomas, R 2005a, 'Tn5386, a novel Tn916-like mobile element in *Enterococcus faecium* D344R that interacts with Tn916 to yield a large genomic deletion', *J Bacteriol*, vol. 187, no. 19, pp. 6668-77.

Rice, LB, Carias, LL, Rudin, S, Lakticova, V, Wood, A & Hutton-Thomas, R 2005b, '*Enterococcus faecium* low-affinity *pbp5* is a transferable determinant', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 49, no. 12, pp. 5007-12.

Rice, LB, Carias, LL, Marshall, SH, Hutton-Thomas, R & Rudin, S 2007, 'Characterization of Tn5386, a Tn916-related mobile element', *Plasmid*, vol. 58, no. 1, pp. 61-7.

Rice, LB, Lakticova, V, Carias, LL, Rudin, S, Hutton, R & Marshall, SH 2009, 'Transferable capacity for gastrointestinal colonization in *Enterococcus faecium* in a mouse model', *J Infect Dis*, vol. 199, no. 3, pp. 342-9.

Rice, LB, Carias, LL, Rudin, S, Hutton, RA & Marshall, S 2010, 'Multiple copies of functional, *Tet(M)*-encoding Tn916-like elements in a clinical *Enterococcus faecium* isolate', *Plasmid*, vol. 64, no. 3, pp. 150-155.

Roberts, AP, Davis, IJ, Seville, L, Villedieu, A & Mullany, P 2006, 'Characterization of the ends and target site of a novel tetracycline resistance-encoding conjugative transposon from *Enterococcus faecium* 664.1H1', *J Bacteriol*, vol. 188, no. 12, pp. 4356-61.

Roberts, AP, Chandler, M, Courvalin, P, Guedon, G, Mullany, P, Pembroke, T, Rood, JI, Smith, CJ, Summers, AO, Tsuda, M & Berg, DE 2008, 'Revised nomenclature for transposable genetic elements', *Plasmid*, vol. 60, no. 3, pp. 167-73.

Roberts, MC, Sutcliffe, J, Courvalin, P, Jensen, LB, Rood, J & Seppala, H 1999, 'Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 43, no. 12, pp. 2823-30.

Rosvoll, TC, Pedersen, T, Sletvold, H, Johnsen, PJ, Sollid, JE, Simonsen, GS, Jensen, LB, Nielsen, KM & Sundsfjord, A 2010, 'PCR-based plasmid typing in *Enterococcus faecium* strains reveals widely distributed pRE25-, pRUM-, pIP501- and pHTbeta-related replicons associated with glycopeptide resistance and stabilizing toxin-antitoxin systems', *FEMS Immunol Med Microbiol*, vol. 58, no. 2, pp. 254-68.

Routsis, C, Platsouka, E, Willems, RJ, Bonten, MJ, Paniara, O, Saroglou, G & Roussos, C 2003, 'Detection of enterococcal surface protein gene (*esp*) and amplified fragment length polymorphism typing of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* during its emergence in a Greek intensive care unit', *J Clin Microbiol*, vol. 41, no. 12, pp. 5742-6.

Ruiz-Garbajosa, P, Bonten, MJ, Robinson, DA, Top, J, Nallapareddy, SR, Torres, C, Coque, TM, Canton, R, Baquero, F, Murray, BE, del Campo, R & Willems, RJ 2006, 'Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination', *J Clin Microbiol*, vol. 44, no. 6, pp. 2220-8.

Ruiz-Garbajosa, P, de Regt, M, Bonten, M, Baquero, F, Coque, TM, Canton, R, HJ, MH & Willems, RJ 2011, 'High-density fecal *Enterococcus faecium* colonization in hospitalized patients is associated with the presence of the polyclonal subcluster CC17', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, vol. 31, no. 4, pp. 5.

Rybkin, T, Mainardi, JL, Sougakoff, W, Collatz, E & Gutmann, L 1998, 'Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of beta-lactam resistance', *J Infect Dis*, vol. 178, no. 1, pp. 159-63.

Sahm, DF & Gilmore, MS 1995, 'High-level gentamicin resistance among enterococci', *Dev Biol Stand*, vol. 85, pp. 99-105.

Sarti, M, Campanile, F, Sabia, C, Santagati, M, Gargiulo, R & Stefani, S 2012, 'Polyclonal Diffusion of Beta-Lactamase-Producing *Enterococcus faecium*', *J Clin Microbiol*, vol. 50, no. 1, pp. 169-72.

Sauvage, E, Kerff, F, Fozz, E, Herman, R, Schoot, B, Marquette, JP, Taburet, Y, Prevost, D, Dumas, J, Leonard, G, Stefanic, P, Coyette, J & Charlier, P 2002, 'The 2.4-A crystal structure of the penicillin-resistant penicillin-binding protein PBP5fm from *Enterococcus faecium* in complex with benzylpenicillin', *Cell Mol Life Sci*, vol. 59, no. 7, pp. 1223-32.

Sauvage, E, Kerff, F, Terrak, M, Ayala, JA & Charlier, P 2008, 'The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis', *FEMS Microbiol Rev*, vol. 32, no. 2, pp. 234-58.

Schwarz, FV, Perreten, V & Teuber, M 2001, 'Sequence of the 50-kb conjugative multiresistance plasmid pRE25 from *Enterococcus faecalis* RE25', *Plasmid*, vol. 46, no. 3, pp. 170-87.

Seetulsingh, PS, Tomayko, JF, Coudron, PE, Markowitz, SM, Skinner, C, Singh, KV & Murray, BE 1996, 'Chromosomal DNA restriction endonuclease digestion patterns of beta-lactamase-producing *Enterococcus faecalis* isolates collected from a single hospital over a 7-year period', *J Clin Microbiol*, vol. 34, no. 8, pp. 1892-6.

Semedo, T, Santos, MA, Lopes, MF, Figueiredo Marques, JJ, Barreto Crespo, MT & Tenreiro, R 2003, 'Virulence factors in food, clinical and reference Enterococci: A common trait in the genus?', *Syst Appl Microbiol*, vol. 26, no. 1, pp. 13-22.

Shankar, N, Lockett, CV, Baghdayan, AS, Drachenberg, C, Gilmore, MS & Johnson, DE 2001, 'Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection', *Infect Immun*, vol. 69, no. 7, pp. 4366-72.

Shankar, N, Baghdayan, AS & Gilmore, MS 2002, 'Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*', *Nature*, vol. 417, no. 6890, pp. 746-50.

Shaw, JH & Clewell, DB 1985, 'Complete nucleotide sequence of macrolide-lincosamide-streptogramin B-resistance transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*', *J Bacteriol*, vol. 164, no. 2, pp. 782-96.

Sifaoui, F, Arthur, M, Rice, L & Gutmann, L 2001, 'Role of penicillin-binding protein 5 in expression of ampicillin resistance and peptidoglycan structure in *Enterococcus faecium*', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 45, no. 9, pp. 2594-7.

Signoretto, C, Boaretti, M & Canepari, P 1994, 'Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the low-affinity penicillin binding protein of *Enterococcus faecalis*', *FEMS Microbiol Lett*, vol. 123, no. 1-2, pp. 99-106.

Sillanpaa, J, Nallapareddy, SR, Prakash, VP, Qin, X, Hook, M, Weinstock, GM & Murray, BE 2008, 'Identification and phenotypic characterization of a second collagen adhesin, Scm, and genome-based identification and analysis of 13 other predicted MSCRAMMs, including four distinct pilus loci, in *Enterococcus faecium*', *Microbiology*, vol. 154, no. Pt 10, pp. 3199-211.

Silveira, E, Freitas, AR, Coque, TM, Peixe, L & Novais, C 2011, 'Codissemination of antibiotic and copper resistance genes in large conjugative plasmids of enterococci from different ecological niches.', *21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)27th International Congress of Chemotherapy (ICC) In Clinical Microbiology and Infection*, vol. 17, no. s4, pp. S696-S697, Milan, Italy.

Simjee, S, Fraiese, AP & Gill, MJ 1999, 'Plasmid heterogeneity and identification of a Tn5281-like element in clinical isolates of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecium* isolated in the UK', *J Antimicrob Chemother*, vol. 43, no. 5, pp. 625-35.

Simjee, S, Manzoor, SE, Fraise, AP & Gill, MJ 2000, 'Nature of transposon-mediated high-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis* isolated in the United Kingdom', *J Antimicrob Chemother*, vol. 45, no. 5, pp. 565-75.

Simjee, S, White, DG, Meng, J, Wagner, DD, Qaiyumi, S, Zhao, S, Hayes, JR & McDermott, PF 2002, 'Prevalence of streptogramin resistance genes among *Enterococcus* isolates recovered from retail meats in the Greater Washington DC area', *J Antimicrob Chemother*, vol. 50, no. 6, pp. 877-82.

Simonsen, GS, Smabrekke, L, Monnet, DL, Sorensen, TL, Moller, JK, Kristinsson, KG, Lagerqvist-Widh, A, Torell, E, Digranes, A, Harthug, S & Sundsfjord, A 2003, 'Prevalence of resistance to ampicillin, gentamicin and vancomycin in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from clinical specimens and use of antimicrobials in five Nordic hospitals', *J Antimicrob Chemother*, vol. 51, no. 2, pp. 323-31.

Sletvold, H, Johnsen, PJ, Wikmark, OG, Simonsen, GS, Sundsfjord, A & Nielsen, KM 2010, 'Tn1546 is part of a larger plasmid-encoded genetic unit horizontally disseminated among clonal *Enterococcus faecium* lineages', *J Antimicrob Chemother*, vol. 65, no. 9, pp. 1894-906.

Soge, OO, Beck, NK, White, TM, No, DB & Roberts, MC 2008, 'A novel transposon, Tn6009, composed of a Tn916 element linked with a *Staphylococcus aureus* mer operon', *J Antimicrob Chemother*, vol. 62, no. 4, pp. 674-80.

Solheim, M, Aakra, A, Snipen, LG, Brede, DA & Nes, IF 2009, 'Comparative genomics of *Enterococcus faecalis* from healthy Norwegian infants', *BMC Genomics*, vol. 10, p. 194.

Sood, S, Malhotra, M, Das, BK & Kapil, A 2008, 'Enterococcal infections & antimicrobial resistance', *Indian J Med Res*, vol. 128, no. 2, pp. 111-21.

Sousa, JC 2006, *Manual de Antibióticos Antibacterianos*, Edições Universidade Fernando Pessoa, Porto.

Sriramulu, DD 2008, 'Adaptive expression of foreign genes in the clonal variants of bacteria: from proteomics to clinical application', *Proteomics*, vol. 8, no. 4, pp. 882-92.

Stiles, ME & Holzapfel, WH 1997, 'Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy', *Int J Food Microbiol*, vol. 36, no. 1, pp. 1-29.

Straut, M, de Cespedes, G & Horaud, T 1996, 'Plasmid-borne high-level resistance to gentamicin in *Enterococcus hirae*, *Enterococcus avium*, and *Enterococcus raffinosus*', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 40, no. 5, pp. 1263-5.

Straut, M, de Cespedes, G, Delbos, F & Horaud, T 1997, 'Molecular typing of *Enterococcus faecalis* strains resistant to high levels of gentamicin and isolated in Romania', *J Antimicrob Chemother*, vol. 39, no. 4, pp. 483-91.

Takeuchi, K, Tomita, H, Fujimoto, S, Kudo, M, Kuwano, H & Ike, Y 2005, 'Drug resistance of *Enterococcus faecium* clinical isolates and the conjugative transfer of gentamicin and erythromycin resistance traits', *FEMS Microbiol Lett*, vol. 243, no. 2, pp. 347-54.

Tanimoto, K & Ike, Y 2008, 'Complete nucleotide sequencing and analysis of the 65-kb highly conjugative *Enterococcus faecium* plasmid pMG1: identification of the transfer-related region and the minimum region required for replication', *FEMS Microbiol Lett*, vol. 288, no. 2, pp. 186-95.

Tenover, FC, Arbeit, RD, Goering, RV, Mickelsen, PA, Murray, BE, Persing, DH & Swaminathan, B 1995, 'Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing', *J Clin Microbiol*, vol. 33, no. 9, pp. 2233-9.

Terns, MP & Terns, RM 2011, 'CRISPR-based adaptive immune systems', *Curr Opin Microbiol*, vol. 14, no. 3, pp. 321-7.

Thal, LA, Chow, JW, Clewell, DB & Zervos, MJ 1994, 'Tn924, a chromosome-borne transposon encoding high-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis*', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 38, no. 5, pp. 1152-6.

Toledo-Arana, A, Valle, J, Solano, C, Arrizubieta, MJ, Cucarella, C, Lamata, M, Amorena, B, Leiva, J, Penades, JR & Lasa, I 2001, 'The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation', *Appl Environ Microbiol*, vol. 67, no. 10, pp. 4538-45.

Tomich, PK, An, FY & Clewell, DB 1980, 'Properties of erythromycin-inducible transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*', *J Bacteriol*, vol. 141, no. 3, pp. 1366-74.

Tomita, H, Pierson, C, Lim, SK, Clewell, DB & Ike, Y 2002, 'Possible connection between a widely disseminated conjugative gentamicin resistance (pMG1-like) plasmid and the emergence of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*', *J Clin Microbiol*, vol. 40, no. 9, pp. 3326-33.

Tomita, H, Tanimoto, K, Hayakawa, S, Morinaga, K, Ezaki, K, Oshima, H & Ike, Y 2003, 'Highly conjugative pMG1-like plasmids carrying Tn1546-like transposons that encode vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*', *J Bacteriol*, vol. 185, no. 23, pp. 7024-8.

Tomita, H & Ike, Y 2005, 'Genetic analysis of transfer-related regions of the vancomycin resistance *Enterococcus* conjugative plasmid pHTbeta: identification of oriT and a putative relaxase gene', *J Bacteriol*, vol. 187, no. 22, pp. 7727-37.

Top, J, Willems, R & Bonten, M 2008, 'Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen', *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, vol. 52, no. 3, pp. 297-308.

Top, J, Willems, R, van der Velden, S, Asbroek, M & Bonten, M 2008, 'Emergence of clonal complex 17 *Enterococcus faecium* in The Netherlands', *J Clin Microbiol*, vol. 46, no. 1, pp. 214-9.

Torres, C, Tenorio, C, Portillo, A, Garcia, M, Martinez, C, Del Campo, R, Ruiz-Larrea, F & Zarazaga, M 2003, 'Intestinal colonization by *vanA*- or *vanB2*-containing enterococcal isolates of healthy animals in Spain', *Microb Drug Resist*, vol. 9 Suppl 1, pp. S47-52.

Torres, C, Escobar, S, Portillo, A, Torres, L, Rezusta, A, Ruiz-Larrea, F, Revillo, MJ, Aspiroz, C & Zarazaga, M 2006, 'Detection of clonally related *vanB2*-containing *Enterococcus faecium* strains in two Spanish hospitals', *J Med Microbiol*, vol. 55, no. Pt 9, pp. 1237-43.

Torres, OR, Korman, RZ, Zahler, SA & Dunny, GM 1991, 'The conjugative transposon Tn925: enhancement of conjugal transfer by tetracycline in *Enterococcus faecalis* and mobilization of chromosomal genes in *Bacillus subtilis* and *E. faecalis*', *Mol Gen Genet*, vol. 225, no. 3, pp. 395-400.

Translate a DNA Sequence. Available from:
<<http://arbl.cvmb.colostate.edu/molkit/translate/>>. [Visualizado em setembro de 2010].

Treitman, AN, Yarnold, PR, Warren, J & Noskin, GA 2005, 'Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002)', *J Clin Microbiol*, vol. 43, no. 1, pp. 462-3.

Valdezate, S, Labayru, C, Navarro, A, Mantecon, MA, Ortega, M, Coque, TM, Garcia, M & Saez-Nieto, JA 2009, 'Large clonal outbreak of multidrug-resistant CC17 ST17 *Enterococcus faecium* containing Tn5382 in a Spanish hospital', *J Antimicrob Chemother*, vol. 63, no. 1, pp. 17-20.

van den Bogaard, AE, Willems, R, London, N, Top, J & Stobberingh, EE 2002, 'Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers', *J Antimicrob Chemother*, vol. 49, no. 3, pp. 497-505.

van Schaik, W, Top, J, Riley, DR, Boekhorst, J, Vrijenhoek, JE, Schapendonk, CM, Hendrickx, AP, Nijman, IJ, Bonten, MJ, Tettelin, H & Willems, RJ 2010, 'Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island', *BMC Genomics*, vol. 11, p. 239.

van Schaik, W & Willems, RJ 2010, 'Genome-based insights into the evolution of enterococci', *Clin Microbiol Infect*, vol. 16, no. 6, pp. 527-32.

Velasco, D, Perez, S, Angeles Dominguez, M, Villanueva, R & Bou, G 2004, 'Description of a nosocomial outbreak of infection caused by a *vanA*-containing strain of *Enterococcus faecalis* in La Coruna, Spain', *J Antimicrob Chemother*, vol. 53, no. 5, pp. 892-893.

von Gottberg, A, van Nierop, W, Duse, A, Kassel, M, McCarthy, K, Brink, A, Meyers, M, Smego, R & Koornhof, H 2000, 'Epidemiology of glycopeptide-resistant enterococci colonizing high-risk patients in hospitals in Johannesburg, Republic of South Africa', *J Clin Microbiol*, vol. 38, no. 2, pp. 905-9.

Wanger, AR & Murray, BE 1990, 'Comparison of enterococcal and staphylococcal beta-lactamase plasmids', *J Infect Dis*, vol. 161, no. 1, pp. 54-8.

Werner, G, Hildebrandt, B & Witte, W 2003, 'Linkage of *erm*(B) and *aadE-sat4-aphA3* in multiple-resistant *Enterococcus faecium* isolates of different ecological origins', *Microb Drug Resist*, vol. 9 Suppl 1, pp. S9-16.

Werner, G, Willems, RJ, Hildebrandt, B, Klare, I & Witte, W 2003, 'Influence of transferable genetic determinants on the outcome of typing methods commonly used for *Enterococcus faecium*', *J Clin Microbiol*, vol. 41, no. 4, pp. 1499-506.

Werner, G, Coque, TM, Hammerum, AM, Hope, R, Hryniewicz, W, Johnson, A, Klare, I, Kristinsson, KG, Leclercq, R, Lester, CH, Lillie, M, Novais, C, Olsson-Liljequist, B, Peixe, LV, Sadowy, E, Simonsen, GS, Top, J, Vuopio-Varkila, J, Willems, RJ, Witte, W & Woodford, N 2008a, 'Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe', *Euro Surveill*, vol. 13, no. 47.

Werner, G, Gfrorer, S, Fleige, C, Witte, W & Klare, I 2008b, 'Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from a German intensive care unit patient', *J Antimicrob Chemother*, vol. 61, no. 5, pp. 1182-3.

Wilke, MS, Lovering, AL & Strynadka, NC 2005, 'Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective', *Curr Opin Microbiol*, vol. 8, no. 5, pp. 525-33.

Willems, RJ, Top, J, van Den Braak, N, van Belkum, A, Endtz, H, Mevius, D, Stobberingh, E, van Den Bogaard, A & van Embden, JD 2000, 'Host specificity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*', *J Infect Dis*, vol. 182, no. 3, pp. 816-23.

Willems, RJ, Homan, W, Top, J, van Santen-Verheuver, M, Tribe, D, Manziros, X, Gaillard, C, Vandenbroucke-Grauls, CM, Mascini, EM, van Kregten, E, van Embden, JD & Bonten, MJ 2001, 'Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals', *Lancet*, vol. 357, no. 9259, pp. 853-5.

Willems, RJ, Top, J, van Santen, M, Robinson, DA, Coque, TM, Baquero, F, Grundmann, H & Bonten, MJ 2005, 'Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex', *Emerg Infect Dis*, vol. 11, no. 6, pp. 821-8.

Willems, RJ & van Schaik, W 2009, 'Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen', *Future Microbiol*, vol. 4, no. 9, pp. 1125-35.

Willems, RJ, Hanage, WP, Bessen, DE & Feil, EJ 2011, 'Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance', *FEMS Microbiol Rev*, vol. 35, no. 5, pp. 872-900.

Williamson, R, Calderwood, SB, Moellering, RC, Jr. & Tomasz, A 1983, 'Studies on the mechanism of intrinsic resistance to beta-lactam antibiotics in group D streptococci', *J Gen Microbiol*, vol. 129, no. 3, pp. 813-22.

Williamson, R, le Bouguenec, C, Gutmann, L & Horaud, T 1985, 'One or two low affinity penicillin-binding proteins may be responsible for the range of susceptibility of *Enterococcus faecium* to benzylpenicillin', *J Gen Microbiol*, vol. 131, no. 8, pp. 1933-40.

Wilson, IG & McAfee, GG 2002, 'Vancomycin-resistant enterococci in shellfish, unchlorinated waters, and chicken', *Int J Food Microbiol*, vol. 79, no. 3, pp. 143-51.

Witte, W 2000, 'Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment', *Int J Antimicrob Agents*, vol. 14, no. 4, pp. 321-5.

Zapun, A, Contreras-Martel, C & Vernet, T 2008, 'Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance', *FEMS Microbiol Rev*, vol. 32, no. 2, pp. 361-85.

Zhanel, GG, Laing, NM, Nichol, KA, Palatnick, LP, Noreddin, A, Hisanaga, T, Johnson, JL & Hoban, DJ 2003, 'Antibiotic activity against urinary tract infection (UTI) isolates of vancomycin-resistant enterococci (VRE): results from the 2002 North American Vancomycin Resistant Enterococci Susceptibility Study (NAVRESS)', *J Antimicrob Chemother*, vol. 52, no. 3, pp. 382-8.

Zheng, B, Tomita, H, Inoue, T & Ike, Y 2009, 'Isolation of VanB-type *Enterococcus faecalis* strains from nosocomial infections: first report of the isolation and identification of the pheromone-responsive plasmids pMG2200, Encoding VanB-type vancomycin resistance and a Bac41-type bacteriocin, and pMG2201, encoding erythromycin resistance and cytolysin (Hly/Bac)', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 53, no. 2, pp. 735-47.

Zorzi, W, Zhou, XY, Dardenne, O, Lamotte, J, Raze, D, Pierre, J, Gutmann, L & Coyette, J 1996, 'Structure of the low-affinity penicillin-binding protein 5 PBP5fm in wild-type and highly penicillin-resistant strains of *Enterococcus faecium*', *J Bacteriol*, vol. 178, no. 16, pp. 4948-57.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Permissões da *American Society for Microbiology* na utilização das Figuras 1 e 2.

[My Orders](#)[My Library](#)[My Profile](#)

Welcome ricardo_re@yahoo.com

[Log out](#) | [Help](#)[Home](#) > [My Orders](#) > [View Your RightsLink Orders](#)

License Details

This is a License Agreement between Ricardo Escada ("You") and Elsevier ("Elsevier"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the [payment terms and conditions](#).

[Get the printable license.](#)

License Number	2855070714691
License date	Feb 23, 2012
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	International Journal of Food Microbiology
Licensed content title	Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract
Licensed content author	Günter Klein
Licensed content date	1 December 2003
Licensed content volume number	88
Licensed content issue number	2-3
Number of pages	9
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Order reference number	None
Title of your thesis/dissertation	Dissemination of ampicillin resistance in Enterococcus faecium from different ecological niches.
Expected completion date	Mar 2012
Estimated size (number of pages)	150

Elsevier VAT number	
Permissions price	0.00 EUR
VAT/Local Sales Tax	0.0 USD / 0.0 GBP
Total	0.00 EUR

[← Back](#)

Copyright © 2012 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#) . Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

[My Orders](#)[My Library](#)[My Profile](#)

Welcome ricardo_re@yahoo.com

[Log out](#) | [Help](#)[Home](#) > [My Orders](#) > [View Your RightsLink Orders](#)

License Details

This is a License Agreement between Ricardo Escada ("You") and American Society for Microbiology ("American Society for Microbiology"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by American Society for Microbiology, and the [payment terms and conditions](#).

[Get the printable license.](#)

License Number	2854740755833
License date	Feb 23, 2012
Licensed content publisher	American Society for Microbiology
Licensed content publication	Applied and Environmental Microbiology
Licensed content title	Dispersion of Multidrug-Resistant Enterococcus faecium Isolates Belonging to Major Clonal Complexes in Different Portuguese Settings
Licensed content author	Ana R. Freitas, Carla Novais, Patricia Ruiz-Garbajosa, Teresa M. Coque, Luísa Peixe
Licensed content date	Jul 15, 2009
Volume	75
Issue	None
Start page	4904
End page	4908
Type of Use	Dissertation/Thesis
Format	Print and electronic
Portion	Figures/tables/images
Number of figures/tables	1
Order reference number	None
Title of your thesis / dissertation	Dissemination of ampicillin resistance in Enterococcus faecium from different ecological niches.
Expected completion date	Mar 2012
Estimated size(pages)	150
Billing Type	Invoice

Billing address

None
Porto, Porto 4000-040
Portugal

Customer reference info

None

Total

0.00 EUR

◀ Back

Copyright © 2012 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#) . Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

Anexo 2. Poster apresentado no 21ST ECCMID/27th ICC, Milan (Italy) – 7 - 10 de Maio de 2011: High incidence of horizontal transfer of ampicillin resistance (*pbp5*) among CC17 *Enterococcus faecium*. Carla Novais^{1,2}, Ricardo Escada¹, Ana R. Freitas², Eduarda Silveira², Teresa M. Coque³, Luísa Peixe².

High incidence of horizontal transfer of ampicillin resistance (*pbp5*) among CC17 *Enterococcus faecium*

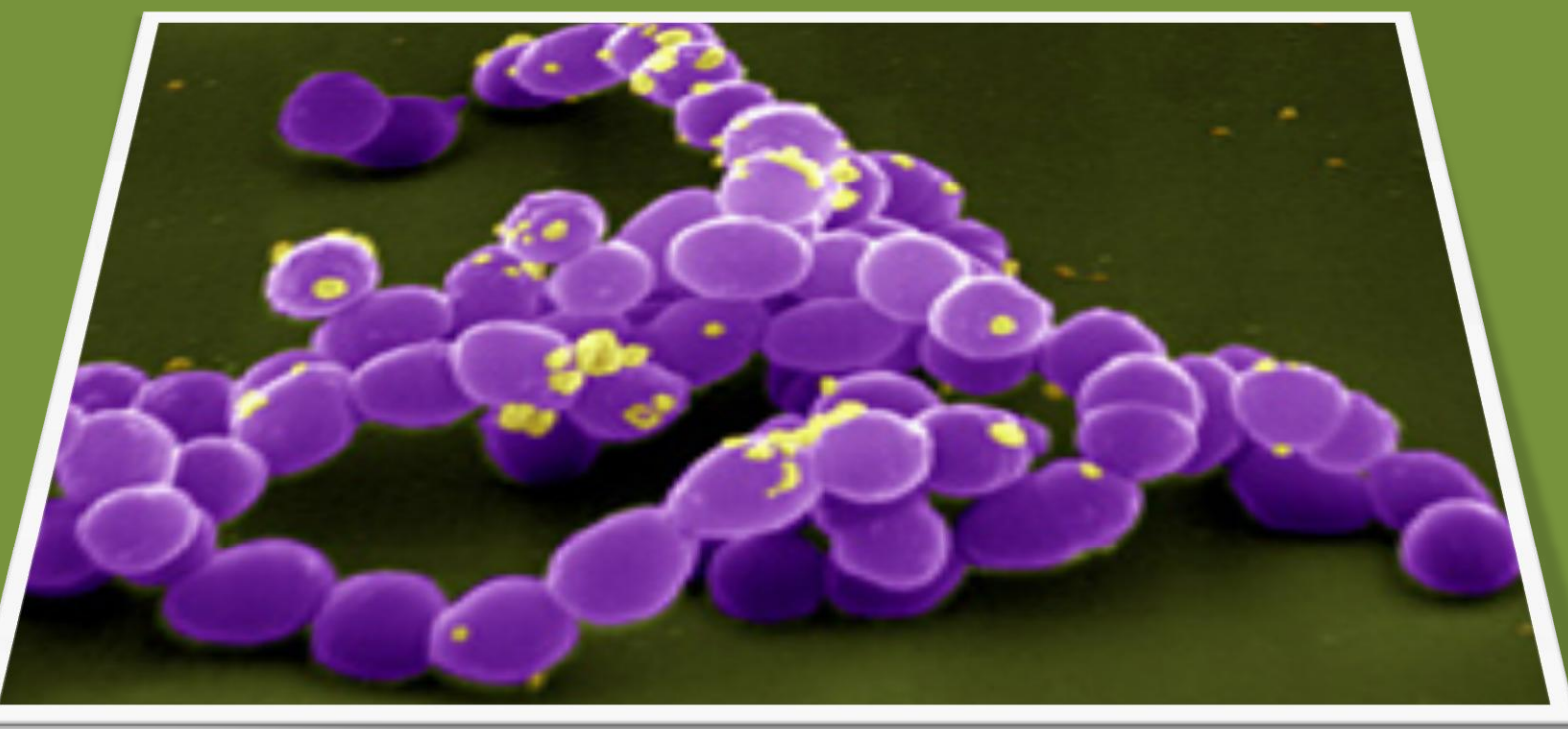
Carla Novais^{1,2*}, Ricardo Escada¹, Ana R. Freitas², Eduarda Silveira², Teresa M. Coque³, Luísa Peixe²

1-CEBIMED. Microbiologia. Faculdade Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa. Porto. Portugal.

2-REQUIMTE. Lab. Microbiologia. Faculdade Farmácia. Universidade do Porto. Portugal.

3- Servicio Microbiologia. Hospital Universitario Ramon y Cajal. Madrid. Spain

* cnovais@ufp.edu.pt



Introduction and Purpose

Enterococcus faecium (*Efm*) belonging to the clonal complex (CC) 17 have been associated with nosocomial outbreaks worldwide in the last twenty years, owing their success to the sequential acquisition of antibiotic resistance and virulence factors (Top et al., 2008).

Resistance to ampicillin (AmpR) is considered a major feature of *Efm*-CC17 being observed since the early 1980's in isolates causing nosocomial outbreaks in the United States (Galloway-Peña et al., 2009).

AmpR in *Efm* was associated with the presence of β -lactamases, overexpression of penicillin binding protein 5 (PBP5) and, in most cases, with mutated *pbp5* conferring reduced affinity to the antibiotic (Rice et al., 2004). However, data concerning the mobilization of this gene are extremely scarce and associated with the presence of the conjugative transposons Tn5382 or, more rarely, Tn916 and Tn5386. (Rice et al., 2005; Hanrahan et al., 2000).

Our goal was to analyze the transferability of ampicillin resistance and its correlation with *pbp5* acquisition in a collection of *Efm* obtained from several sources (hospital and community) in Portugal.

Methods

Epidemiological background. We analyzed 80 representative AmpR-*Efm* isolates from a Portuguese collection comprising 1,700 enterococci from different geographical locations (North, Centre, South) and years (1996 to 2009) (Novais et al., 2005a,b,c; Novais et al., 2006; Freitas et al. 2011). They were recovered from different patients in 5 hospitals of diverse regions (n=39), swine and piggery environment (n=18 isolates; 11 samples), reared poultry (n=4; 4 samples) of four national commercial brands, faeces from healthy humans (n=2, 2 samples) and hospital wastewater (n=15, 13 samples from 4 hospitals). Species identification was performed as described (Novais et al. 2005a).

Antibiotic susceptibility tests and ampicillin resistance transfer. Study of antibiotic susceptibility was performed by disc diffusion and/or agar dilution method (CLSI, 2010). The presence of β -lactamases was evaluated by the nitrocefin test. Transfer of ampicillin resistance was screened by filter mating (3 times/isolate) using receptor strains lacking (*Efm*GE1; MIC_{Amp} < 0,5mg/L) or containing (*Efm*BM; *Efm*64/3; in both MIC_{Amp} = 2mg/L) *pbp5* and BHI supplemented with antibiotics (ampicillin-16mg/L, fusidic acid-25mg/L; rifampicin-30mg/L) (Werner et al., 2011).

Clonal relatedness. Clonality was established by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) in wild, receptors and transconjugants strains and by Multilocus Sequence Typing (MLST) in wild strains as described (Novais et al., 2008; <http://www.mlst.net>).

Genetic studies. The study of chromosomal/plasmidic location of *pbp5* and the evaluation of size diversity of the DNA fragments harbouring this gene was performed by hybridization of *I-CeuI* or *SmaI* genomic DNA with 23S rRNA and/or *pbp5* probes (Freitas et al., 2010). Stability of the acquired *pbp5* in *Efm*GE1 transconjugants (TC *Efm*GE1) was evaluated by serial passages (30x) on BHI without ampicillin. The search of integrases, excisionases, relaxases and other specific sequences from conjugative transposons (CTn5382, CTn916, CTn5386, CTn5397, CTn4453/4451, CTn6000) was searched by multiplex PCRs as previous described (Novais et al., ECCMID; Novais et al., 2008).

Results

I- Transfer of ampicillin resistance.

Horizontal transfer of ampicillin resistance was detected in 19% (n=15/80) of enterococci (human, animal and environmental settings; Table 1). None of these isolates produced β -lactamases and they all belong to CC17 cluster (5 ST132; 4 ST393; 2 ST280; 1 ST18; 1 ST125; 1 STnew which is a SLV from ST18, ST132, ST64, and ST348). Other isolates containing a nontransferable *pbp5* belong to both CC17 and nonCC17.

All transconjugants (TC) obtained from *Efm*GE1 contained *pbp5* gene and exhibited a phenotype of AmpR (MIC=16-64mg/L) even after serial passages in Amp free BHI media. Transference of *pbp5* to *Efm*64/3 and *Efm*BM recipients occurred in 7 isolates (MIC=8-64mg/L) of the 15 tested. Besides AmpR, some of the transconjugants also showed resistance to antibiotics of other families (Table 1).

II- Genetic studies associated with *pbp5* transfer.

The *pbp5* gene was located in chromosomal bands ranging from 170 to 250kb in both wild and transconjugants strains (PFGE *I-CeuI* and *SmaI* Fig.1; Table 1). For three isolates (1 TCEfm64/3 and 2 TCEfmBM) hybridization signal using the *pbp5* probe, was observed in two bands (Fig.1; Table 1). No hybridization was observed for the recipient *Efm*GE1 and bands of 290 and 250kb were detected for *Efm*BM and *Efm*64/3 recipients, respectively. The *pbp5* was not associated with any of the CTns/ICEs tested.

Conclusions

AmpR is often transferable among *Efm*-CC17 from several origins and is associated with *pbp5* mobilization by conjugative genetic elements different from those previously described (Rice et al., 2005; Hanrahan et al., 2000).

Co-transfer of *pbp5* with different antibiotic resistance genes, including to vancomycin, could contribute for the maintenance of multi-drug CC17 in different niches.

The existence of a previous *pbp5* (*Efm*64/3 and *Efm*BM4105RF) is not a limitation for the acquisition of a new copy of the gene. The diversity of *pbp5* expression in different genetic backgrounds (*Efm*GE1, *Efm*BM, *Efm*64/3) and the lower MIC_{Amp} in most of the transconjugants comparing with those of the wild strains (Table 1), corroborate previous assays related with the mobilization of *pbp5* carrying elements (Rice et al., 2005 Hanrahan et al., 2000).

Further studies are needed to elucidate the characteristics of the genetic(s) element(s) carrying *pbp5* in order to better understand the success of *pbp5* transfer and the rapid and increasing rates of AmpR-CC17 in different countries.

References

- CLSI. 2010. M10S20, vol. 30. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 Freitas AR et al. 2011. JCM, 49(3):925-31
 Freitas AR et al. 2010. AAC, 54(6):2660-5.
 Galloway-Peña JR et al. 2009. JID, 200(10):1566-73
 Hanrahan J et al. 2000. AAC, 44(5):1349-51.
 Novais C et al. AAC, 52(3):1001-8.
 Novais et al. 2009. 19th ECCMID, CMI, 15:(S4):247
 Novais C. et al. 2005a. AAC, 49:3073-3079.
 Novais C. et al. 2005b. AEM, 71:3364-3368.
 Novais C. et al. 2005c. JAC, 56:1139-1143.
 Novais C. et al. 2006. CMI, 12:1131-1134.
 Rice et al. 2004. AAC, 48:3028-3032
 Rice LB et al. 2005. JB, 187(19):6668-77.
 Top J et al. 2008. FEMS Immunol Med Microbiol. 52(3):297-308
 Werner G et al. 2011. JAC 66(2):273-82.

Results

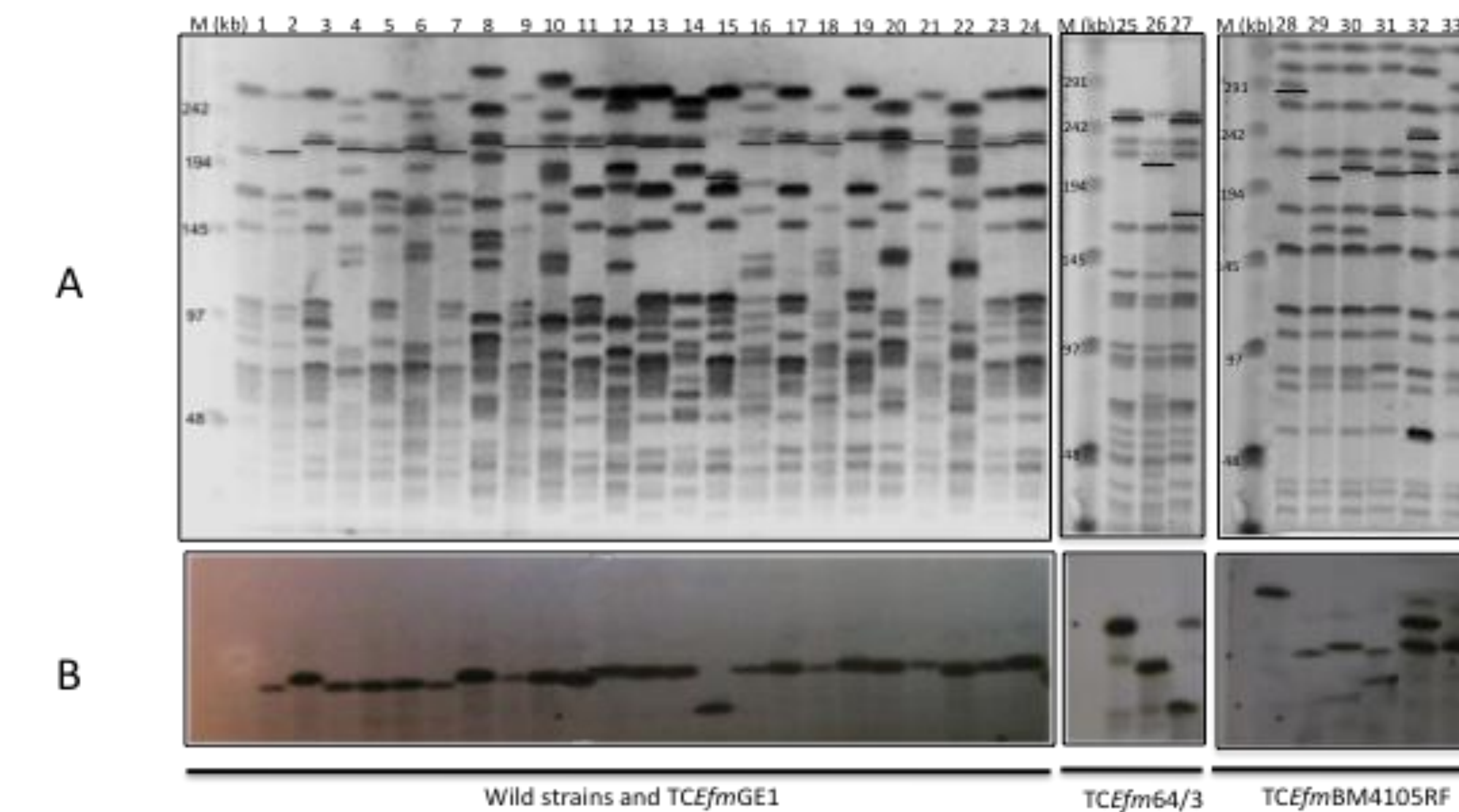


Figure 1. Image A-PFGE *SmaI* digested DNA of receptors (1-*Efm*GE1, 25-*Efm*64/3, 28-*Efm*BM4105RF), wild (2,4,6,8,10,12,14,16,18,22) and transconjugants (TC) strains (3,5,7,9,11,13,15,17,19,23,24,26,27, 29, 30, 31, 32, 33). The black lines in image A correspond to the ones that hybridized with *pbp5* probe in image B. Image B- Hybridization assays with a *pbp5* probe. M- Low Range PGE Marker (New England, BioLabs).

Table 1. Epidemiological features, antibiotic resistance and *pbp5* chromosomal location of enterococci transferring ampicillin-resistance and their transconjugants isolates

MLST	PFGE	Date	Source (sample)	Isolate type (receptor strain)	MIC _{Amp} (mg/L)	Resistance to other antibiotics ^b	PFGE- <i>SmaI pbp5</i> hybridization (kb)
CC17	90	1997	Hospital B-clinical (urine)	wild	32	Vc, Tc, Tet, Ery, QD, Strep	210
				TC (<i>Efm</i> GE1)	32	Vc, Tc, Tet, Ery, Rif, AFus	210
ST132	88	1999	Hospital B-clinical (blood)	TC (<i>Efm</i> BM4105RF)	16	Vc, Tc, Tet, Ery, Rif, AFus	170+200
				wild	64	Vc, Tc, Tet, Ery, QD, Cip, Gent, Strep	210
				TC (<i>Efm</i> GE1)	32	Vc, Tc, Tet, Ery, Strep, Rif, AFus	210
				wild	64	Ery, Cip, Gent, Strep	210
				TC (<i>Efm</i> GE1)	32	Tet, Rif, AFus	210
				wild	64	Ery, Cip, Gent, Strep	210
				TC (<i>Efm</i> GE1)	32	Tet, Rif, AFus	210
				TC (<i>Efm</i> BM4105RF)	8	Rif, AFus	200+240
				wild	128	Vc, Tc, Ery, Cip, Strep	210
				TC (<i>Efm</i> GE1)	32	Vc, Tc, Tet, Rif, AFus	210
				wild	128	Tet, Ery, Cip, Gent, Strep	210
				TC (<i>Efm</i> GE1)	16	Tet, Rif, AFus	210
ST18	59	2001	Healthy human (faeces)	wild	128	Vc, Tc, Tet, Ery, Cip, Gent	200
				TC (<i>Efm</i> GE1)	64	Vc, Tc, Tet, Ery, Gent, Rif, AFus	210
ST280	100	2002	Hospital C-clinical (urine)	TC (<i>Efm</i> BM4105RF)	8	Vc, Tc, Rif, AFus	200
				wild	128	Vc, Tc, Ery, Cip, Gent, Strep	210
ST393	SN208	2006	Piggery (n=4-waste lagoon, animal faeces)	TC (<i>Efm</i> GE1)	32	Vc, Tc, Tet, Ery, Rif, AFus	210
				wild	32	Tet, Ery, Cip, Gent, Strep	210
				TC (<i>Efm</i> BM4105RF)	8	Tet, Rif, AFus	180
				TC (<i>Efm</i> BM4105RF)	8	Rif, AFus	210
ST125	126	2007	Hospital A-clinical (urine)	wild	128	Vc, Tc, Ery, Cip, Nit	210
				TC (<i>Efm</i> GE1)	64	Vc, Tc, Tet, Ery, Rif, AFus	210
				TC (<i>Efm</i> 64/3)	8	ND	170+250

^aThe new ST is a Single locus variant (*gyd* allele) of ST18, ST132, ST64 and ST348 (CC17 cluster). ^b All de receptors are resistant to rifampicin and fusid acid. *Efm*GE1 is also resistant to tetracycline. Vc- vancomycin; Tc-teicoplanin, Tet- tetracycline, ERY- erythromycin; QD-quinupristin-dalfopristin; Cip- ciprofloxacin, Strep. High level resistance (HLR) to streptomycin, Gent-HLR to gentamicin, Nit-nitrofurantoin, Rif- rifampicin; FA-Fusid Acid; ND- not determined

Anexo 3. Abstract publicado no 21ST ECCMID/27th ICC ICC, Milan (Italy) – 7 - 10 de Maio de 2011: High incidence of horizontal transfer of ampicillin resistance (*pbp5*) among CC17 *Enterococcus faecium*. C. Novais, R. Escada, A.R. Freitas, E. Silveira, T.M. Coque, L. Peixe (Porto, PT; Madrid, ES).

Genetics of antimicrobial resistance

Saturday, May 07, 2011, 15:30 - 16:30

High incidence of horizontal transfer of ampicillin resistance (pbp5) among CC17 *Enterococcus faecium*

C. Novais*, R. Escada, A.R. Freitas, E. Silveira, T.M. Coque, L. Peixe (Porto, PT; Madrid, ES)

Objectives: Most CC17 *E. faecium* (Efm) are resistant to ampicillin (AMPR). Transfer of AMPR has been linked to pbp5 mobilization by conjugative transposons (CTn) Tn5382 or, more rarely, Tn916 and Tn5386. We analyzed the occurrence of pbp5 transfer among Efm from several sources in Portugal.

Methods: AMPR Efm (n=80) from clinical samples (C, n=39), Healthy Humans (HH, n=2), Hospital Sewage (S, n=15), Animals (A, n=22) were studied. Transfer of pbp5 was screened by filter mating using receptor strains lacking (EfmGE1) or containing (EfmBM4105RF/Efm64-3) pbp5, and BHI with AMP, fusidic acid and rifampicin. Antibiotic susceptibility was tested by disk diffusion/agar dilution methods (CLSI) and clonality by PFGE/MLST. The stability of the acquired pbp5 [EfmGE1 transconjugants (TC)] was evaluated by serial passages (30x) on BHI without AMP.

Location of pbp5 was studied by hybridization of genomic DNA (ICeu-I, SmaI) with 23S rRNA and/or pbp5 probes. The presence of CTns (Tn5382, Tn916, Tn5386, Tn5397, Tn4453/4451, Tn6000, Tn5801) was searched by PCR.

Results: pbp5 was transferred to EfmGE1 in 19% of the cases (n=15; 1HH, 2A, 4S, 8C), all belonging to CC17 (8 PFGE types, 8 STs comprising ST18, ST125, ST132, ST280, ST393, ST431, STnew). All isolates presented a chromosomal location for pbp5 but none of them carried any of the screened CTns. TCEfmGE1 were AMPR (MIC=16-64mg/L) even after consecutive inoculations in AMP free BHI. Resistance to glycopeptides, erythromycin and/or high level of resistance to streptomycin was also observed in 6, 6 and 1 of TCEfmGE1, respectively. Transfer of pbp5 to Efm64/3 (2/15) or EfmBM4105RF (6/15) was also observed. EfmBM4105RF and Efm64/3 TC strains increased their MICAMP values from 2mg/L to 8-16mg/L and 64mg/L, respectively. pbp5 hybridized with SmaI DNA fragments of 290kb and 250kb in EfmBM4105RF and Efm64/3 recipient strains while no hybridization was seen in EfmGE1. In the TC, pbp5 was located on bands of 180kb (1 TCEfmGE1), 200kb (2 TCEfmBM4105RF), 210kb (32; 13 wild Efm, 13 TCEfmGE1, 5 TCEfmBM4105RF, 1 TCEfm64/3), 180kb +250kb (1TCEfm64/3) and 210kb+242kb (1 TCEfmBM4105RF).

Conclusions: AMPR is often transferable among CC17 Efm from several origins and associated with pbp5 mobilization by conjugative genetic elements different from those previously described. Further studies to characterize the genetic context and to explain the variable levels of AMPR on distinct genetic backgrounds (pbp5+/pbp5-) are in process.

Anexo 4. Submissão no GenBank das plataformas genéticas contendo o gene *pbp5* obtidos no nosso estudo (JN208889.1, JN208887.1, JN208885.1, JN208883.1, JN208888.1, JN208886.1, JN208884.1 e JN208882.1).

Nucleotide



Search

Display Settings: GenBank

Enterococcus faecium strain TCGE_E4.1 histidinol phosphate phosphatase-like gene, partial sequence; and penicillin-binding protein Pbp5 (pbp5) gene, complete cds

GenBank: JN208889.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS JN208889 2708 bp DNA linear BCT 03-OCT-2011

DEFINITION Enterococcus faecium strain TCGE_E4.1 histidinol phosphate phosphatase-like gene, partial sequence; and penicillin-binding protein Pbp5 (pbp5) gene, complete cds.

ACCESSION JN208889

VERSION JN208889.1 GI:347952191

KEYWORDS .

SOURCE Enterococcus faecium

ORGANISM [Enterococcus faecium](#)
Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Enterococcaceae; Enterococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2708)

AUTHORS Novais,C., Silveira,E., Freitas,A.R., Escada,R., Coque,T.M. and Peixe,L.

TITLE High incidence of horizontal transfer of ampicillin resistance (pbp5) among CC17 Enterococcus faecium

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 2708)

AUTHORS Novais,C., Silveira,E., Freitas,A.R., Escada,R., Coque,T.M. and Peixe,L.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (05-JUL-2011) Microbiology, REQUIMTE Pharmacy Faculty, Porto University, Rua Anibal Cunha, 164, Porto 4050-047, Portugal

FEATURES

source Location/Qualifiers

1..2708

/organism="Enterococcus faecium"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="TCGE_E4.1"

/db_xref="taxon:1352"

/country="Portugal"

/note="wild strain (E49) was collected in 2001 from hospital residual water (Porto, Portugal) and belonged to ST132/CC17 transconjugant"

[misc_feature](#) complement(<1..336)

/note="similar to histidinol phosphate phosphatase;"

member

of the HisJ protein family"

gene

540..2576

/gene="pbp5"

CDS

540..2576

/gene="pbp5"

/note="involved in ampicillin resistance"

/codon_start=1

/transl_table=[11](#)

/product="penicillin-binding protein Pbp5"

/protein_id="[AEP33241.1](#)"

/db_xref="GI:347952192"

/translation="MKRSDKHGKNRTGAYIAGAVILIAAAGGGYFYYQHYYQET

QAVEA

GEKTVEQFVQALNKG DYNKAAEMTSKKAANKSALSEKEILDKYQNIYGAADV KGLQIS

NLKVDKKDDSTYSFSYKAKMNTSLGELKDL SYKGT LDRNDGQTTINWQPNLVFPEMEG

NDKVS LTTQEAARGNIIDRNGEPLATTGK LKQLGVVPSKLG DGGEKTANIKAIASSFD

LTEDAINQAISQSWVQPDYFVPLKIIDGATPELPAGATIQEVDGRYPLGEASAQLIG

YVGDITAEDIDKNPELSSNGKIGRSGLEMAFDKDLRGTGGKLSITDADGVEKKVLIE

HEVQNGKDIELTIDAKAQKTA FDSLGGKAGSTVATPKTGDLLALASSPSYDPNKMTN

GISQEDYKAYEENPEQPFISR FATGYAPGSTFKMITAAIGLDNGTIDPNEVLTINGLK

WQKDSSWGSYKVTRVSDVSQVDLKTAL IYSDNIYAAQETLKMGEKKFRTGLDKFIFGE

DLDLPI SMNPAQISNEDSFNSDILLADTGYGQGELLINPIQQAAMYSVFANNGTLVYP

KLIADKETKDKKNVIGETALQTI VPD LREVVDVNGTAHLSALGIPLAAKTGTAEIK

EKQDVKGKENSFLFAFNPDNQGYMMVSMLENKEDDSDATKRASELLQYLNQNYQ"

ORIGIN

1 aaagacatct gcttctataa caactagtgc ttctgaaagt tgtgcaaaat
actgaggaat

61 cacaatcgca ggatccatat ctttgagttc gtcactaaa taatcaaatt
gaccattatg

121 atgcacactg agtaatttta aatcgtaatc tttatcggct aaatagtgga
tgatccgatc

181 cttttcagaa gcgatgtaac cgatttcgat gccttttaaa acacgattgc
caaaaagcgtt

241 atttaagcta tcgattgttt gactgtacat ttcataatcg gggatatcat
cgactttagt

301 aacaggattg gctaagtcaa aatgttcagt tgtcacgacg taaccatcgt
agtttgtaa

361 atagtcctca tttcttgga gttttgagac tactatatgc gttttttgt
tgatttacca

421 acatgtttag acattttcct ctaggaaaaa attaactagc accacggggt
ttattatggt

481 agaataaaca ggtataaata gtgaaataaa ggaatgacaa gcaagagaag
gaggaaaaaa

541 tgaaaagaag tgacaagcac ggcaaaaatc gaacaggcgc ttatattgcc
ggcgcagtga

601 tcttaatagc agctgcgggt ggcggttatt tttactacca gcactatcaa
gagacccaag

661 cagtagaagc tggagaaaag acagttgagc aatttgcca agctttgaac
aaggagatt

721 ataacaaagc tgcagaaatg acatcaaaaa aggcggcaaa taaaagtgca
ttatctgaaa
781 aagagatcct agataaatac cagaatatat acggtgctgc tgatgtcaaa
ggacttcaga
841 tatcgaatct aaaagtagat aaaaaagacg attctactta cagtttttca
tataaagcaa
901 agatgaatac ctcattaggt gaattgaaag atctttctta taaaggaaca
ttagacagaa
961 atgatgggtca aaccacgatc aactggcaac ccaacttggt tttccagaa
atggaaggaa
1021 atgacaaagt aagcctgacc acacaagaag cagcaagagg gaatattata
gatcgaaatg
1081 gtgaaccatt agcaacaaca ggcaaaactaa aacaattagg agtcgttcca
agtaaacttg
1141 gagatggagg cgaaaaaaca gccaatatca aagcgattgc ttctccttc
gacttaacag
1201 aagatgctat caatcagggc atttcacaaa gctgggtaca acccgattac
tttgtccat
1261 tgaaaatcat tgatggagca acgccagaac ttccagctgg agctaccatt
caagaagtag
1321 acggcagata ttatcctttg ggtgaagcat ctgctcagct gattggttac
gtgggagata
1381 tcacagcaga agatattgat aagaatccag aattaagcag taatggaaaa
atcggtcgct
1441 caggtttgga gatggctttt gataaggatc ttcgtgggac aacaggtggg
aaattaagca
1501 ttacagatgc agacggtgta gagaaaaaag ttctgatcga acatgaagtt
caaatggca
1561 aagatatcga attgacaatc gatgcgaagg cacaaaaaac agcttttgac
agtctaggag
1621 gaaaagctgg atcaactggt gcgacaacgc caaaaaccgg tgatcttctt
gcgcttgcta
1681 gctctccaag ctatgatcca acaaaaatga caaacgggat ctcaacaaga
gattacaaag
1741 cttatgaaga aaatcctgaa cagccattca tcagccgatt tgcgacaggt
tatgctcctg
1801 gatctacggt taaaatgatt acagcagcaa tcggtctcga caacggcact
atcgatccaa
1861 atgaagtgtt gacgatcaac gggcttaaat ggcaaaaaga cagttcttgg
ggatcttata
1921 aagtaacgcg tgtcagtgat gtatcacaag tagacttaaa aactgctttg
atctattccg
1981 ataatatata tgcggcacia gaaacgttga aaatgggtga gaaaaaattt
cgtacaggct
2041 tagataaatt ctttttgggt gaagaccttg atttgccaat tagtatgaat
ccagcaciaa
2101 tttctaataga agatagcttt aactcagata tcttgctagc tgatactgga
tatggacagg
2161 gcgaacttct aattaatcct atccagcaag cagcaatgta ttctgttttt
gccaacaatg
2221 gcacacttgt ctatcctaaa ttgattgcag ataaagagac aaaagataag
aagaatgtca
2281 tcggcgaaac agcattacia acgatcgtgc cagatctgag agaagttgtg
caagatgtaa
2341 atggtacagc acattctctt tctgctttag ggattccggt ggacagcaaa
actggtacag
2401 cggaaatcaa agaaaaacag gatgtaaagg ggaaagagaa cagtttcttg
tttgctttca
2461 atcctgataa ccaaggttat atgatgggtca gcatgttggg aaataaagaa
gatgatgatt
2521 cagcaaccaa acgagcatcg gaactattgc aatacctcaa ccaaaattat

caataaaaaa

2581 ttgcttttta agtacagtaa aaggactgtg gcggtatcgt cacagtcctt
ttttcaaata

2641 aacggttttc acgatgtctc tttcacaact tctttttgat ttactcacac
ttcataaact

2701 ttttttgt

//

Nucleotide



Search

Display Settings: GenBank

Enterococcus faecium strain SN446 insertion sequence ISEfa11, complete sequence

GenBank: JN208887.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS JN208887 4794 bp DNA linear BCT 03-OCT-2011

DEFINITION Enterococcus faecium strain SN446 insertion sequence ISEfa11, complete sequence.

ACCESSION JN208887

VERSION JN208887.1 GI:347952182

KEYWORDS .

SOURCE Enterococcus faecium

ORGANISM [Enterococcus faecium](#)
Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Enterococcaceae; Enterococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 4794)
AUTHORS Novais,C., Silveira,E., Freitas,A.R., Escada,R., Coque,T.M. and Peixe,L.
TITLE High incidence of horizontal transfer of ampicillin resistance (pbp5) among CC17 Enterococcus faecium
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 4794)
AUTHORS Novais,C., Silveira,E., Freitas,A.R., Escada,R., Coque,T.M. and Peixe,L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (05-JUL-2011) Microbiology, REQUIMTE Pharmacy Faculty, Porto University, Rua Anibal Cunha, 164, Porto 4050-047, Portugal

FEATURES
source Location/Qualifiers
1..4794
/organism="Enterococcus faecium"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="SN446"
/isolation_source="piggery water"
/db_xref="taxon:[1352](#)"
/country="Portugal"
/collection_date="2007"
/note="vancomycin and ampicillin resistant;"

ST132/CC17"
[misc_feature](#) <1..168
/note="similar to acetyltransferase; member of the gnat family"
[CDS](#) complement(151..888)
/note="member of the HisJ family"
/codon_start=1
/transl_table=[11](#)

/product="histidinol phosphate phosphatase"
/protein_id="AEP33234.1"
/db_xref="GI:347952183"
/translation="MTTEHFDLANPVTKVDDIPDYEMYSQTIDSLNKRFGNRV

LKGIE

IGYIASEKDRIIDYLADKDYDLKLLSVHHNGQFDYLDDEVKMDMPAIVIPQYFAQLSE

ALVVIEADVFAHFDYGFRVFGLSVAEFKQYEAQFLPILDQVIKKNLAFELNAKSAYLY

DNLALYEYVIDLYLSRGGTLVSVGSDGHYLEHFRFHFDDL FALKKAGVTELAIQKG

KRIMVPLPVQKNVLSIKSEELFLDFFF"

gene

1092..3128

/gene="pbp5"

CDS

1092..3128

/gene="pbp5"

/note="involved in ampicillin resistance"

/codon_start=1

/transl_table=11

/product="penicillin-binding protein Pbp5"

/protein_id="AEP33235.1"

/db_xref="GI:347952184"

/translation="MKRSDKHGKNRTGAYIAGAVILIAAAGGGYFYQHYQET

QAVEA

GEKTVEQFVQALNKGDYNKAAEMTSKKAANKSALSEKEILDKYQNIYGAADVKGLOIS

NLKVDDKDDSTYSFSYKAKMNTSLGELKDL SYKGTLDNRNDGQTTINWQPNLVFPEMEG

NDKVSLLTQEAARGNIIDRNGEPLATTGKCLKQLGVVPSKLDGGEKTANIKAIASSFD

LTEDAINQAISQSWVQPDYFVPLKIIDGATPELPAGATIQEVDGRYYP LGAAAQLIG

YVGDITAEDIDKNPELSSNGKIGRSGLEMAFDKDLRGTGGKLSITDADGVEKKVLIE

HEVQNGKDIKLTIDAKAQKTAFDLSGGKAGSTVATTPKTGDL LALASSPSYDPNKMTN

GISQEDYKAYEEDPEQPFISR FATGYAPGSTFKMITAAIGLDNGTIDPNEVLTINGLK

WQKDSSWGSYKVTRVSDVSQVDLKTALIYSDNIYAAQETLKMGEKKFRTGLDKFIFGE

DLDLPI SMNPAQISNEDSFNSDILLADTGYGQGELLINPIQQAAMYSVFANNGTLVYP

KLIADKETKDKKNVIGETALQTI VPDLREVVQDVNGTAHLSALGIPLAAKTGTAEIK

EKQDVKGKENSFLFAFNPDNQGYMMVSML ENKEDDDSATKRASELLQYLNQNYQ"

repeat_region

3150..3159

/note="target site duplication"

/rpt_type=direct

mobile_element

complement(3160..4672)

/mobile_element_type="insertion sequence:ISEfall"

CDS

complement(3241..4536)

/codon_start=1

/transl_table=11

/product="transposase ISEfall"

/protein_id="AEP33236.1"

/db_xref="GI:347952185"

/translation="MNDSIKMLRITEKDL MITEVSYETLQKKKTLVDDAVLS

PTPRA

CRSCGSTVVDGNGKAIIVKNGK KETIVRFEQYNHMPLVMRLKKQRYTCKNCRTHWTAQ

SYFVQPRHSIANHVRYKIASLLTEKVLSLFIKSCQVSLTTVIRTLKEFKSYLPKQSK

KILPRVLMVDEFRSHASIEDKMSFICADGETGKLIDVLPTRKLPRLTSYFLGCTNPEE

VEFLVTDMNAAYFQLTKRVLPNKVVIDRFHIVKHMNQAFNELRIREMNELRKAGQKS

QAEKLLKNWRFLKLNKRANINHYEYKTKWSFRAPKYPFLEAMMIDRLLLEFSPPLKEAY

PFFHELVEAFRDKDPDLFFSLLAELPETLDDSFREKLQNLITYEEGITNAMIYPYSNG

KIEAKNTHIKTMKRVSYGFKSFENMRIRIFLINQLINVR "

repeat_region 4623..4672

/note="IR"

/rpt_type=inverted

repeat_region 4673..4682

/note="target site duplication"

/rpt_type=direct

ORIGIN

1 cgttatgcta aaacgaaaca aaaacgttat ttacgtttga ctgtttatga
aaaaaatcat
61 gcaggtattc gtttttatga acgtcatgga tttaaaaaaa tcgggatcaa
acattttcct
121 ttaggaaaac aagatcgtat ttgtcggatt ttagaaaaag aaatctaaaa
aaagctcctc
181 acttttgatg ctgaggacgt ttttttgac tggtaatgga accataatc
gctttccttt
241 ttgataaatc gctaattccg tcacaccttt tgcttttaac agagcaaaaa
gatcatcgaa
301 atggaaacgg aaatgttaa ggtaatgcc atctgatcca aactaacca
aggtaccacc
361 acgtgaaaga tataaatcga tgacatattc atataacgct aaattgtcat
acaagtaagc
421 gctcttagca tttaattcga atgccaatth atttttaatt acttgatcta
gaatcggtaa
481 aaactgcgct tcatattggt taaattcagc aacggataga ccaaataccc
gaaaaccata
541 gtcaaaatga gcaaagacat ctgcttctat aacaactagt gcttctgaaa
gttggtgaaa
601 atactgagga atcacaatag caggatccat atctttgact tcgtcatcta
aataatcaaa
661 ttgaccatta tgatgcacac tgagtaattt taaatcgtaa tctttatcgg
ctaaatagtc
721 gatgatccga tccttttcag aagcgatgta accgatctcg atgcctttta
aaacacgatt
781 gccaaaacgc ttatttaagc tatcgattgt ttgactgtac atttcataat
cggggatatac
841 atcgacttta gtaacaggat tggctaagtc aaaatgttca gttgtcacga
cgtaaccatc
901 gtagtttggt aatagtcct catttcttgg gagttttgag actactatat
gcgttttttt
961 gttgatttac caacatggtt agacattttc ctctaggaaa aaattaacta
gcaccacggg
1021 ttttattatg ttagaataaa caggtataaa tagtgaata aaggaatgac
aagcaagaga
1081 aggaggaaaa aatgaaaaga agtgacaagc acggcaaaaa tcgaacaggc
gcttatattg
1141 ccggcgcagt gatcttaata gcagctgcgg gtggcgggta tttttactac
cagcactatc
1201 aagaaacca agcagtagaa gctggagaaa agacagttga gcaatttgtc
caagctttga
1261 acaagggaga ttataacaaa gctgcagaaa tgacatcaaa aaaggcggca

aataaaaagtg

1321 cattatctga aaaagagatc ttagataaat accagaatat atacggtgct
gctgatgtca

1381 aaggacttca gatatcgaat ctaaaaagtag ataaaaaaga cgattctact
tacagttttt

1441 catataaagc caagatgaat acctcattag gtgaattgaa agatctttct
tataaaggaa

1501 cattagacag aatgatggg caaaccacga tcaactggca acccaacttg
gtttttccag

1561 aatggaagg aatgacaaa gtaagcctga ccacacaaga agcagcaaga
gggaatatta

1621 tagatcgaaa tggatgaacca ttagcaacaa caggcaaaact aaaacaatta
ggagtcgttc

1681 caagtaaact tggagatgga ggcgaaaaaa cagccaatat caaagcgatt
gcttctctct

1741 tcgacttaac agaagatgct atcaatcagg cgatttcaca aagctgggta
caaccgatt

1801 actttgtccc attgaaaatc attgatggag caacgccaga acttccagct
ggagctacca

1861 ttcaagaagt agacggcaga tattatcctt tgggtgaagc agctgctcag
ctgattgggt

1921 acgtgggaga tatcacagca gaagatattg ataagaatcc agaattaagc
agtaatggaa

1981 aaatcggctg ctcaggtttg gagatggctt ttgataagga tcttcgtggg
acaacagggtg

2041 ggaaattaag cattacagat gcagacggtg tagagaaaaa agttctgatc
gaacatgaag

2101 ttcaaatgg caaagatatc aaattgacaa tcgatgcgaa ggcacaaaaa
acagcttttg

2161 acagtctagg aggaaaagct ggatcaactg ttgcgacaac gccaaaaacc
ggtgatcttc

2221 ttgcgcttgc tagctctcca agctatgatc caaacaaaat gacaaaaggg
atctcacaag

2281 aagattacaa agcttatgaa gaagatcctg aacagccatt catcagccga
tttgcgacag

2341 gttatgctcc tggatctacg tttaaaatga ttacagcagc aatcgggtctc
gacaacggca

2401 ctatcgatcc aatgaagtg ttgacgatca acgggcttaa atggcaaaaa
gacagttctt

2461 ggggatctta taaagtaacg cgtgtcagtg atgtatcaca agtagactta
aaaactgctt

2521 tgatctattc cgataatata tatgcggcac aagaaacggt gaaaatgggt
gagaaaaaat

2581 ttcgtacagg cttagataaa ttcatttttg gtgaagacct tgatttgcca
attagtatga

2641 atccagcaca aatttctaata gaagatagct ttaactcaga tatcttgcta
gctgatactg

2701 gatatggaca ggcgcaactt ctaattaatc ctatccagca agcagcaatg
tattctgttt

2761 ttgccaacaa tggcacactt gtctatccta aattgattgc agataaagag
acaaaagata

2821 agaagaatgt catcggcgaa acagcattac aaacgatcgt gccagatctg
agagaagttg

2881 tgcaagatgt aatgggtaca gcacattctc tttctgcttt agggattccg
ttggcagcga

2941 aaactgggtac agcggaaaatc aaagaaaaac aggatgtaaa ggggaaagag
aacagtttct

3001 tgtttgcttt caatcctgat aaccaagggt atatgatggg cagcatggtg
gaaaataaag

3061 aagatgatga ttcagcaacc aaacgagcat cggaactatt gcaatacctc
aaccaaaatt

3121 atcaataaaa aaattgcttt ttaagtacca gtaaaaggag ctctttgtca
ataaggactg
3181 atgagttgtg caaaatcaaa tctgagtcag aatgaaccac attctggctc
agattttttg
3241 ttatcttaca ttgattaatt gattgatcaa aaagattcta attctcatgt
tctcaaatga
3301 tttaaaccg taggatactc gtttcattgt ctttatgtgg gtattcttcg
cttctatttt
3361 tccattggaa taaggataga tcattgcggt ggtgatgcct tcttcatagg
tcagaaggtt
3421 ttgaagcttt tcccgaagc tgcacatctaa cgtttcggga agttctgcca
ataaggagaa
3481 aaataagtca gggctctttgt ctcgaaaggc ttcaactaat tcatgaaaa
agggatacgc
3541 ctcttttagg ggccgagaaa actcaagcaa tcgatcaatc atcattgctt
cagtaagaaa
3601 tgggtatttt ggtgctcgga aacttttcca tgttttgtat tcataatggt
tgatgtttgc
3661 acgatttttt agcaaaaagc gccagttctt tttcagtttt tctgcctggc
ttttctgtcc
3721 ggctttacga agttcattca tttcacggat acgcaactca ttgaacgctt
gattcatgtg
3781 tttgacaata tgaaaccgat caatcacgac tttcgcattt ggcagaacac
gtttgggtgag
3841 ctggaagtag gcggcggtca tgtctgtcac caagaattct acttcttctg
gattggtaca
3901 acctaagaaa tagcttgta atcgaggtaa tttacgcgta ggcaaacat
ctattaat
3961 tcctgtttcg ccatccgccc aaataaagct catcttatct tctatggaag
catgcgaacg
4021 aaattcgtca accatcaata ctctggggag gatcttttta gattgctttg
gtaaatagct
4081 tttaaactct ttcaatgtac gaataacggt ggtcaaagat acctgacagc
ttttcgcaat
4141 aaaagataaa gatacttttt cagtcagtaa agaagcaatt ttatatctaa
catgatttgc
4201 gattgaatgt ctgggttggg caaaataact ttgagccgtc caatgggtgc
gacagttttt
4261 acaggtatag cgttgctttt ttaggcgcat aaccaaaggc atatgattgt
attgttcaaa
4321 acggacaatc gtttcctttt ttccattttt cactataatt gctttccgct
ttccatctac
4381 cacagtagaa ccacaacttc tacaagcacg aggagtaggc gagagaacag
catcgacgac
4441 caacgtcttt ttcttctgaa gggctctgta agagacctct gtaatcatca
aatctttctc
4501 tgttattctc agcatttttt tgatagaatc attcatatag cgtatcgtcc
tctcagttgt
4561 ttattttgtg gtgatttaat catactagag aacgatatgt tttttaatac
ctaaaatgaa
4621 aatggggctg aagaatcaat tctgattcat cagtccata aattatagag
ccagtaaaag
4681 gactgtggcg ttatcgtcac agtccttttt tcaaataaac ggttttcacg
atgtctcttt
4741 cacaacttct ttttgattta ctcacacttc ataaactttt tttgtaaaat attt

//

Nucleotide

Search

Display Settings: GenBank

Enterococcus faecium strain TCGESN71_1 cell cycle protein FtsW (fstW), PBP 5 synthesis repressor (psr), and penicillin-binding protein Pbp5 (pbp5) genes, complete cds

GenBank: JN208885.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS JN208885 5021 bp DNA linear BCT 03-OCT-2011

DEFINITION Enterococcus faecium strain TCGESN71_1 cell cycle protein FtsW (fstW), PBP 5 synthesis repressor (psr), and penicillin-binding protein Pbp5 (pbp5) genes, complete cds.

ACCESSION JN208885

VERSION JN208885.1 GI:347952175

KEYWORDS .

SOURCE Enterococcus faecium

ORGANISM [Enterococcus faecium](#)
Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Enterococcaceae; Enterococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 5021)
AUTHORS Novais,C., Silveira,E., Freitas,A.R., Escada,R., Coque,T.M. and Peixe,L.
TITLE High incidence of horizontal transfer of ampicillin resistance (pbp5) among CC17 Enterococcus faecium
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 5021)
AUTHORS Novais,C., Silveira,E., Freitas,A.R., Escada,R., Coque,T.M. and Peixe,L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (05-JUL-2011) Microbiology, REQUIMTE Pharmacy Faculty, Porto University, Rua Anibal Cunha, 164, Porto 4050-047, Portugal

FEATURES

	Location/Qualifiers
source	1..5021 /organism="Enterococcus faecium" /mol_type="genomic DNA" /strain="TCGESN71_1" /db_xref="taxon:1352" /country="Portugal" /note="wild strain (SN71) was isolated from piggery waste lagoon and belonged to ST393/CC17 transconjugant"
gene	565..1728 /gene="fstW"
CDS	565..1728

/gene="fstW"
/codon_start=1
/transl_table=[11](#)
/product="cell cycle protein FtsW"
/protein_id="[AEP33229.1](#)"
/db_xref="GI:347952176"
/translation="MKKRKKIDWWILGPYLTLSMIGLLEEVYSASSYRLLQADE

NTKSL

LLRQLIFIFLSWSVIFLARSVKLHYLLHPKIAGYGLALSIFFLVLRIGIFGVTVNGA

QRWISLFGIQFQPSELANLFLIFYLSWFFRDGNSSPKDLKPKFLITVGITFLILFQPK

IAGALMILSIAWVIFWAAAVPFKKGIYLIVTFSALLIGAAGGVLYLGNKGWLPQMFNH

AYERIATLRDSFIDSHGAGYQMTSHFYALYNGGIFGRGLGNSITKKGYLPETETDFIF

SIITEELGLIGALCVLFLFLSFCMRIFCLSSRCKNQAGLFLGFGTLLFVQTIMNVG

SIAGLMPMTGVPLPFVSYGGTSLILSLGIGITLNISSKIQAEEPLRPEKQ"

[gene](#)

1820..2575

/gene="psr"

[CDS](#)

1820..2575

/gene="psr"

/codon_start=1

/transl_table=[11](#)

/product="PBP 5 synthesis repressor"

/protein_id="[AEP33230.1](#)"

/db_xref="GI:347952177"

/translation="MKVSQKIILSILLLLTLVVGYSIEFIHGFSSAKQSSTV

KKVEP

KSVPTTLNVALIGSDARSKDENGSRDSSLVAQYNQKTQQAKLISIMRDSYVDIPGYGM

NKINAAYSYGVDLLNQTLENFKFEAPYYASITFQDFIDCVNELFPGGVKIDAESL

DLDGVIYINKGEQVMDGNTLLQYARFREDKEGDFGRIRRQQQVIKAISSQLKDVTSIFK

LPKAVGKLLGSIQTNLPESVLLDCGMDFLKDIC"

[gene](#)

2633..4672

/gene="pbp5"

[CDS](#)

2633..4672

/gene="pbp5"

/note="involved in ampicillin resistance"

/codon_start=1

/transl_table=[11](#)

/product="penicillin-binding protein Pbp5"

/protein_id="[AEP33231.1](#)"

/db_xref="GI:347952178"

/translation="MKRSDKHGKNRTGAYIAGAVILIAAAGGGYFYYQHYQET

QAVEA

GEKTVEQFVQALNKGDYNKAAEMTSKKAANKSALSEKEILDKYQNIYGAADVKGQLQIS

NLKVDDKDDSTYSFSYKAKMNTSLGELKDLKSYGTLDRNDGQTTINWQPNLVFPEMEG

NDKVSLLTQEAARGNIIDRNGEPLATTGKLGKQLGVVPSKLGDGGEKTANIKAIASSFD

LTEDAINQAISQSWVQPDYFVPLKIIDGATPELPAGATIQEVDGRYYPLGEGAAAQLIG

YVGDITAEDIDKNPELSSNGKIGRSGLEMAFDKDLRGTGGKLSITDAVGVEKKVLIE

HEVQNGKDIKLTIDAKAQKTAFDLSLGGKAGSTVATTPKTDLLALASSPSYDPNKMTN

GISQEDYKAYEENPEQPFISR FATGYAPGSTFKMITAAIGLDNGTIDPNEVLTINGLK

WQKDSSWGSYKVTRVSSDVSQVDLKTALIYSDNIYAAQETLKMGEKKFRTGLDKFIFG

EDLDLPISMNPAQISNEDSFNSDILLADTYGQGELLINPIQQAAMYSVFANNGTLVY

PKLIADKETKDKKNVIGETAVQTI VPDLEVVQDVNGTAHLSLSALGIPLAAKTGTAEI

KEKQDVKGKENSFLFAFNPDNQGYMMVSMLENKEDDSDATKRASELLQYLNQNYQ"

ORIGIN

1 tagctagaag tacagaaaat atcagctcca tgttacagtg gacgagcata
gacaggatgg

61 atc gatccat gaaaattgaa tgccgtacgc agtgcggccg gcaatgaatt
tgctgcgata

121 ggtccaaacc tgc atgatcg cacgtccctg aataaataag gagcacaagt
catgttaaaa

181 atcagatata aaccatcgac agattcaaaa gaaatgaaaa aagaatatga
aacagtgaat

241 gat tttctgc aagggcacgt aaatagaata tagtaataac cttgttaggt
gaggctccta

301 tacaacata ggctgttgcc cagaaacgtc gaaagtcgcc aatgggtaaa
acagaaactg

361 tcggattaag gctttttcca atagctaaga atgttttctt tacgttgat
agtgcataaaa

421 ctccggacgat gagatgatgc taggtcagaa ttcttgctcg aaaaggtttc
tgaccttttc

481 tttatatttt tgtgactgac ttatttgatg agacaaactc gtcctcacc
tgacaagtgg

541 attgctgtgt gaggaggaga tgcggtgaaa aaaagaaaaa agatcgattg
gtggattttg

601 ggtccttatt tgactttgtc catgatcggc cttttagaag tatacagtc
cagttcttat

661 cgtttattgc aagccgatga aaatacaaaa agtctattat tgcgtcaact
aattttcata

721 tttttgagtt ggagcgtgat cttcttagct cgttcagtca aactacata
ttacttcac

781 cctaaaatag caggatacgg tttagcotta tcgattttct ttttagtatt
agtaagaata

841 gggatattcg gtgtcactgt caacggcgca caacgttga tctctctgtt
tggcattcaa

901 ttccagcctt ctgaactggc aaatcttttt ttgatatttt atttaagctg
gttttttctg

961 gacggaaata gtagcccaaa agatctaaaa aaaccattcc tgattacagt
aggataaact

1021 tttctgattt tatttcagcc aaagattgct ggagcattga tgatccttc
gattgcgtgg

1081 gtcataattt gggcagcggc ggtccattt aaaaaagga tctatcta
cgttactttt

1141 tctgcattgc tgattggagc agcagggcgg gtattatatt taggaaata
aggttggctt

1201 ccacagatgt ttaatcatgc ttatgaaagg atcgcgactt taagagattc
ttttatogat

1261 agtcatggtg cgggctatca aatgacccat tcgttttatg cactatata
tggtggcata

1321 tttggcgagg gattaggaaa tagtatcaca aaaaaaggg atcttcaga
gacagaaaca

1381 gactttattt tttcgattat tacagaagag cttgggctaa tcggtgcatt
gtgtgtgctt

1441 ttcttattgt tctcattatg catgagaatc tttgtttaa gcagtcgctg

taaaaatcag

1501 caagctggat tgtttctttt aggattcggg actttgctat tcgttcagac
gataatgaac

1561 gtgggaagta tcgcggggct gatgccaatg actggtgtgc cattgccatt
tgtagctac

1621 ggaggaacaa gttatctgat cctttcttta ggaatcggaa tcacgttgaa
tatttcttca

1681 aagatacagg ccgaagagtt gccgctctat cgacctgaaa aacaataaag
agaaactgag

1741 aaactctcag tttgaattat cataaagtac aatcttttat ttttcaagcg
agaggttctt

1801 ttagaaagag gaattcggaa tgaaagtatc tcaaaaaatc atattatcta
ttttgttact

1861 gcttacatta gtagttggct atttttcgat tgagtttatc catggatttt
cgtctgcaaa

1921 acagagttca actgtgaaaa aggtagagcc gaaaagtgtc cctaccacac
taaatgtggc

1981 tttgattggt tcagatgctc gttcgaaga cgaaaacggt cgctcggatt
cacttctggt

2041 tgcacaatac aaccagaaaa cacaacaagc aaaactgatc tctatcatga
gagattcata

2101 tgtcगतatt ccaggttacg gaatgaataa gataaatgca gcttactctt
atgggggagt

2161 tgatttatta aatcaaacat taaaggaaaa tttcaaattt gaagctcctt
attatgcaag

2221 tatcacattt caagatttta tcgattgctg taatgaactg tttcctggtg
gagtcaagat

2281 cgatgcagaa aatctctag atttagatgg cgtatatata aacaaggag
agcaagtgat

2341 ggatggtaat actttactcc agtatgctcg atttcgggaa gacaagaag
gagacttcgg

2401 gaggatcaga aggcagcagc aagtgatcaa agctatctct cagcagctga
aagacgtaac

2461 ttcaatattc aagctacca aagcggttgg gaaattactt ggtagtatcc
aaacgaacct

2521 tccagaaagt gtgcttctgg attgtggtat ggatttctc aaagacatat
gttagaataa

2581 acaggtataa atagtgaaat aaaggaatga caagcaagag aaggaggaaa
aatgaaaag

2641 aagtgacaag cacggcaaaa atcgaacagg cgcttatatt gccggcgcag
tgatcttaat

2701 agcagctgcg ggtggcgggt attttacta ccagcactat caagaaacct
aagcagtaga

2761 agctggagaa aagacagttg agcaatttgt ccaagctttg aacaagggag
attataacaa

2821 agctgcagaa atgacatcaa aaaaggcggc aaataaaagt gcattatctg
aaaaagagat

2881 cttagataaa taccagaata tatacgggtg tgctgatgtc aaaggacttc
agatatcgaa

2941 tctaaaagta gataaaaaag acgattctac ttacagtttt tcatataaag
caaagatgaa

3001 tacctcatta ggtgaattga aagatctttc ttataaagga acattagaca
gaaatgatgg

3061 tcaaaccacg atcaactggc aaccaactt ggtttttcca gaaatggaag
gaaatgacaa

3121 agtaagcctg accacacaag aagcagcaag aggcaatatt atagatcgaa
atggtgaacc

3181 attagcaaca acaggcaaac taaaacaatt aggagtcggt ccaagtaaac
ttggagatgg

3241 aggcgaaaa acagccaata tcaaagcgat tgcttctcc ttcgacttaa
cagaagatgc

3301 tatcaatcag gcgatttcac aaagctgggt acaacccgat tactttgtcc
cattgaaaat
3361 cattgatgga gcaacgccag aacttccagc tggagctacc attcaagaag
tagacggcag
3421 atattatcct ttgggtgaag cagctgctca gctgattggt tacgtgggag
atatcacagc
3481 agaagatatt gataagaatc cagaattaag cagtaatgga aaaatcggtc
gctcaggttt
3541 ggagatggct tttgataagg atcttcgtgg gacaacaggt gggaaattaa
gcattacaga
3601 tgcagtcggt gtagagaaaa aagtctgat cgaacatgaa gttcaaatg
gcaaagatat
3661 caaattgaca atcgatgcga aggcacaaaa aacagctttt gacagtctag
gaggaaaagc
3721 tggatcaact gttgcgacaa cgccaaaaac cggatgatcct cttgcgcttg
ctagctctcc
3781 aagctatgat ccaaacaaaa tgacaaacgg gatctcacia gaagattaca
aagcttatga
3841 agaaaatcct gaacagccat tcatcagccg atttgcgaca ggttatgctc
ctggatctac
3901 gtttaaaatg attacagcag caatcggctc cgacaacggc actatcgatc
caaatgaagt
3961 gttgacgatc aacgggctta aatggcaaaa agacagttct tggggatcct
ataaagtaac
4021 gcgtgtcagt agtgatgtat cacaagtaga cttaaaaact gctttgatct
attccgataa
4081 tatatatgcy gcacaagaaa cgttgaaaat gggtgagaaa aaatttcgta
caggcttaga
4141 taaattcatt tttgggtgaag accttgattt gccaatagat atgaatccag
cacaatttc
4201 taatgaagat agctttaact cagatatcct gctagctgat actggatatg
gacagggcga
4261 acttctaatt aatcctatcc agcaagcagc aatgtattct gtttttgcca
acaatggcac
4321 acttgtctat cctaaattga ttgcagataa agagacaaaa gataagaaga
atgtcatcgg
4381 cgaaacagca gtacaaacga tcgtgccaga tctgagagaa gttgtgcaag
atgtaaatgg
4441 tacagcacat tctctttctg ctttagggat tccgttggca gcgaaaactg
gtacagcggga
4501 aatcaaagaa aaacaggatg taaaggggaa agagaacagt ttcttgttg
ctttcaatcc
4561 tgataaccaa ggttatatga tggtcagcat gttggaaaat aaagaagatg
atgattcagc
4621 aaccaaacga gcacgggaac tattgcaata cctcaaccaa aattatcaat
aaaaaattgc
4681 tttttaagta cagtaaaagg actgtggcgt tatcgtcaca gtcctttttt
caaataaacg
4741 gttttcacga tgtctctttc acaacttctt tttgatttac tcacacttca
taaacttttt
4801 ttgtaaaatt gctttttaag tacagtaaaa ggactgtggc gttatcgtca
cagtcctttt
4861 ttcaaataaa cggttttcac gatgtctctt tcacaacttc tttttgattt
actcacactt
4921 cataaacttt ttttgtaaaa tatttgagaa caagtggaga aataagtgta
cttaataaaaa
4981 tcacgataac taaaggtgaa tagtactgtg gttcgatcaa t

//

Nucleotide



Search

Display Settings: GenBank

Enterococcus faecium strain 529940 histidinol phosphate phosphatase-like gene, partial sequence; and penicillin-binding protein Pbp5 (pbp5) gene, complete cds

GenBank: JN208883.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS JN208883 2727 bp DNA linear BCT 03-OCT-2011

DEFINITION Enterococcus faecium strain 529940 histidinol phosphate phosphatase-like gene, partial sequence; and penicillin-binding protein Pbp5 (pbp5) gene, complete cds.

ACCESSION JN208883

VERSION JN208883.1 GI:347952168

KEYWORDS .

SOURCE Enterococcus faecium

ORGANISM [Enterococcus faecium](#)
Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Enterococcaceae; Enterococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2727)
AUTHORS Novais,C., Silveira,E., Freitas,A.R., Escada,R., Coque,T.M. and Peixe,L.
TITLE High incidence of horizontal transfer of ampicillin resistance (pbp5) among CC17 Enterococcus faecium
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 2727)
AUTHORS Novais,C., Silveira,E., Freitas,A.R., Escada,R., Coque,T.M. and Peixe,L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (05-JUL-2011) Microbiology, REQUIMTE Pharmacy Faculty, Porto University, Rua Anibal Cunha, 164, Porto 4050-047, Portugal

FEATURES
source Location/Qualifiers
1..2727
/organism="Enterococcus faecium"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="529940"
/isolation_source="catheter"
/host="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:1352"
/country="Portugal"
/collection_date="2000"
/note="resistant to ampicillin and glycopeptides;"

MLST
ST16/CC17"
[misc_feature](#) complement(<1..355)

```

member      /note="similar to histidinol phosphate phosphatase;
            of the HisJ protein family"
            gene      559..2595
            /gene="pbp5"
            CDS      559..2595
            /gene="pbp5"
            /note="involved in ampicillin resistance"
            /codon_start=1
            /transl_table=11
            /product="penicillin-binding protein Pbp5"
            /protein_id="AEP33224.1"
            /db_xref="GI:347952169"
            /translation="MKRSDKHGKNRTGAYIAGAVILIAAAGGGYFYYQHYQET

```

QAVEA

```

GEKTVEQFVQALNKG DYNKAAEMTSKKAANKSALSEKEILDKYQNIYGAADV KGLQIS
NLKVDKKDDSTYSFSYKAKMNTSLGELKDL SYKGTLD RNDGQTTINWQPNLVFPEMEG
NDKVSLTTQEAARGNIIDRNGEPLATTGK LKQLGVVPSKLG DGGEKTANIKAIASSFD
LTEDAINHAISQSWVQPDYFVPLKIIDGATPELPAGATI QEVDRRYPLGEASAQLIG
YVGDITAEDIDKNPELSSNGKIGRSGLEMAFDKDLRGT TGGKLSITDADGVEKKVLIE
HEVQNGKDIKLTIDAKAQKTAFDLSLGGKAGSTVATTPK TGDLLALASSPSYDPNKMTN
GISQEDYKAYEENPEQPFISR FATGYAPGSTFKMITAAI GLDNGTIDPNEVLTINGLK
WQKDSSWGSYQVTRVSDVSQVDLKTALIYSDNIYAAQ ETLKMGEKKLRTGLDKFIFGE
DLDLPI SMNPAQISNEDSFNSDILLADTGYGQGELLINPI QQAAMYSVFANNGTLVYP
KLIADKETKDKKNVIGETALQTI VPD LREVVDVNGTAHSL SALGIPLAAKTGTAEIK
EKQDVKGKENSFLFAFNPDNQGYMMVSMLENKEDD DSATKRASELLQYLNQNYQ"

```

ORIGIN

```

1 aaccatagtc aaaatgagca aagacatctg cttctataac aactagtgct
tctgaaagtt
61 gtgcaaaata ctgaggaatc acaatagcag gatccatatac tttgacttcg
tcatctaaat
121 aatcaaattg accattatga tgcacactga gtaattttaa atcgtaatct
ttatcggcta
181 aatagtcgat gatccgatcc tttcagaag cgatgtaacc gatttcgatg
ccttttaaaa
241 cacgattgcc aaaacgctta ttaagctat cgattgttg actgtacatt
tcataatcgg
301 ggatatcatc gactttagta acaggattgg ctaagtcaaa atgttcagtt
gtcacgacgt
361 aaccatcgta gtttgttaaa tagtcctcat ttcttgggag ttttgagact
actatatgcg
421 tttttttggt gatttacc aa catgtttaga cattttcctc taggaaaaaa
ttaactagca
481 ccacggggtt tattatgta gaataaacag gtataaatag tgaaataaag
gaatgacaag
541 caagagaagg aggaaaaaat gaaaagaagt gacaagcacg gcaaaaatcg
aacaggcgct
601 tatattgccc gcgcagtgat cttaatagca gctgcgggtg gcggttattt
ttactaccag
661 cactatcaag aaaccaagc agtagaagct ggagaaaaga cagttgagca

```

atttgtccaa

721 gctttgaaca agggagatta taacaaagct gcagaaatga catcaaaaaa
ggcggcaaat

781 aaaagtgcatt tatctgaaaa agagatctta gataaatacc agaatatata
cggtgctgct

841 gatgtcaaag gacttcagat atcgaatcta aaagtagata aaaaagacga
ttctacttac

901 agtttttcat ataaagcaaa gatgaatacc tcattagggtg aattgaaaga
tctttcttat

961 aaaggaacat tagacagaaa tgatgggtcaa accacgatca actggcaacc
caacttggtt

1021 tttccagaaa tggaaggaaa tgacaaagta agcctgacca cacaagaagc
agcaagaggg

1081 aatattatag atcgaaatgg tgaaccatta gcaacaacgg gcaaaactaaa
acaattagga

1141 gtcgttccaa gtaaacttgg agatggaggc gaaaaaacag ccaatatcaa
agcgattgct

1201 tctccttcg acttaacaga agatgctatc aatcacgca tttcaciaag
ctgggtacaa

1261 cccgattact ttgtcccatt gaaaatcatt gatggagcaa cgccagaact
tccagctgga

1321 gctaccattc aagaagtaga ccgacagatat tatcctttgg gtgaagcatt
tgctcagctg

1381 attggttacg tgggagatat cacagcagaa gatattgata agaattccaga
attaagcagt

1441 aatggaaaaa tcggtcgctc aggtttggag atggcttttg ataaggatct
tcgtgggaca

1501 acaggtggga aattaagcat tacagatgca gacggtgtag agaaaaagt
tctgatcgaa

1561 catgaagttc aaaatggcaa agatatcaaa ttgacaatcg atgcaagggc
acaaaaaaca

1621 gcttttgaca gtctaggagg aaaagctgga tcaactggtg cgacaacgcc
aaaaaccggt

1681 gatcttcttg cgcttgctag ctctccaagc tatgatccaa acaaaatgac
aaacgggatc

1741 tcacaagaag attacaaagc ttatgaagaa aatcctgaac agccattcat
cagccgattt

1801 gcgacaggtt atgctcctgg atctacgttt aaaatgatta cagcagcaat
cggctcgcac

1861 aacggcacta tcgatccaaa tgaagtgttg acgatcaacg ggcttaaatg
gcaaaaagac

1921 agttcttggg gatcttatca agtaacgcgt gtcagtgatg tatcacaagt
agacttaaaa

1981 actgctttga tctattccga taatatatat gcggcacaag aaacggtgaa
aatgggtgag

2041 aaaaaattgc gtacaggctt agataaatc atttttgggtg aagaccttga
tttgccaatt

2101 agtatgaatc cagcacaat ttctaatagaa gatagcttta actcagatat
cttgctagct

2161 gatactggat atggacaggg cgaacttcta attaactcta tccagcaagc
agcaatgtat

2221 tctgtttttg ccaacaatgg cacacttgtc tatcctaata tgattgcaga
taaagagaca

2281 aaagataaga agaatgtcat cggcgaaca gcattacaaa cgatcgtgcc
agatctgaga

2341 gaagttgtgc aagatgtaaa tggtagagca cattctcttt ctgctttagg
gattccggtg

2401 gcagcgaaaa ctggtacagc ggaaatcaaa gaaaaacagg atgtaaaggg
gaaagagaac

2461 agtttcttgt ttgctttcaa tctgataac caaggttata tgatggctcag
catgttgaa

```
2521 aataaagaag atgatgattc agcaacccaaa cgagcatcgg aactattgca
atacctcaac
2581 caaaattatc aataaaaaat tgcttttttaa gtacagtaaa aggactgtgg
cgttatcgtc
2641 acagtccttt tttcaataa acggttttca cgatgtctct ttcacaactt
cttttgatt
2701 tactcacact tcataaactt tttttgt
//
```

Nucleotide



Search

Display Settings: GenBank

Enterococcus faecium strain TCGE70411_2 PBP5 synthesis repressor-like (psr) gene, partial sequence; and ISEfm1 transposase, acetyltransferase, histidinol phosphate phosphatase, and penicillin-binding protein Pbp5 (pbp5) genes, complete cds

GenBank: JN208888.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS JN208888 5002 bp DNA linear BCT 03-OCT-2011

DEFINITION Enterococcus faecium strain TCGE70411_2 PBP5 synthesis repressor-like (psr) gene, partial sequence; and ISEfm1 transposase, acetyltransferase, histidinol phosphate phosphatase, and penicillin-binding protein Pbp5 (pbp5) genes, complete cds.

ACCESSION JN208888

VERSION JN208888.1 GI:347952186

KEYWORDS .

SOURCE Enterococcus faecium

ORGANISM [Enterococcus faecium](#)
Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Enterococcaceae; Enterococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 5002)
AUTHORS Novais,C., Silveira,E., Freitas,A.R., Escada,R., Coque,T.M. and Peixe,L.
TITLE High incidence of horizontal transfer of ampicillin resistance (pbp5) among CC17 Enterococcus faecium
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 5002)
AUTHORS Novais,C., Silveira,E., Freitas,A.R., Escada,R., Coque,T.M. and Peixe,L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (05-JUL-2011) Microbiology, REQUIMTE Pharmacy Faculty, Porto University, Rua Anibal Cunha, 164, Porto 4050-047, Portugal

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..5002
/organism="Enterococcus faecium"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="TCGE70411_2"
/db_xref="taxon:[1352](#)"
/country="Portugal"
/note="wild strain (70411) was a clinical isolate (urine) collected in 1997 and belonged to the CC17 cluster transconjugant"

gene <1..140
 /gene="psr"
misc_feature <1..140
 /gene="psr"
 /note="similar to PBP5 synthesis repressor"
CDS 449..1357
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="ISEfm1 transposase"
 /protein_id="[AEP33237.1](#)"
 /db_xref="GI:347952187"
 /translation="MRSSKYTEHYTDTFITFKEIMRTVSNYHNCVDPKIKNR
 RNTDQ
 LKQRDTVIIACVIWGIINGYTSQRATYRAVCSVLFPNGDFPSRSRFTLSSNLAYTIK
 IIRYFFIKKLTGKELVGIIDSFPSPLCKPVRNRQAKLLNQIAKVGYNSTKKSIFYGLK
 IHMIVTKTGFPIYISITNPGVHDVKVLETLSEEANLPNILGDKGYISHKIHEKLALKG
 ITISVPPRKNMDKSEKLDHSLGKQRKTVETVFSLEKLGQNFNSRSVKGLESRFES
 ILLAYSVLLSRAQRRFEGTLRYS LGY"
CDS 1413..1910
 /note="member of the Gnat family"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="acetyltransferase"
 /protein_id="[AEP33238.1](#)"
 /db_xref="GI:347952188"
 /translation="MNNQITLAYLDYDDL DALQVSVVSFYESFIDGADPLDM
 QGYLQ
 TQLTTEILAVELAQSTSKFIGIKDHQILIGYMKVNDKDAIEIQRLYLLKDYQNKGLG
 QRLLEANRYAKTKQKRYRLRTVYEKNHAGIRFYERHGFKKIGIKHFPLGKQDRICPI
 LEKEI"
CDS complement(1893..2630)
 /note="member of the HisJ family"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="histidinol phosphate phosphatase"
 /protein_id="[AEP33239.1](#)"
 /db_xref="GI:347952189"
 /translation="MTTEHFDLANPVTKVDDIPDYEMYSQTIDSLNKRFGNRV
 LKGIE
 IGYIASEKDRIIDYLADKDYDLKLLSVHHNGQFDYLDHDEVKMDPAIVIPQYFAQLSE
 ALVVIEADVFAHFDYGFVFGLSVAEFKQYEAQFLPILDQVIKKNLAFELNAKSAYLY
 DNLALYEYVIDLYLSRGGTLFSVSGDGHYLEHFRFHFDLDFALLKAKGVTELAIQKG
 KRIMVPLPVQKNVLSIKSEDFLDFFF"
gene 2834..4870
 /gene="pbp5"
CDS 2834..4870
 /gene="pbp5"
 /note="involved in ampicillin resistance"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="penicillin-binding protein Pbp5"
 /protein_id="[AEP33240.1](#)"

/db_xref="GI:347952190"

/translation="MKRSDKHGKNRTGAYIAGAVILIAAAGGGYFYQHYQET

QAVEA

GEKTVEQFVQALNKGVDYNKAAEMTSKKAANKSALSEKEILDKYQNIYGAADVKGQLQIS
NLKVDKKDDSTYSFSYKAKMNTSLGELKDL SYKGTLDNRNDGQTTINWQPNLVFPEMEG
NDKVSLTTQEAARGNIIDRNGEPLATTGKCLKQLGVVPSKLGDGGEKTANIKAIASSFD
LTEDAINQAISQSWVQPDYFVPLKIIDGATPELPAGATIOEVDGRYYPLEAAAQLIG
YVGDITAEDIDKNPELSSNGKIGRSGLEMAFDKDLRGTGKLSITDADGVEKKVLIE
HEVQNGKDIKLTIDAKAQKTAFDLSGGKAGSTVATPKTGDLLALASSPSYDPNKMTN
GISQEDYKAYEENPEQPFISR FATGYAPGSTFKMITAAIGLDNGTIDPNEVLTINGLK
WQKSSWGSYQVTRVSDVSQVDLKTALIYSDNIYTAQETLKMGEKKFRTGLDKFIFGE
DLDLPI SMNPAQISNEDSFNSDILLADTGYGQGELLINPIQQAAMYSVFANNGTLVYP
KLIADKETKDKKNVIGETALQTI VPDLREVVQDVNGTAHSL SALGIPLAAKTGTAEIK

EKQDVKGKENSFLFAFNPDNQGYMMVSML ENKEDDDSATKRASELLQYLNQNYQ"

ORIGIN

1 caaagctatc tctcagcagc tgaagacgt aacttcaata ttcaagctac
ccaaagcggg
61 tgggaaatta cttggtagta tccaaacgaa cctccagaa agtgtgcttc
tggattgtgg
121 tatggatttc ctcaaagaca ataataaaaa gatcgatata ttatccgtac
cagtagacgg
181 cagttgggac ttcaacgaca atacgccttc cggaagtgtt ttggaattag
attgaccaa
241 aaaccaagaa gcaatcaaaa aatttctgaa taattaagta aagaaaataa
aagaagttag
301 aaataacaat ctatgttatg ttctgacttc ttttattacc cgtggtgcta
gttaattttt
361 tcctagagga aatgtctaa acatgttggt aatcaacaa aaaaacgcat
atagtagtct
421 caaaactccc aagaaatgag gactacatat gcgttcatca aatatactg
aacattatac
481 agatactttt ataacattca aggaaattat gagaactggt tctaacatat
accacaattg
541 tgtaccagat aagattaata accgaagaaa tactgatcaa ctgaagcaac
gcgatacagt
601 gattattgct tgtgttatat ggggcataat taatggctat actagccaaa
gagccacgta
661 tagagcgggt tgttccgtct tatttcttaa tggtagcttt cctagtagga
gtcgattcac
721 tcgcttaagt tcaaacttag cttacactat caagattatt cgatactttt
tcatcaagaa
781 gtcacccaaa ggtgaactag tcggaattat agatagtttt cctagtccat
tatgtaaacc
841 agttagaaat agacaagcaa aactattgaa tcaaatagcc aaagttggct
ataactcaac
901 aaaaaaatct tatttttatg gtcttaaaat tcatatgatc gttactaaga
ctggctttcc
961 gattacttac tcaatcacga atccaggtgt ccatgacgtg aaagtgttag
agactttatc
1021 ggaagaagcg aatcttccca atatcctagg ggacaaagga tatattagcc

ataaaatcca

1081 tgaaaagctt gcccttaagg gcattactat atccgttccg ccacgtaaaa
acatggataa

1141 atcagaaaaa ctagaccaca gcttacttgg aaaacaaaga aaaacagttg
agactgtttt

1201 ttcttcctta gaaaaattag gttgtcaaaa tttcaactca cgttctgtta
aagggtctaga

1261 gagtagatth gaaagcatat tactggctta cagtgttcta ttaagtcgag
cacaacgacg

1321 ttttgaagga actttgagat attcttttagg atattaaaat taactagcac
cacgggtgat

1381 ttatagtata ctatgtcaaa aggaggagtt agatgaacaa tcaaatcaca
ctagcgtatt

1441 tagattatga tgatctagat gctttacaag ttgtaagtgt tgtcagtttt
tatgaatcgt

1501 ttatcgatgg cgcagatcca cttgatatgc aaggatattt acagacacaa
ttgacaactg

1561 aaatattggc agtagaattg gcacagtcaa ccagtaaatt tattggtatt
aaggatcatc

1621 aaatactcat tggttatatg aaagtcaatg atgaaaaaga tgctatagag
attcaacggc

1681 tctatctgct caaagattat caaaacaaag ggtagggca acggttactc
gatgaagcga

1741 atcgttatgc taaaacgaaa caaaaacggt atttacgttt gactgtttat
gaaaaaaatc

1801 atgcaggtat tcgtttttat gaacgtcatg gatttaaaaa aatcgggatc
aaacattttc

1861 ctttaggaaa acaagatcgt atttgtccga ttttagaaaa agaaatctaa
aaaaacgtcc

1921 tcacttttga tgctgaggac gtttttttgg actggtaatg gaaccataat
tcgctttcct

1981 ttttgataaa tcgctaattc cgtcacacct tttgctttta acagagcaaa
aagatcatcg

2041 aaatggaaac ggaaatgttc aaggtaatgc ccatctgatc caacactaaa
caaggtacca

2101 ccacgtgaaa gatataaatc gatgacatat tcatataacg ctaaattgtc
atacaagtaa

2161 gcgctcttag catttaattc gaatgccaat ttatttttaa ttacttgatc
tagaatcgg

2221 aaaaactgcg cttcatattg tttaaattca gcaacggata gaccaatac
ccgaaaacca

2281 tagtcaaaat gagcaaagac atctgcttct ataacaacta gtgcttctga
aagttgtgca

2341 aaatactgag gaatcacaat agcaggatcc atatctttga cttcgtcatg
taaataatca

2401 aattgacat tatgatgcac actgagtaat tttaaatcgt aatctttatc
ggctaaatag

2461 tcgatgatcc gatccttttc agaagcgatg taaccgattt cgatgccttt
taaaacacga

2521 ttgcaaaaac gcttatttaa gctatcgatt gtttgactgt acatttcata
atcggggata

2581 tcatcgactt tagtaacagg attggctaag tcaaaatggt cagttgtcac
gacgtaacca

2641 tcgtagtttg ttaaatagtc ctcatcttct gggagttttg agactactat
atcggttttt

2701 ttgttgatth accaacatgt ttagacattt tcctctagga aaaaattaac
tagcaccacg

2761 ggttttatta tgttagaata aacaggtata aatagtgaaa taaaggaatg
acaagcaaga

2821 gaaggaggaa aaaatgaaaa gaagtgacaa gcacggcaaa aatcgaacag
gcgcttatat

2881 tgccggcgca gtgatcttaa tagcagctgc ggggtggcggt tatttttact
accagcacta
2941 tcaagaaacc caagcagtag aagctggaga aaagacagtt gagcaatttg
tccaagcttt
3001 gaacaaggga gattataaca aagctgcaga aatgacatca aaaaaggcgg
caaataaaag
3061 tgcattatct gaaaaagaga tcttagataa ataccagaat atatacgggtg
ctgctgatgt
3121 caaaggactt cagatatcga atctaaaagt agataaaaaa gacgattcta
cttacagttt
3181 ttcataataa gcaaagatga atacctcatt aggtgaattg aaagatcttt
cttataaagg
3241 aacattagac agaaatgatg gtcaaaccac gatcaactgg caacccaact
tggtttttcc
3301 agaaatggaa ggaaatgaca aagtaagcct gaccacacaa gaagcagcaa
gagggaaat
3361 tatagatcga aatggatgaac cattagcaac aacaggcaaa ctaaaacaat
taggagtcgt
3421 tccaagtaaa cttggagatg gaggcgaaaa aacagccaat atcaaagcga
ttgcttctc
3481 cttcgactta acagaagatg ctatcaatca ggcgatttca caaagctggg
tacaacccga
3541 ttactttgtc ccattgaaaa tcattgatgg agcaacgcca gaacttccag
ctggagctac
3601 cattcaagaa gtagacggca gatattatcc tttgggtgaa gcagctgctc
agctgattgg
3661 ttacgtggga gatatcacag cagaagatat tgataagaat ccagaattaa
gcagtaatgg
3721 aaaaatcggg cgctcaggtt tggagatggc ttttgataag gatcttcgtg
ggacaacagg
3781 tgggaaatta agcattacag atgcagacgg tgtagagaaa aaagttctga
tcgaacatga
3841 agttcaaaat ggcaaagata tcaaattgac aatcgatgcg aaggcacaaa
aaacagcttt
3901 tgacagtcta ggaggaaaag ctggatcaac tgttgcgaca acgcaaaaa
ccggtgatct
3961 tcttgcgctt gctagctctc caagctatga tccaaacaaa atgacaaaacg
ggatctcaca
4021 agaagattac aaagcttatg aagaaaatcc tgaacagcca ttcacagcc
gatttgcgac
4081 aggttatgct cctggatcta cgtttaaaat gattacagca gcaatcggtc
tcgacaacgg
4141 cactatcgat ccaaatgaag tgttgacgat caacgggctt aaatggcaaa
aagacagttc
4201 ttggggatct tatcaagtaa cgcgtgtcag tgatgtatca caagtagact
taaaaactgc
4261 tttgatctat tccgataata tatatacggc acaagaaacg ttgaaaatgg
gtgagaaaaa
4321 atttcgtaca ggcttagata aattcatttt tggatgaagac cttgatttgc
caattagtat
4381 gaatccagca caaatttcta atgaagatag cttaactca gatatcttgc
tagctgatac
4441 tggatagga cagggcgaac ttctaattaa tcctatccag caagcagcaa
tgtattctgt
4501 ttttgccaac aatggcacac ttgtctatcc taaattgatt gcagataaag
agacaaaaga
4561 taagaagaat gtcatcggcg aaacagcatt acaaacgatc gtgccagatc
tgagagaagt
4621 tgtgcaagat gtaaatggta cagcacattc tctttctgct ttagggattc
cgttggcagc
4681 gaaaactggg acagcggaaa tcaaagaaaa acaggatgta aaggggaaag

agaacagttt

4741 cttgtttgct ttcaatcctg ataaccaagg ttatatgatg gtcagcatgt
tgaaaaataa

4801 agaagatgat gattcagcaa ccaaacgagc atcggaacta ttgcaatacc
tcaaccaaaa

4861 ttatcaataa aaaattgctt ttaagtaca gtaaaaggac tgtggcgta
tcgtcacagt

4921 ccttttttca aataaacggt ttcacgatg tctctttcac aacttctttt
tgatttactc

4981 acacttcata aacttttttt gt

//

Nucleotide

Search

Display Settings: GenBank

Enterococcus faecium strain SN194 insertion sequence ISEf1, complete sequence

GenBank: JN208886.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS JN208886 4212 bp DNA linear BCT 03-OCT-2011

DEFINITION Enterococcus faecium strain SN194 insertion sequence ISEf1, complete sequence.

ACCESSION JN208886

VERSION JN208886.1 GI:347952179

KEYWORDS .

SOURCE Enterococcus faecium

ORGANISM [Enterococcus faecium](#)
Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Enterococcaceae; Enterococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 4212)
AUTHORS Novais,C., Silveira,E., Freitas,A.R., Escada,R., Coque,T.M. and Peixe,L.
TITLE High incidence of horizontal transfer of ampicillin resistance (pbp5) among CC17 Enterococcus faecium
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 4212)
AUTHORS Novais,C., Silveira,E., Freitas,A.R., Escada,R., Coque,T.M. and Peixe,L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (05-JUL-2011) Microbiology, REQUIMTE Pharmacy Faculty, Porto University, Rua Anibal Cunha, 164, Porto 4050-047, Portugal

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..4212
/organism="Enterococcus faecium"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="SN194"
/isolation_source="residual water from a piggery"
/db_xref="taxon:[1352](#)"
/country="Portugal"
/collection_date="2006"
/note="ampicillin resistant"

[gene](#) <1..433
/gene="psr"

[misc_feature](#) <1..433
/gene="psr"
/note="similar to PBP5 synthesis repressor"

[mobile_element](#) 632..1978
/mobile_element_type="insertion sequence:ISEf1"

[repeat_region](#) 632..651
/note="IR left"

/rpt_type=inverted
CDS 739..1917
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="transposase ISEf1"
 /protein_id="AEP33232.1"
 /db_xref="GI:347952180"
 /translation="MNDFTTEIVQTLVTKGDLNELFRSHLEKAINLLRTELT

AFLDY

EKYDRGTGFNSGNSRNGSYFRSIRKTEYEGELTLEIPRDRNGEFKQQTLPAYKRTNDTLET

TIIHLFEKGVMTSEIADLIEKMYGHHYTPQTMSNMTKVLTEEVNAFKSRALNDKYVAI

FMDATYIPLKRQTVSKEAIYIAIGIREDTKEVLSYAIAPTESTYVWNEQLDINSRG

VQEVLLFITDGLKGMKDTIHQIYPKAKYQHCCIHVSRNIAHKVRVKDRKEICDDFKAV

YQANSKEEANTFLSGMIEKWKKNYPKVTSLEIENQDLLTFYDFPPSIRRTIYSTNLIE

SFNKQIKRYSRRKEQFQNEESLERFLVSIFDTYNQKFLNRSHKGFQQVTDTLVSMFTE

"

repeat_region 1908..1950
 /note="IR right"
 /rpt_type=inverted

gene 2041..4080
 /gene="pbp5"

CDS 2041..4080
 /gene="pbp5"
 /note="involved in ampicillin resistance"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="penicillin-binding protein Pbp5"
 /protein_id="AEP33233.1"
 /db_xref="GI:347952181"
 /translation="MKRSDKHGKNRTGAYIAGAVILIAAAGGGYFYYQHYQET

QAVEA

GEKTVEQFVQALNKGDYNKAAEMTSKKAANKSALSEKEILDKYQNIYGAADVKGGLQIS

NLKVDDKDDSTYSFSYKAKMNTSLGELKDLKSYKGTLDNRNDGQTTINWQPNLVFPEMEG

NDKVSLTTQEAARGNIIDRNGEPLATTGKLGKQLGVVPSKLGDGGEKTANIKAIASSFD

LTEDAINQAISQSWVQPDYFVPLKIIDGATPELPAGATIQEVDRRYPLGEAAAQLIG

YVGDITAEDIDKNPELSSNGKIGRSGLEMAFDKDLRGTGGKLSITDADGVEKKVLIE

HEVQNGKDIKLTIDAKAQKTAFDLSLGGKAGSTVATTPKTGDLALASSPSYDPNKMTN

GISQEDYKAYEEDPEQPFISR FATGYAPGSTFKMITAAIGLDNGTIDPNEVLTINGLK

WQKSSWSGSYQVTRVSDVSDVLDKTSLSIYSDNIYMAQETLKMGEKKLRTGLDKFIFG

EDLDLPISMNPAQISNEDSFNSDILLADTGYGQGELLINPIQQAAMYSVFANNGTLVY

PKLIADKETKDKKNVIGETAVQTTIVPDLREVVDVNGTAHSLSALGIPLAAKTGTAEI

KEKQDVKGKENSFLFAFNPDNQGYMMVSMLENKEDDDSATKRASELLQYLNQNYQ"

ORIGIN

1 aatgcagctt actcttatgg gggagttgat ttattaaatc aacattaata

ggaaaatttc

61 aaatttgaag ctccctatta tgcaagtatc acatttcaag attttatcga
ttgctgtaat

121 gaactgtttc ctggtggagt caagatcgat gcagaaaaat ctctagattt
agatggcgta

181 tatataaaca aaggagagca agtgatggat ggtaataactt tactccagta
tgctcgattt

241 cgggaagaca aagaaggaga cttcgggagg atcagaaggc agcagcaagt
gatcaaagct

301 atctctcagc agctgaaaga cgtaacttca atattcaagc taccceaagc
ggttgggaaa

361 ttacttggtg gtatccaaac gaaccttcca gaaagtgtgc ttctggattg
tggatggat

421 ttctctaaag acaataataa aaagatcgat acattatccg taccagtaga
cggcagttgg

481 gacttcaacg acaatacgcc ttccggaagt gttctggaat tagatttgac
caaaaaccaa

541 gaagcaatca aaaaatttct gaataattaa gtaaagaaaa taaaagaagt
tagaataaac

601 aatctatggt atgttctgac ttcttttatt agagagtgtg aatattttg
tgtaaatgaa

661 aaaatccata caaaaaagga agtcgcttct gtagaataaa gttaacgaca
accaattcac

721 agaaaagagg acttccctat gaatgatattt actacagaaa ttgtgcaaac
tctagtcact

781 aaaggcgatt taaatgaatt attccgttcg cacttagaaa aagcgataaa
cacactccta

841 cggactgaat taacggcttt tttagattac gaaaaatatg atcgactgg
ttttaattca

901 ggtaattcga gaaacggttc ttactttcga tcaatcaaaa ccgaatatgg
tgaattaaca

961 ttggaaatac ctagagatcg taatggtgag tttaacaac aaactttacc
agcctacaaa

1021 agaacaacg atacattgga aaccactatt atccatttat tcgaaaaagg
tgttacgatg

1081 tctgaaattg ctgatttgat cgaaaaaatg tacggtcac actatactcc
acaaccatg

1141 tccaacatga ctaaagttct gactgaagaa gtaaatgcct ttaaatccag
agccttaaat

1201 gataagtatg tcgctatattt tatggacgct acttacattc cactaaaacg
tcaaaccgta

1261 tccaaagaag cgatttatat tgccattggt atacgagaag acggcactaa
agaagtactg

1321 agttatgoga ttgctccaac tgaatcaaca tacgtttgga atgagctgct
acaggatatt

1381 aactccagag gaggttcaaga agtcttgctt tttattacgg acggcttaaa
aggcatgaaa

1441 gatactatcc atcaaattta tcctaaagca aaatatcagc attgttgtat
ccatgtatct

1501 cgtaacatcg ctcataaagt acgtgtcaaa gaccgaaaag aatctgtga
tgactttaag

1561 gctgtttatc aagctaactc aaaagaagaa gcgaatacct tcttatccgg
catgattgag

1621 aatggaaga aaaactatcc taaagtgcg cagtcactca tagaaaacca
agacttatta

1681 actttttatg attttccacc tagcattcgt agaaccattt actcaaccaa
tctaatacgag

1741 tctttcaata agcaaattaa aagatacagc cgtagaaaag agcagtttca
aatgaagaa

1801 tcactagaac gctttctagt cagcattttt gatacataca atcaaaaatt
tctaaacaga

1861 agccataaag gttttcaaca ggtaaccgat acattagttt caatgtttac
tgagtaacta
1921 attatthttgc aggaggacaa tttatttaca caaaattatt gacgctccct
tttattatgt
1981 tagaataaac aggtataaat agtgaaataa aggaatgaca agcaagagaa
ggaggaaaaa
2041 atgaaaagaa gtgacaagca cggcaaaaat cgaacaggcg cttatattgc
cggcgcagtg
2101 atcttaatag cagctgcggg tggcggttat tttactacc agcactatca
agaaaccaa
2161 gcagtagaag ctggagaaaa gacagttgag caatttgtcc aagctttgaa
caagggagat
2221 tataacaaag ctgcagaaat gacatcaaaa aaggcggcaa ataaaagtgc
attatctgaa
2281 aaagagatct tagataaata ccagaatata tacggtgctg ctgatgtcaa
aggacttcag
2341 atatcgaatc taaaagtaga taaaaaagac gattctactt acagtthttc
atataaagca
2401 aagatgaata cctcattagg tgaattgaaa gatctthttt ataaaggaac
attagacaga
2461 aatgatggtc aaactacgat caactggcaa cccaacttgg tthttccaga
aatggaagga
2521 aatgacaaaag taagcctgac cacacaagaa gcagcaagag ggaatattat
agatcgaaat
2581 ggtgaacat tagcaacaac aggcaaaacta aaacaattag gagtcttcc
aagtaaactt
2641 ggagatggag gcgaaaaaac agccaatatc aaagcgattg cttctctct
cgacttaaca
2701 gaagatgcta tcaatcaggc gatttcacaa agctgggtac aaccgatta
ctthgtccca
2761 ttgaaaatca ttgatggagc aacgccagaa cttccagctg gagctaccat
tcaagaagta
2821 gaccgcagat attatcctth gggatgaagca gctgctcagc tgattggtha
cgtgggagat
2881 atcacagcag aagatattga taagaatcca gaattaagca gtaatggaaa
aatcggctcg
2941 tcaggtthtg agatggctth tgataaggat cttcgtggga caacaggtgg
gaaattaagc
3001 attacagatg cagacgggtg agagaaaaa gttctgatcg aacatgaagt
tcaaaatggc
3061 aaagatatca aattgacaat cgatgcgaag gcacaaaaa cagctthtga
cagtctagga
3121 ggaaaagctg gatcaactgt tgcgacaacg ccaaaaaccg gtgatcttht
tgcgcttgct
3181 agctctccaa gctatgatcc aaacaaaatg acaaacggga tctcacaaga
agattacaaa
3241 gcttatgaag aagatcctga acagccattc atcagccgat ttgcgacagg
ttatgctct
3301 ggatctacgt ttaaatgat tacagcagca atcgggtctg acaacggcac
tatcgatcca
3361 aatgaagtgt tgacgatcaa cgggctthaa tggcaaaaag acagttcttg
gggatcttat
3421 caagtaacgc gtgtcagtga tgatgtatca caagtagact taaaaactt
ttgatctat
3481 tccgataata tatatatggc acaagaaacg ttgaaaatgg gtgagaaaa
attacgtaca
3541 ggcttagata aattcattth tggatgaagc cttgatttgc caattagat
gaatccagca
3601 caaatttcta atgaagatag ctthaaactca gatatcttgc tagctgatac
tggatatgga
3661 caggcgaac ttctaattaa tcctatccag caagcagcaa tgtattctgt

ttttgccaac

3721 aatggcacac ttgtctatcc taaattgatt gcagataaag agacaaaaga
taagaagaat

3781 gtcatcggcg aaacagcagt acaaacgatac gtgccagatac tgagagaagt
tgtgcaagat

3841 gtaaatggta cagcacattc tctttctgct ttagggattc cgttggcagc
gaaaactggt

3901 acagcggaaa tcaaagaaaa acaggatgta aaggggaaag agaacagttt
cttgtttgct

3961 ttcaatcctg ataaccaagg ttatatgatg gtcagcatgt tggaaaataa
agaagatgat

4021 gattcagcaa ccaaacgagc atcggaaacta ttgcaatacc tcaacaaaa
ttatcaataa

4081 aaaattgctt ttaagtaca gtaaaaggac tgtggcggtta tcgtcacagt
ccttttttca

4141 aataaacggt tttcacgatg tctctttcac aacttctttt tgatttactc
aacttcata

4201 aacttttttt gt

//

Nucleotide

Search

Display Settings: GenBank

Enterococcus faecium strain TCGEE49_1 insertion sequence ISEfa11, complete sequence

GenBank: JN208884.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS JN208884 5858 bp DNA linear BCT 03-OCT-2011
DEFINITION Enterococcus faecium strain TCGEE49_1 insertion sequence ISEfa11, complete sequence.
ACCESSION JN208884
VERSION JN208884.1 GI:347952170
KEYWORDS .
SOURCE Enterococcus faecium
ORGANISM [Enterococcus faecium](#)
Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Enterococcaceae; Enterococcus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 5858)
AUTHORS Novais,C., Silveira,E., Freitas,A.R., Escada,R., Coque,T.M. and Peixe,L.
TITLE High incidence of horizontal transfer of ampicillin resistance (pbp5) among CC17 Enterococcus faecium
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 5858)
AUTHORS Novais,C., Silveira,E., Freitas,A.R., Escada,R., Coque,T.M. and Peixe,L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (05-JUL-2011) Microbiology, REQUIMTE Pharmacy Faculty, Porto University, Rua Anibal Cunha, 164, Porto 4050-047, Portugal
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..5858
/organism="Enterococcus faecium"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="TCGEE49_1"
/db_xref="taxon:[1352](#)"
/country="Portugal"
/note="wild strain (E49) was isolated from hospital residual water in 2001 (Porto, Portugal) and belonged to ST132/CC17 transconjugant"
[misc_feature](#) <1..605
/note="similar to ISEfml transposase"
[CDS](#) 661..1158
/note="member of the Gnat family"
/codon_start=1
/transl_table=[11](#)

/product="acetyltransferase"
/protein_id="AEP33225.1"
/db_xref="GI:347952171"
/translation="MNNQITLAYLDYDDLALQVVSVVSFYESFIDGADPLDM

QGYLQ

TQLTTEILAVELAQSTSKFIGIKDHQILIGYMKVNDEKDAIEIQRLYLLKDYQNKGLG

QRLLEANRYAKTKQKRYLRLTVYEKNHAGIRFYERHGFKKIGIKHFPLGKQDRICPI

LEKEI"

CDS

complement(1141..1878)

/note="member of the HisJ family"

/codon_start=1

/transl_table=11

/product="histidinol phosphate phosphatase"

/protein_id="AEP33226.1"

/db_xref="GI:347952172"

/translation="MTTEHFDLANPGIFVDNITDEEMYSQTIDSLNKRFGNRD

LKGIE

IGYIASEKDRIIDYLADKDYDLKLLSVHHNGQFDYLDDEVKMDPAIVIPQYFAQLSE

ALVVIEADVFAHFQYDFRVFGLSVAEFKQYEAQFLPILDQVIKNKLA FELNAKSAYLY

DNLALYEYVIDLYLSRGGTLFSVSGDGHYLEHFRFHFDDL FALKAKGVTELAIQKG

KRIMVPLPVQKNVLSIKSEDEVFLDFFF"

gene

2082..4118

/gene="pbp5"

CDS

2082..4118

/gene="pbp5"

/note="involved in ampicillin resistance"

/codon_start=1

/transl_table=11

/product="penicillin-binding protein Pbp5"

/protein_id="AEP33227.1"

/db_xref="GI:347952173"

/translation="MKRSDKHGKNRTGAYIAGAVILIAAAGGGYFYYQHYQET

QAVEA

GEKTVEQFVQALNKG DYNKAAEMTSKKAANKSALSEKEILDKYQNIYGAADV KGLQIS

NLKVDDKDDSTYSFSYKAKMNTSLGELKDL SYKGTLDNRNDGQTTINWQPNLVFPEMEG

NDKVSLTTQEAARGNIIDRNGEPLATTGK LKQLGVVPSKLG DGGEKTANIKAIASSFD

LTEDAINQAISQSWVQPDYFVPLKIIDGATPELPAGATIQEVDGRYYPLGEAAAQLIG

YVGDITAEDIDKNPELSSNGKIGRSGLEMAFDKDLRGTTGGKLSITDADGVEKKVLIE

HEVQNGKDIKLTIDAKAQKTA FDSLGGKAGSTVATTPKGTGDL LALASSPSYDPNKMTN

GISQEDYKAYEEDPEQPFISR FATGYAPGSTFKMITAAIGLDNGTIDPNEVLTINGLK

WQKSSWSGSYK VTRVSDVSQVDLKTAL IYSDNIYAAQETLKMGEKKFRTGLDKFIFGE

DLDLPI SMNPAQISNEDSFNSDILLADTGYGQGELLINPIQQAAMYSVFANNGTLVYP

KLIADKETKDKKNVIGETALQTI VPDLREVVQDVNGTAHSLSALGIPLAAKTGTAEIK

EKQDVKGKENSFLFAFNPDNQGYMMVSML ENKEDDDSATKRASELLQYLNQNYQ"

repeat_region

4138..4145

mobile_element /note="target site duplication"
4146..5659
/mobile_element_type="insertion sequence:ISEfall"
repeat_region 4146..4195
/rpt_type=inverted
CDS complement(4228..5523)
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="transposase ISEfall"
/protein_id="AEF33228.1"
/db_xref="GI:347952174"
/translation="MNDSIKKMLRITEKDLMITEVSYETLQKKKTLVVDVLS

PTPRA

CRSCGSTVVDGNGKAIIVKNGKKETIVRFEQYNHMPLVMRLKKQRYTCKNCRTHWTAQ

SYFVQPRHSIANHVRYKIASLLTEKVSLSFIAKSCQVSLTTVIRTLKEFKSYLPKQSK

KILPRVLMVDEFRRSHASIEDKMSFICADGETGKLIDVLPTRKLPRLTSYFLGCTNPEE

VEFLVTDMNAAYFQLTKRVLPNAKVVIDRFHIVKHMNQAFNELRIREMNELRKAGQKS

QAEKLLKNWRFLKLRANINHYEYKTKWSFRAPKYPFLEAMMIDRLLLEFSPPLKEYA

PPFHELVEAFRDKDPDLFFSLLAELPETLDDSFREKLQNLTYEEGITNAMIYPYSNG

KIEAKNTHIKTMKRVSYGFKSFENMRIRIFLINQLINVR"

repeat_region 5610..5659

/rpt_type=inverted

repeat_region 5660..5667

/note="target site duplication"

ORIGIN

1 aagagtatag atcctatttc atcaagaagc tcaccaaagg tgaactagtc
ggaattatag

61 atagttttcc tagtccatta tgtaaaccag ttagaaatag acaagcaaaa
ctattgaatc

121 aaatagccaa agttggctat aactcaacaa aaaaatctta tttttatggt
cttaaaattc

181 atatgatcgt tactaagact ggctttccga ttacttactc aatcacgaat
ccagtggtcc

241 atgacgtgaa agtgtagag actttatcgg aagaagcgaa tcttcccaat
atcctagggg

301 acaaaggata tattagccat aaaatccatg aaaagcttgc ccttaagggc
attactatat

361 ccgttccgcc acgtaaaaac atggataaat cagaaaaact agaccacagc
ttacttgga

421 acaaaagaaa aacagttgag actgtttttt cttccttaga aaaattaggt
tgtcaaaatt

481 tcaactcacg ttctgttaaa gggctagaga gtagatttga aagcatatta
ctggcttaca

541 gtgttctatt aagtcgagca caacgacgtt ttgaaggac tttgagatat
tctttaggat

601 attaaaatta actagcacca cgggtgattt atagtatact atgtcaaaag
gaggagttag

661 atgaacaatc aatcacact agcgtattta gattatgatg atctagatgc
tttacaagtt

721 gtaagtgttg tcagttttta tgaatcgttt atcgatggcg cagatccact
tgatatgcaa

781 ggatatttac agacacaatt gacaactgaa atattggcag tagaattggc
acagtcaacc

841 agtaaattta ttggtattaa ggatcatcaa atactcattg gttatatgaa
agtcaatgat

901 gaaaaagatg ctatagagat tcaacggctc tatctgctca aagattatca
aaacaaaggg
961 ttagggcaac ggttactcga tgaagcgaat cgttatgcta aaacgaaaca
aaaacgttat
1021 ttacgtttga ctgtttatga aaaaaatcat gcaggtattc gtttttatga
acgtcatgga
1081 tttaaaaaaa tcgggatcaa acattttcct ttaggaaaac aagatcgtat
ttgtccgatt
1141 ttagaaaaag aaatctaaaa aaacgtcctc acttttgatg ctgaggacgt
ttttttggac
1201 tggtaatgga accataattc gctttccttt ttgataaatc gctaattccg
tcacaccttt
1261 tgcttttaac agagcaaaaa gatcatcgaa atggaaacgg aaatggtcaa
ggtaatgccc
1321 atctgatcca aactaaaca aggtaccacc acgtgaaaga tataaatcga
tgacatattc
1381 atataacgct aaattgtcat acaagtaagc gctcttagca ttaattcga
atgccaat
1441 atttttaatt acttgatcta gaatcggtaa aaactgcgct tcatattggt
taaattcagc
1501 aacggataga ccaaatacc gaaaaccata gtcaaatga gcaaagacat
ctgcttctat
1561 aacaactagt gcttctgaaa gttgtgcaaa atactgagga atcacaatag
caggatccat
1621 atctttgact tcgtcatcta aataatcaaa ttgaccatta tgatgcacac
tgagtaattt
1681 taaatcgtaa tctttatcgg ctaaatagtc gatgatccga tccttttcag
aagcgatgta
1741 accgatttcg atgcctttta aatcacgatt gccaaaacgc ttatttaagc
tatcgattgt
1801 ttgactgtac atttcttctg cggtgatatt gtcgacgaaa atacctggat
tggctaagtc
1861 aaaatgttca gttgtcacga cgtaaccatc gtagtttggt aaatagtctc
catttcttgg
1921 gagttttgag actactatat gcgttttttt gttgatttac caacatggtt
agacattttc
1981 ctctaggaaa aaattaacta gcaccacggg ttttttcatt ttagaataaa
caggataaaa
2041 tagtgaatta aaggaatggc aagcaagcga aggaggaaaa aatgaaaaga
agtgacaagc
2101 acggcaaaaa tcgaacaggc gcttatatcg ccggcgcagt gatcttaata
gcagctgagg
2161 gtggcgggta tttttactac cagcactatc aagaaacca agcagtagaa
gctggagaaa
2221 agacagttga gcaatttgtc caagctttga acaagggaga ttataacaaa
gctgcagaaa
2281 tgacatcaaa aaaggcggca aataaaaagt cattatctga aaaagagatc
ttagataaat
2341 accagaatat atacggtgct gctgatgtca aaggacttca gatatcgaat
ctaaaagtag
2401 ataaaaaaga cgattctact tacagttttt catataaagc aaagatgaat
acctcattag
2461 gtgaattgaa agatctttct tataaaggaa cattagacag aaatgatggt
caaaccacga
2521 tcaactggca acccaacttg gtttttccag aaatggaagg aaatgacaaa
gtaagcctga
2581 ccacacaaga agcagcaaga gggaaatatta tagatcgaaa tggatgaacca
ttagcaacaa
2641 cgggcaaact aaaacaatta ggagtcgctc caagtaaact tggagatgga
ggcgaaaaaa
2701 cagccaatat caaagcgatt gcttcctcct tcgacttaac agaagatgct

atcaatcagg

2761 cgatttcaca aagctgggta caacccgatt actttgtccc attgaaaatc
attgatggag
2821 caacgccaga acttccagct ggagctacca ttcaagaagt agacggcaga
tattatcctt
2881 tgggtgaagc agctgctcag ctgattgggt acgtgggaga tatcacagca
gaagatattg
2941 ataagaatcc agaattaagc agtaatggaa aaatcggtcg ctcaggtttg
gagatggctt
3001 ttgataagga tcttcgtggg acaacagggt ggaaattaag cattacagat
gcagacgggtg
3061 tagagaaaaa agttctgatc gaacatgaag ttcaaaatgg caaagatata
aaattgacta
3121 tcgatgcgaa ggcacaaaaa acagcttttg acagtctagg aggaaaagct
ggatcaactg
3181 ttgcgacaac gccaaaaacc ggtgatcttc ttgcgcttgc tagctctcca
agctatgatc
3241 caaacaaaat gacaaacggg atctcacaag aagattaca agcttatgaa
gaagatcctg
3301 aacagccatt catcagccga tttgcgacag gttatgctcc tggatctacg
tttaaaatga
3361 ttacagcagc aatcgggtctc gacaacggca ctatcgatcc aaatgaagtg
ttgacgatca
3421 acgggcttaa atggcaaaaa gacagttctt ggggatctta taaagtaacg
cgtgtcagtg
3481 atgtatcaca agtagactta aaaactgctt tgatctattc cgataatata
tatgcggcac
3541 aagaacggt gaaaatgggt gagaaaaaat ttcgtacagg cttagataaa
ttcatttttg
3601 gtgaagacct tgatttgcca attagtatga atccagcaca aatttcta
gaagatagct
3661 ttaactcaga tatcttgcta gctgatactg gatatggaca gggcgaactt
ctaattaatc
3721 ctatccagca agcagcaatg tattctggtt ttgccaaaca tggcacactt
gtctatccta
3781 aattgattgc agataaagag acaaaaagata agaagaatgt catcggcgaa
acagcattac
3841 aaacgatcgt gccagatctg agagaagttg tgcaagatgt aaatggtaca
gcacattctc
3901 tttctgcttt agggattccg ttggcagcga aaactggtac agcggaaatc
aaagaaaaac
3961 aggatgtaaa ggggaaagag aacagtttct tgtttgcttt caatcctgat
aaccaagggt
4021 atatgatggg cagcatggtg gaaaataaag aagatgatga ttcagcaacc
aaacgagcat
4081 cggaaactatt gcaatacctc aacaaaaatt atcaataaaa aattgctttt
taagtacagt
4141 aaaagggtc tttgtcaata aggactgatg agttgtgcaa aatcaaatct
gagtcagaat
4201 gaaccacatt ctggctcaga ttttttgta tcttacattg attaattgat
tgatcaaaaa
4261 gattctaatt ctcatgttct caaatgattt aaatccgtag gatactggt
tcattgtctt
4321 tatgtgggta ttcttcgctt ctatttttcc attggaataa ggatagatca
ttgcgttggg
4381 gatgccttct tcataggtca gaaggttttg aagcttttcc cgaaagctgt
catctaactg
4441 ttcgggaagt tctgccaata aggagaaaaa taagtcaggg tctttgtctc
gaaaggcttc
4501 aactaattca tgaaaaagg gatagcctc ctttaggggc ggagaaaact
caagcaatcg

4561 atcaatcatc attgcttcag taagaaatgg gtattinggt gctcggaaac
ttttccatgt
4621 tttgtattca taatggttga tgtttgcacg attttttagc aaaaagcgcc
agttcttttt
4681 cagtttttct gcttggtttt tctgtccggc tttacgaagt tcattcattt
cacggatacg
4741 caactcattg aacgcttgat tcatgtgttt gacaatatga aaccgatcaa
tcacgacttt
4801 cgcatttggc agaacacggt tggtagactg gaagtaggcg gcgttcattg
ctgtcaccaa
4861 gaattctact tcttctggat tggtagaac taagaaatag cttgttaatc
gaggtaattt
4921 acgcgtaggc aaaacatcta ttaattttcc tgtttcgcca tccgcgcaaa
taaagctcat
4981 cttatcttct atggaagcat gcgaacgaaa ttcgtcaacc atcaatactc
tggggaggat
5041 cttcttagat tgctttggta aatagctttt aaactctttc aatgtacgaa
taacggtggt
5101 caaagatacc tgacagcttt tcgcaataaa agataaagat actttttcag
tcagtaaaga
5161 agcaatttta tatctaacat gatttgcat tgaatgtctg ggttgacaa
aataactttg
5221 agccgtccaa tgggtgcgac agtttttaca ggtatagcgt tgctttttta
ggcgcataac
5281 caaaggcata tgattgtatt gttcaaaacg gacaatcgtt tccttttttc
cattttttcac
5341 tataattgct tccccgtttc catctaccac agtagaacca caacttctac
aagcacgagg
5401 agtaggcgag agaacagcat cgacgaccaa cgtctttttc ttctgaaggg
tctcgtaaga
5461 gacctctgta atcatcaaat ctttctctgt tattctcagc atttttttga
tagaatcatt
5521 catatagcgt atcgtcctct cagttgttta ttttgggtg atttaatcat
actagagaac
5581 gatatgtttt ttaataccta aaatgaaaat ggggctgaag aatcaattct
gattcatcag
5641 tcccataaat tatagagcca gtaaaaggac tgtggcgta tctacacagt
ccttttttca
5701 aataaacggt tttcacgatg tctctttcac aacttctttt tgatttactc
aacttcata
5761 aacttttttt gtaaaatatt tgagaacaag tggagaaata agtgactta
ataaaatcac
5821 gataactaaa ggtgaatagt actgtggttc gatcaatt

//

Nucleotide

Search

Display Settings: GenBank

Enterococcus faecium strain 164306 insertion sequence ISEf1, complete sequence

GenBank: JN208882.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS JN208882 4132 bp DNA linear BCT 03-OCT-2011

DEFINITION Enterococcus faecium strain 164306 insertion sequence ISEf1, complete sequence.

ACCESSION JN208882

VERSION JN208882.1 GI:347952165

KEYWORDS .

SOURCE Enterococcus faecium

ORGANISM [Enterococcus faecium](#)
Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Enterococcaceae; Enterococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 4132)
AUTHORS Novais,C., Silveira,E., Freitas,A.R., Escada,R., Coque,T.M. and Peixe,L.
TITLE High incidence of horizontal transfer of ampicillin resistance (pbp5) among CC17 Enterococcus faecium
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 4132)
AUTHORS Novais,C., Silveira,E., Freitas,A.R., Escada,R., Coque,T.M. and Peixe,L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (05-JUL-2011) Microbiology, REQUIMTE Pharmacy Faculty, Porto University, Rua Anibal Cunha, 164, Porto 4050-047, Portugal

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..4132
/organism="Enterococcus faecium"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="164306"
/isolation_source="urine"
/host="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:[1352](#)"
/country="Portugal"
/collection_date="1998"
/note="resistant to vancomycin and ampicillin; MLST ST190"

[gene](#) <1..355
/gene="psr"

[misc_feature](#) <1..355
/gene="psr"
/note="similar to PBP5 synthesis repressor"

[mobile_element](#) 545..1881
/mobile_element_type="insertion sequence:ISEf1"

repeat_region 545..564
/note="IR left"
/rpt_type=inverted
CDS 652..1830
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="transposase"
/protein_id="AEP33222.1"
/db_xref="GI:347952166"
/translation="MNDFTTEIVQTLVTKGDLNELFRSHLEKAINTELLRTELT

AFLDY

EKYDRGTGFNSGNSRNGSYFRSIRKTEYGELETLIPRDRNGEFKQQTLPAYKRTNDTLET
TIIHLFEKGVMTSEIADLIEKMYGHHYTPQTMSNMTKVLTEEVNAFKSRALNDKYVAI
FMDATYIPLKRQTVSKEAIYIAIGIREDGTKEVLSYAIAPTESTYVWNELLQDINSRG
VQEVLLFITDGLKGMKDTIHQIYPKAKYQHCCIHVSRNIAHKVRVKDRKEICDDFKAV
YQANSKEEANTFLSGMIEKWKKNYPKVTQSLIENQDLLTFYDFPPSIRRTIYSTNLIE
SFNKQIKRYSRRKEQFQNEESLERFLVSIFDTYNQKFLNRSHKGFQQVTDTLVSMFTE

"

repeat_region 1863..1881
/note="IR right"
/rpt_type=inverted
gene 1964..4000
/gene="pbp5"
CDS 1964..4000
/gene="pbp5"
/note="involved in ampicillin resistance"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="penicillin-binding protein Pbp5"
/protein_id="AEP33223.1"
/db_xref="GI:347952167"
/translation="MKRSDKHGKNRTGAYIAGAVILIAAAGGGYFYQHYQET

QAVEA

GEKTVEQFVQALNKGDYKAAEMASKKAANKSALSEKEILEKYQNIYGAADVKGQLQIS
NLKVDDKDDSTYSFSYKAKMNTSLGELKDLKSYKGTLDNRNDGQTTINWQPNLVFPEMEG
NDKVSLTTQEAARGNIIDRNGEPLATTGKLGKQLGVVPSKLGDGDEKTANIKAIASSFD
LTEDAINQAISQSWVQPDYFVPLKIIDGATPELPAGATIQEVDGRYYPAGEAAAQLIG
YVGDITAEDIDKNPELSSNGKIGRSGLEMAFDKDLRGTGGKLSITDADGVEKKVLIE
HEVQNGKDIKLTIDARAQKTAFDLSGGKAGSTVATPKTGDLLALASSPSYDPNKMTN
GISQEDYKSYEENPEQPFISRFATGYAPGSTFKMITAAIGLDNGTIDPNEVLTINGLK
WQKSSWSGSYQVTRVSDVSQVDLKTALIYSDNIYMAQETLKMGEKKFRIGLDFKIFGE
DLDLPI SMNPAQISNEDSFNSDILLADTGYGQGELLINPIQQAAMYSVFANNGTLVYP
KLIADKETKDKKNVIGETAVQTI VPDLREVVDVNGTAHSLSALGIPLAAKTGTAEIK
EKQDEKKGKENSFLFAFNHDNQGYMMVSMLENKEDDSDATKRAPELLQYLNQNYQ"

ORIGIN

1 tatgcaagta tcacatttca agatttatcg attgcgttta atgaactggt
tcctgggtgga
61 gtcaagatcg atgcagaaaa atctctagat ttagatggcg tatatataaa
caaaggagag
121 caagtgatgg atggttaatac tttactocag tatgctcgat ttcgggaaga
caaagaagga
181 gacttcggga ggatcagaag gcagcagcaa gtgatcaaag ctatctctca
gcagctgaaa
241 gacgtaactt caatattcaa gctacccaaa gcggttgga aattacttgg
tagtatccaa
301 acgaaccttc cagaaagtgt gcttctggat tgtggtatgg atttctcaa
aaacaataat
361 aaaaagatcg atacattatc cgtaccagta gacggcagtt gggacttcaa
cgacaatacg
421 ccttccggaa gtgttctgga attagatttg accaaaaacc aagaagcaat
caaaaaattt
481 ctgaataatt aagtaaagaa aataaaagaa gttagaata acaatctatg
ttatgttctg
541 acttgagagt ataaaatatt ttgtgtaaat gaaaaaatcc atacaaaaaa
ggaagtcct
601 tctgtagaat aaagttaacg acaaccaatt cacagaaaag aggacttccc
tatgaatgat
661 tttactacag aaattgtgca aactctagtc actaaaggcg atttaaataga
attattccgt
721 tcgacttag aaaaagcgat aaacacactc ctacggactg aattaacggc
tttttagat
781 tacgaaaaat atgatcgcac tggttttaat tcaggaatt cgagaaacgg
ttcttacttt
841 cgatcaatca aaaccgaata tggatgaatta acattggaaa tacctagaga
tcgtaatggt
901 gagtttaaac acaaaacttt accagcctac aaaagaacaa acgatacatt
ggaaaccact
961 attatccatt tattcgaaaa aggagttacg atgtctgaaa ttgctgattt
gatcgaaaaa
1021 atgtacggtc atcactatac tccacaaacc atgtccaaca tgactaaagt
tctgactgaa
1081 gaagtaaagtg cctttaaatc cagagcctta aatgataagt atgtcgctat
tttatggac
1141 gctacttaca ttccactaaa acgtcaaact gtatccaaag aagcgattta
tattgccatt
1201 ggtatacgag aagacggcac taaagaagta ctgagttatg cgattgctcc
aactgaatca
1261 acatacgttt ggaatgagct gctacaggat attaactcca gaggagttca
agaagtcttg
1321 ctttttatta cggacggcct aaaaggcatg aaagatacta tccatcaaat
ttatcctaaa
1381 gcaaaatatac agcattggtg tatccatgta tctcgtaata tcgctcataa
agtacgtgtc
1441 aaagaccgaa aagaatctg tgatgacttt aaggctggtt atcaagctaa
ctcaaaagaa
1501 gaagcgaata cttcttatc cggcatgatt gagaaatgga agaaaaacta
tcctaaagtg
1561 acgcagtcac tcatagaaaa ccaagactta ttaacttttt atgatthttcc
acctagcatt
1621 cgtagaacca tttactcaac caatctaatac gagtctttca ataagcaaat
taaaagatac
1681 agccgtagaa aagagcagtt tcaaaatgaa gaatcactag aacgctttct
agtcagcatt
1741 tttgatacat acaatcaaaa atttctaaac agaagccata aaggthttca
acaggaacc

1801 gatacattag tttcaatggt tactgagtaa ttaattatct tgcaggagga
caatttattt
1861 acacaaaatt attgacgctc cgtatgtttt tttttattct gttagaataa
acagttataa
1921 atagtgaatt taaaggaatg acaagcaaga gaaggaggaa aaaatgaaaa
gaagtgacaa
1981 gcacggcaaa aatcgaacag gcgcttatat tgccggcgca gtgatcttaa
tagcagctgc
2041 ggggtggcgggt ttttttact accagcacta tcaagaaacc caagcagtag
aagctggaga
2101 aaagacagtt gagcaatttg tccaagcttt gaacaagggga gattataaca
aagctgcaga
2161 aatggcatca aaaaaggcgg caaataaaag tgcattatct gaaaaagaga
tattagagaa
2221 ataccagaat atatacggtg ctgctgatgt caaaggactt cagatatcga
atctaaaagt
2281 agataaaaaa gacgattcta cttacagttt ttcataataa gcaaagatga
atacctcatt
2341 agtggaattg aaagatcttt cttataaagg aacattagac agaaatgatg
gtcaaaccac
2401 gatcaactgg caaccact tggtttttcc agaaatggaa ggaaatgaca
aagtaagcct
2461 gaccacacaa gaagcagcaa gagggaatat tatagatcga aatggatgaac
cattagcaac
2521 aacaggcaaa ctaaaacaat taggagtcgt tccaagtaaa cttggagatg
gagacgaaaa
2581 aacagccaat atcaaagcga ttgcttctc cttcgactta acagaagatg
ctatcaatca
2641 ggcgatttca caaagctggg tacaaccgga ttactttgtc ccattgaaaa
tcattgatgg
2701 agcaacgcca gaacttccag ctggagctac cattcaagaa gtagacggca
gatattatcc
2761 tttgggtgaa gcagctgctc agctgattgg ttacgtggga gatatacag
cagaagatat
2821 tgataagaat ccagaattaa gcagtaatgg aaaaatcggg cgctcaggtt
tggagatggc
2881 ttttgataag gatcttctg ggaacaacag tgggaaatta agcattacag
atgcagacgg
2941 tgtagagaaa aaagttctga tcgaacatga agttcaaat ggcaaagata
tcaaattgac
3001 aatcgatgag agggcacaaa aacagcttt tgacagtcta ggaggaaaag
ctggatcaac
3061 tggtgagaca acgcaaaaaa ccggtgatct tcttgcgctt gctagctctc
caagctatga
3121 tccaaacaaa atgacaaacg ggatctcaca agaagattac aaatcttatg
aagaaaatcc
3181 tgaacagcca ttcacagcc gatttgcgac aggttatgct cctggatcta
cgtttaaatt
3241 gattacagca gcaatcggtc ttgacaacgg cactatcgat ccaaatgaag
tggtgacgat
3301 caacgggctt aaatggcaaa aagacagttc ttggggatct tatcaagtaa
cgcgtgtcag
3361 tgatgatca caagtagact taaaaactgc tttgatctat tccgataata
tatatatggc
3421 acaagaaaacg ttgaaaatgg gtgagaaaaa atttcgtata ggcttagata
aattcatttt
3481 tggatgaagac cttgatttgc caattagat gaatccagca caaatttcta
atgaagatag
3541 cttaactca gatatcttgc tagctgatac tggatagga caggcgaac
ttctaattaa
3601 tcctatccag caagcagcaa tgtattctgt ttttgcaac aatggcacac

ttgtctatcc

3661 taaattgatt gcagataaag agacaaaaga taagaagaat gtcacatcggcg
aaacagcagt

3721 acaaacgatac gtgccagatac tgagagaagt tgtgcaagat gtaaattggta
cagcacattc

3781 tctttctgct ttagggattc cgttggcagc gaaaactggg acagcggaaa
tcaaagaaaa

3841 acaggatgaa aaagggaaag agaacagttt cttgtttgct ttcaatcatg
ataaccaagg

3901 ttatatgatg gtcagcatgt tggaaaataa agaagatgat gattcagcaa
ccaaacgagc

3961 accggaacta ttgcaatacc tcaaccaaaa ttatcaataa aaaattgctt
ttaaagtaca

4021 gtaaaaaggac tgtggcggtta tcgtcacagt ccttttttca aataaacggt
tttcacgatg

4081 tctctttcac aacttctttt tgatttactc acacttcata aacttttttt gt

//