



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS

INSTITUTO BIOMÉDICO – IB

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA – DMP

**DETERMINANTES GENÉTICOS DE VIRULÊNCIA ENTRE AMOSTRAS DE  
*ENTEROCOCCUS* ISOLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS NO ESPÍRITO  
SANTO**

VITOR LUIS MACENA LEITE

Rio de Janeiro

2018

VITOR LUIS MACENA LEITE



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (UNIRIO)**

Monografia submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina, pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Martins  
Teixeira

Rio de Janeiro

2018

Leite, Vitor Luis Macena

Determinantes genéticos de virulência entre amostras de *Enterococcus* isoladas de pacientes hospitalizados no Espírito Santo/ Vitor Luis Macena Leite; Orientadora: Dra. Lúcia Martins Teixeira. Rio de Janeiro, 2018.

Monografia de graduação em bacharelado em biomedicina – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO).

Palavras-chave: *Enterococcus*; infecção hospitalar; virulência; multirresistência.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para que as minhas realizações fossem do tamanho dos meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela sua infinita bondade e amor, por ter me dado forças, confiança e acalmado o meu coração nos momentos mais difíceis dessa trajetória, pelo privilégio de ter chegado até aqui e por ter colocado no meu caminho todas as pessoas que contribuíram para a realização desse trabalho.

À minha família, em especial aos meus pais, Vânia e Sérgio, que sempre colocaram a minha educação e formação como prioridade e me apoiam desde que eu sou capaz de me lembrar. Vocês são incríveis e eu não estaria realizando esse sonho se vocês não tivessem sonhado ele comigo. Obrigado por todo amor, zelo, carinho, paciência e por acreditarem em mim.

Ao meu irmão Lucas, que às vezes me tira do sério, mas que eu amo muito e agradeço por todos os nossos bons momentos, por toda a parceria e por me deixar estudar com a luz acesa no quarto mesmo quando você quer dormir.

À Professora Lúcia Martins Teixeira, por ter me acolhido e aceitado ser minha orientadora. Obrigado por todos os ensinamentos e pelo grande exemplo de profissional e inspiração que a senhora é. Que privilégio ser seu aluno.

À Professora Carmen Saramago, que topou embarcar nessa caminhada nada fácil comigo e se disponibilizou a me ajudar. Obrigado pelas suas aulas impecáveis e que contribuíram muito para eu ter me apaixonado pela microbiologia.

À minha melhor amiga Gabriela Correia, obrigado por ser você, por ter rido (bastante) comigo nos momentos de alegria, que em muitos só a gente estava achando graça, mas também por ter sofrido junto comigo nos dias difíceis. Nós somos família e sem você eu não teria conseguido.

Ao meu melhor amigo Alexandre Salerno, obrigado pelo exemplo de pessoa que você é, por me transmitir essa vontade de ser melhor, de pensar nas pessoas e no que elas precisam e de ser um profissional consciente de que a ciência deve ser para todos. Obrigado por toda a ajuda e inspiração.

A todos os meus mais amados amigos: Anna, Lana, Simonson, Carina, Milena, Taissa, Samara, Renata, Luiza, Isabelle, Amanda, Ygor, Livia e Ayke. Foi um privilégio

ter compartilhado essa jornada com vocês. Cada um de vocês contribuiu um pouco para que esse momento chegasse e eu sou muito grato por tudo o que eu aprendi com vocês, por todo o cuidado, carinho e fraternidade. Com vocês a graduação foi muito mais leve e o IB passou a ser uma segunda casa.

A todos os amigos do “Momentos” e à Biomed 2014.2, vocês são todos muito especiais, fonte inesgotável de bons momentos, parceria e união.

À minha professora querida Carolina Paulo, que foi uma pessoa de participação imprescindível na minha trajetória desde o ensino fundamental. Obrigado não só por ser essa excelente profissional e pela sua didática excepcional que me despertou o amor pela biologia, mas também por toda amizade e suporte de sempre mesmo me acompanhando de longe.

Ao Professor Rafael Braga, que me acolheu na iniciação científica ainda no início da graduação e me ensinou muito sobre disciplina e ciência.

À Caroline Barros, que me orientou no meu primeiro contato com a bancada e com quem eu dividi incontáveis e divertidíssimos momentos ao longo da iniciação científica. Sou muito grato pelo seu carinho e amizade.

Ao Maicon Miranda, que esteve ao meu lado me orientando durante a execução desse trabalho, obrigado pela parceria, por todo o ensinamento, comprometimento e pela dedicação ao nosso trabalho.

A todos os companheiros de trabalho do Laboratório de Apoio Biotecnológico da UFRJ, muito obrigado por terem me acolhido de braços abertos, por estarem sempre dispostos a me ajudar e por terem tornado essa trajetória um pouco mais fácil com a nossa boa e agradável convivência. Vocês são incríveis!

À coordenadora do curso de biomedicina, professora Patrícia Costa, e à Glaucia Correia, agradeço por toda a boa vontade com a qual vocês me ajudaram. O suporte de vocês foi essencial e sem ele eu também não teria conseguido.

E por fim, agradeço a todos os professores e profissionais da UNIRIO, que colaboraram direta ou indiretamente para que essa etapa tão importante da minha vida fosse concluída.

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”*

(Theodore Roosevelt)

## RESUMO

A emergência das bactérias do gênero *Enterococcus* como importantes patógenos nosocomiais nas últimas décadas reflete a necessidade de se investigar os fatores envolvidos na patogênese das infecções causadas por esses microrganismos. Entre esses fatores estão a crescente resistência aos antimicrobianos, que acompanha essas infecções ao longo dos anos, e a expressão de fatores de virulência que contribuem para a instalação e desenvolvimento das mesmas. Para esse estudo, foi investigada a presença dos principais determinantes genéticos de virulência do gênero entre 106 amostras de *Enterococcus spp.* isoladas de pacientes de dois hospitais de Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo. Através de PCR-*Multiplex*, foram pesquisados os seguintes genes: *asa1* (substância agregativa), *esp* (proteína de superfície de *Enterococcus*), *cylA* (citolisina), *gelE* (gelatinase) e *hyl* (glicosil-hidrolase). Tais amostras foram obtidas no período entre setembro de 2016 e setembro de 2017, das quais 63 (59,4%) foram isoladas no hospital A e 43 (40,6%) no hospital B. As espécies identificadas por MALDI-TOF-MS foram *Enterococcus faecalis* [77 (72,6%)], *Enterococcus faecium* [24 (22,6%)], *Enterococcus avium* [3 (2,8%)] e *Enterococcus gallinarum* [2 (1,9%)]. As fontes de isolamento mais frequentes foram urina [40 (37,7%)], *swab* retal [27 (25,5%)], e sangue [20 (18,9%)]. Também foi feita a investigação da susceptibilidade dessas amostras a um painel de 18 antimicrobianos, bem como da frequência de multirresistência entre elas. Foram observados os seguintes percentuais de resistência: ampicilina (19,8%), ciprofloxacina (61,3%), cloranfenicol (34,0%), eritromicina (73,6%), estreptomicina (10,4%), fosfomicina (2,8%), gentamicina (42,5%), levofloxacina (60,4%), nitrofurantoína (22,6%), norfloxacina (62,3%), penicilina (42,5%), quinupristina/dalfopristina (68,9%), rifampicina (40,6%), teicoplanina (43,4%), tetraciclina (64,2%) e vancomicina (45,3%). Constatou-se que 83 (78,3%) amostras apresentaram multirresistência e todas foram susceptíveis a linezolida e tigeciclina. A diversidade genética das amostras foi avaliada através da análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, empregando a enzima de restrição *SmaI* e eletroforese em campo pulsado. Foram detectados três grupos clonais predominantes entre as amostras do estudo, sendo um de *E. faecalis*, definido, em maioria, por amostras VRE e portadoras do perfil genético de virulência formado pelos genes *asa1*, *cylA* e *gelE*; e os outros dois englobando amostras de *E. faecium*, em sua maioria



VRE e carreadoras dos determinantes genéticos de virulência *esp* e *hyl*. Entre as amostras não-*E. faecium* e não-*E. faecalis*, uma única amostra de *E. avium* resistente à vancomicina e portadora do gene *esp* foi identificada, assim como duas amostras de *E. gallinarum* resistentes à vancomicina, no entanto, não apresentando nenhum dos genes de virulência aqui analisados. Esse estudo é pioneiro sobre a pesquisa de determinantes genéticos associados a virulência e sobre a diversidade genética de amostras de *Enterococcus* circulantes nesses hospitais, contribuindo para compreensão da epidemiologia de um importante patógeno nosocomial que vem sendo alvo de importantes ações de saúde pública que visam enfrentá-lo, sendo assim, útil para o desenvolvimento e emprego de alternativas que visem o controle dessas infecções enterocócicas, considerando que as abordagens terapêuticas para essas enfermidades já se encontram altamente limitadas.

**Palavras-chave:** *Enterococcus*; infecção hospitalar; virulência; multirresistência.

## ABSTRACT

The emergence of bacteria from *Enterococcus* genus as important nosocomial pathogens over the past decades reflects the need to further investigate the factors involved on these infections' pathogenesis. Among these factors we can list the growing antibiotic resistance following these infections and the expression of virulence factors that contributes to their establishment and development. The present study aimed to investigate the presence of the major virulence genetic determinants between 106 *Enterococcus spp.* samples isolated from patients hospitalized at two health care facilities at Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo. By using multiplex PCR, the following genes were investigated: *asa1* (aggregative substance), enterococcal surface protein (*esp*), *clyA* (cytolysin), *gelE* (gelatinase) and *hyl* (glycoside-hydrolase). The samples were collected between September 2016 and September 2017, among which 63 (59.4%) were isolated from hospital A and 43 (40.6%) from hospital B. The identified species, using MALDI-TOF-MS, were *Enterococcus faecalis* [77 (72.6%)], *Enterococcus faecium* [24 (22.6%)], *Enterococcus avium* [3 (2.8%)] e *Enterococcus gallinarum* [2 (1.9%)]. The most frequent sources of specimens were urine [40 (37.7%)], rectal swab [27 (25.5%)] and blood [20 (18.9%)]. The samples were also tested for their susceptibility to 18 different antimicrobials, as well as the multiresistance profile frequency among them. The following resistance results were observed: ampicillin (19.8%), ciprofloxacin (61.3%), chloramphenicol (34.0%), erythromycin (73.6%), streptomycin (10.4%), fosfomicin (2.8%), gentamicin (42.5%), levofloxacin (60.4%), nitrofurantoin (22.6%), norfloxacin (62.3%), penicillin (42.5%), quinupristin/dalfopristin (68.9%), rifampicin (40.6%), teicoplanin (43.4%), tetracycline (64.2%) e vancomycin (45.3%). According to these results, 83 samples (78.3%) showed multiresistance profiles and all of them were susceptible to linezolid and tigecycline. The genetic diversity of these samples was analyzed by the chromosomal DNA fragmentation profiles after digestion with *SmaI* restriction enzyme and pulsed field gel electrophoresis. Three prevailing clonal groups were detected, one of them being *E. faecalis*, mainly represented by VRE samples with the virulence genetic profile composed by gens *asa1*, *clyA* and *gelE*; the two remaining groups encompassing *E. faecium*, mainly VRE samples presenting the virulence genetic determinants *esp* and *hyl*. Among the samples neither identified as *E. faecium* nor as *E. faecalis*, a single sample of vancomycin-resistant *E. avium* carrier of *esp* gene was identified, besides

two vancomycin-resistant samples of *E. gallinarum* not carrying any of the virulence genes investigated. The present study is the first to further investigate the occurrence of virulence factors and the genetic diversity of *Enterococcus* isolates circulating in these hospitals, thereby contributing to better comprehension of the epidemiology of an important nosocomial pathogen that has been a major concern and target of key public health strategies. The results give critical insights needed to improve and develop alternatives for controlling these enterococcal infections, once the current therapeutical approaches are highly overrated.

**Key-words:** *Enterococcus*; hospital-acquired infections; virulence; multidrug resistance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Distribuição das amostras de <i>Enterococcus</i> de acordo com a fonte de isolamento (infecção e colonização) e a instituição de origem.....	46
<b>Figura 2.</b> Distribuição dos resultados de susceptibilidade das amostras do estudo aos antimicrobianos testados.....	49
<b>Figura 3.</b> Distribuição dos determinantes genéticos de virulência entre as amostras do estudo.....	53
<b>Figura 4.</b> Dendrograma resultante da análise computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico das 75 amostras de <i>Enterococcus faecalis</i> ...	62
<b>Figura 5.</b> Dendrograma resultante da análise computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico das 24 amostras de <i>Enterococcus faecium</i> . .	64
<b>Figura 6.</b> Dendrograma resultante da análise computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico das três amostras de <i>Enterococcus avium</i> . ..	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Distribuição das amostras de enterococos de acordo com os espécimes clínicos sugestivos de infecção e a instituição de origem .....	47
<b>Tabela 2.</b> Distribuição das amostras de acordo com a espécie e a instituição de origem .....	47
<b>Tabela 3.</b> Distribuição das espécies de acordo com a fonte de isolamento do paciente .....	48
<b>Tabela 4.</b> Distribuição dos percentuais de resistência das amostras aos antimicrobianos de acordo com a espécie .....	51
<b>Tabela 5.</b> Distribuição dos antibiótipos das 83 amostras classificadas como multirresistentes de acordo com as espécies de <i>Enterococcus</i> do estudo .....	52
<b>Tabela 6.</b> Distribuição dos determinantes genéticos de virulência de acordo a espécie e instituição de origem da amostra.....	54
<b>Tabela 7.</b> Distribuição dos determinantes genéticos de virulência de acordo com o setor hospitalar de origem da amostra .....	54
<b>Tabela 8.</b> Distribuição dos determinantes genéticos de virulência de acordo com a fonte de isolamento de origem da amostra .....	55
<b>Tabela 9.</b> Distribuição dos determinantes genéticos de virulência entre amostras MDR e não-MDR .....	55
<b>Tabela 10.</b> Distribuição dos perfis genéticos de virulência de <i>Enterococcus faecalis</i> de acordo com a instituição de origem da amostra .....	56
<b>Tabela 11.</b> Distribuição dos perfis genéticos de virulência de <i>Enterococcus faecalis</i> de acordo com a fonte de isolamento de origem da amostra.....	57
<b>Tabela 12.</b> Distribuição dos perfis genéticos de virulência de acordo com o setor hospitalar de origem da amostra .....	58
<b>Tabela 13.</b> Distribuição dos perfis genéticos de virulência entre amostras de <i>Enterococcus</i> resistentes à vancomicina (VRE) e susceptíveis (VSE).....	58
<b>Tabela 14.</b> Distribuição dos perfis genéticos de virulência entre amostras MDR e não-MDR .....	59

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1.** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para pesquisa dos genes relacionados à virulência em amostras bacterianas do gênero *Enterococcus*.....41

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	16
1.1.	Histórico do gênero <i>Enterococcus</i> .....	16
1.2.	Características gerais e Identificação do gênero <i>Enterococcus</i> .....	17
1.3.	A patogenicidade dos <i>Enterococcus</i> .....	20
1.3.1.	Resistência aos antimicrobianos.....	21
1.3.2.	Fatores de Virulência .....	23
1.4.	Aspectos epidemiológicos dos <i>Enterococcus</i> .....	31
2.	OBJETIVO .....	35
2.1.	Objetivos específicos .....	35
3.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	36
3.1.	Amostragem.....	36
3.2.	Identificação das amostras bacterianas .....	37
3.3.	Determinação da Susceptibilidade aos Antimicrobianos.....	37
3.3.1.	Técnica de disco difusão.....	38
3.3.2.	Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de aminoglicosídeos por diluição em ágar .....	39
3.3.3.	Técnica de difusão em gradiente contínuo para determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) através de <i>E-test</i> ®.....	40
3.4.	Extração do DNA bacteriano.....	40
3.5.	Caracterização genotípica dos fatores de virulência .....	41
3.6.	Avaliação da diversidade genética das amostras através da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) .....	42
4.	RESULTADOS.....	46
4.1.	Amostragem.....	46
4.2.	Susceptibilidade aos antimicrobianos .....	48
4.3.	Caracterização dos genótipos associados à virulência em <i>Enterococcus</i> ...	53
4.4.	Avaliação da diversidade genética das amostras através da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) .....	59
4.4.1.	Diversidade genética das amostras de <i>E. faecalis</i> .....	59
4.4.2.	Diversidade genética das amostras de <i>E. faecium</i> .....	63
4.4.3.	Diversidade genética das amostras de <i>E. avium</i> .....	65

4.4.4. Diversidade genética das amostras de <i>E. gallinarum</i> .....	65
5. DISCUSSÃO .....	66
6. CONCLUSÃO .....	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Histórico do gênero *Enterococcus*

O termo enterococo (derivado do francês *entérocoque*) foi inicialmente empregado em 1899 para designar diplococos Gram-positivos de origem intestinal (THIERCELIN, 1899). Neste mesmo ano, foi relatado um caso de endocardite infecciosa causada por bactérias organizadas em arranjos de cadeias curtas, a maioria em pares, semelhantes aos representantes do gênero *Streptococcus*, sendo descritas como uma nova espécie denominada *Micrococcus zymogenes* (MACCALLUM; HASTINGS, 1899). Em 1908, foi reconhecido que essa espécie pertencia, de fato, ao gênero *Streptococcus* (WINSLOW; WINSLOW, 1908).

Em 1906, o termo *Streptococcus faecalis* foi utilizado para denominar um microrganismo isolado de um paciente com endocardite, porém, considerado bem característico do intestino humano, o que explica a sua nomenclatura (ANDREWES; HORDER, 1906). Após a denominação dada por Andrewes e Horder, em 1919, Orla-Jensen começou a empregar terminologias diferentes ao descrever amostras similares — *Streptococcus glycerinaceus* e *Streptococcus faecium* (ORLA-JENSEN, 1919).

Em 1937, é dada a tentativa de padronização do termo enterococo, que até então estava sendo utilizado de forma ambígua para designar tanto diferentes espécies de *Streptococcus* de origem intestinal, como restritamente amostras idênticas ao *S. faecalis*. Sherman propôs um esquema de classificação que dividia os integrantes do gênero *Streptococcus* em quatro grupos: piogênicos, viridans, láticos e enterococos (SHERMAN, 1937). A classificação de Sherman se correlacionou com a classificação sorológica proposta por Rebecca Lancefield em 1933 para *Streptococcus*, na qual os enterococos foram descritos como pertencentes ao grupo D com base em suas características antigênicas (LANCEFIELD, 1933; SHERMAN, 1937).

Em seu novo critério de organização, Sherman descreveu como pertencentes ao grupo dos enterococos todas as espécies já conhecidas como enterococos até então, sendo elas: *S. faecalis* — também chamada de *S. faecium* ou *S. glycerinaceus* até o momento — *Streptococcus zymogenes*, *Streptococcus liquefaciens* e *Streptococcus durans*. Estudos posteriores revelaram que a espécie descrita

como *S. faecium* apresentava características bioquímicas divergentes das observadas em *S. faecalis*. (BARNES, 1956; DEIBEL, 1964; HARTMAN; REINBOLD; SARASWAT', 1966; SHERMAN, 1937).

Em 1970, houve uma proposta para a criação do gênero *Enterococcus* a partir das espécies de *Streptococcus* do grupo D de Lancefield, baseando-se em arranjo celular e características fenotípicas. O novo gênero albergaria duas espécies: *S. faecalis* e *S. faecium*, cada uma dessas incluindo suas respectivas subespécies (KALINA, 1970). No entanto, as evidências genéticas necessárias para a validação do gênero *Enterococcus* só foram fornecidas em 1984 através dos experimentos de hibridização DNA-DNA e DNA-RNA realizados por Schleifer e Kilpper-Balz. Os resultados desse estudo finalmente demonstraram que tais microrganismos compartilhavam de pouca correlação genética com os demais integrantes do gênero *Streptococcus*, justificando a criação do gênero *Enterococcus* (SCHLEIFER; KILPPER-BALZ, 1984).

Desde então, uma variedade de novas espécies foi descrita e agregada ao gênero *Enterococcus*, este sendo, atualmente, composto por 58 espécies, segundo os dados da *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* (EUZÉBY, 2018).

## **1.2. Características gerais e Identificação do gênero *Enterococcus***

O gênero *Enterococcus* é composto por cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos, oxidase e catalase-negativos, dispostos em cadeias curtas, aos pares ou isolados (HUYCKE; SAHM; GILMORE, 1998; TEIXEIRA *et al.*, 2015). Podem ser diferenciados de outros cocos Gram-positivos pela sua capacidade de crescer em uma ampla faixa de temperatura, compreendida entre 10 e 45°C, tendo o seu crescimento ótimo a 35°C e podendo sobreviver até 60°C por 30 minutos. Além disso, os representantes desse gênero suportam grandes variações de pH, de 4,0 a 9,6, distribuindo-se em uma variedade de ambientes e hospedeiros, sendo membros da microbiota intestinal de humanos, animais e insetos (FISHER; PHILLIPS, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2015; VAN TYNE; GILMORE, 2014).

Os enterococos não são capnofílicos, apesar de algumas espécies crescerem melhor na presença de altas concentrações de CO<sub>2</sub>, e são capazes de sobreviver a

altas concentrações de cloreto de sódio (NaCl a 6.5%) e sais biliares, condições desfavoráveis a Gram-positivos de outros gêneros (DOLKA *et al.*, 2015; FISHER; PHILLIPS, 2009; MILLER *et al.*, 2016). Em sua grande maioria, são capazes de hidrolisar os substratos L-pirrolidonil- $\beta$ -naftilamida (PYR) e L-leucina- $\beta$ -naftilamida (LAP) através das ações das enzimas pirrolidonil arilamidase (PYRase) e leucina aminopeptidase (LAPase), respectivamente. Também hidrolisam esculina na presença de sais biliares, sendo estes testes-chave para a identificação dos membros desse gênero (TEIXEIRA *et al.*, 2015).

É possível notar que os *Enterococcus*, quando crescidos em meio de cultura preparado com sangue de carneiro, podem apresentar colônias alfa ou gama-hemolíticas, entretanto, algumas amostras podem apresentar beta-hemólise em meio de cultura enriquecido com sangue humano, de coelho ou de cavalo (ARIAS; MURRAY, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2015).

Devido à sua notória adaptação às condições adversas do ambiente, os enterococos podem ser encontrados em uma grande variedade de sistemas biológicos, como no intestino humano e de animais domésticos e selvagens, em insetos, plantas ou até mesmo no solo e na água (AHMAD *et al.*, 2011; GUZMAN PRIETO *et al.*, 2016; SACRAMENTO *et al.*, 2016; SILVEIRA *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2015).

Para a caracterização ao nível de espécie, pode ser realizada uma bateria de testes fisiológicos, que demandam um período de incubação de até sete dias, partindo do princípio de que cada espécie de *Enterococcus* exibe um perfil característico frente aos resultados combinados destes testes. Entre eles estão a descarboxilação da arginina e a produção de ácidos a partir da fermentação de açúcares como o manitol, o sorbitol, a sorbose e a sacarose, no entanto, existem testes fisiológicos complementares que garantem uma identificação mais acurada das espécies. Estes testes permitem a identificação das principais espécies de *Enterococcus*, no entanto, são relativamente complexos e laboriosos (FACKLAM; COLLINS, 1989; TEIXEIRA *et al.*, 2015).

Como uma tentativa de contornar a laboriosidade e a longa duração dos testes fisiológicos tradicionais, foram criados testes comerciais de identificação rápida, como ID 32 STREP e API 20 STREP (*BioMérieux*®, França), que garantem resultados

confiáveis mesmo para espécies pouco comuns em um curto intervalo de tempo (BOERLIN *et al.*, 2012; DOLKA *et al.*, 2015; STRATEVA *et al.*, 2016). Tal iniciativa leva em consideração o fato de que o tempo, em muitos casos, é determinante para a manutenção da vida do paciente, que depende do diagnóstico correto do patógeno para que seja definida uma estratégia terapêutica adequada ao combate da infecção. Nos últimos anos, têm sido relatados novos casos clínicos em humanos envolvendo espécies de *Enterococcus* menos frequentes, ou seja, infecções não causadas por *E. faecalis* ou *E. faecium*, o que justifica a importância do aprimoramento dos testes de identificação a nível de espécie, visto que cada espécie exibe particularidades relacionadas à susceptibilidade aos antimicrobianos e expressão de fatores de virulência (MERQUIOR *et al.*, 2008; MURUZÁBAL-LECUMBERRI *et al.*, 2015; NEVES *et al.*, 2009).

Uma alternativa muito mais rápida e meticulosa que os testes comerciais descritos anteriormente, são as abordagens moleculares de identificação de espécies. Dentre elas, destaca-se a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), que, basicamente, consiste na amplificação de sequências genéticas exclusivas de uma determinada espécie ou gênero a ser detectado (BARGHOUTH, 2011; COURVALIN, 2006; JÄRVINEN *et al.*, 2009).

Atualmente, a metodologia mais ágil e sofisticada para a identificação de espécies bacterianas é a espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS, do inglês *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*). O MALDI-TOF MS é uma técnica simples, economicamente viável e que garante resultados acurados na classificação de microrganismos, como os *Enterococcus*, em um tempo relativamente curto (PASTERNAK, 2012; RUDRIK *et al.*, 2017). Seu princípio é baseado em estudos proteômicos e consiste na identificação do microrganismo a partir da comparação entre os espectros de referência, que compõem um banco de dados, e o espectro gerado pela amostra. Esse espectro é formado com base na detecção do tempo de voo de moléculas ionizadas e volatilizadas oriundas do microrganismo, o que ocorre através da ação de um laser que incide sobre uma placa metálica contendo o material biológico adicionado a uma matriz (PASTERNAK, 2012).

### 1.3. A patogenicidade dos *Enterococcus*

Desde a década de 1970, quando os *Enterococcus* emergiram como agentes de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), essas bactérias têm sido cada vez mais associadas ao desenvolvimento de doenças no ambiente hospitalar, que normalmente afetam idosos; indivíduos imunocomprometidos, como pacientes transplantados, pacientes com câncer portadores de infecções adicionais causadas por outros patógenos; pacientes tratados com antibióticos de amplo espectro de ação, dentre outros. Entre as doenças causadas por esses microrganismos estão infecções do trato urinário (ITUs), bacteremias, endocardites, meningites, infecções de feridas e infecções intra-abdominais e pélvicas (ARIAS; MURRAY, 2012; MOELLERING, 1992; TEIXEIRA *et al.*, 2015).

Um dos fatores que explicam a mudança desse panorama, em que há o favorecimento da persistência das infecções enterocócicas e da adaptação desses microrganismos ao ambiente hospitalar, está associado ao uso dos antimicrobianos. Tal conjuntura tem como consequência a seleção de bactérias resistentes a esses fármacos, aumentando sua frequência em ambientes como hospitais, caracterizados pelo uso difundido de antibióticos, uma vez que essas bactérias possuíam vantagem competitiva sobre as que são sensíveis à ação desses medicamentos (CATTOIR; GIARD, 2014; GARSIN *et al.*, 2014).

Outro fator que favorece a persistência dos enterococos no ambiente hospitalar é a presença de determinantes genéticos de virulência (CAMARGO *et al.*, 2008; MILLER *et al.*, 2016; VAN TYNE; GILMORE, 2014). Proteínas codificadas por genes específicos podem viabilizar a agregação de células bacterianas e a formação de biofilme, que favorece a sobrevivência dessas bactérias em ambientes hostis e a sua dispersão para colonizar novos nichos, além de permitir a conjugação de plasmídeos carreadores de genes de resistência e de virulência. As proteínas codificadas por esses genes também podem contribuir para a adesão dos enterococos às células do hospedeiro, possibilitando a colonização de diferentes sítios anatômicos (CAMARGO *et al.*, 2008; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; SOARES *et al.*, 2014).

A compreensão dos fatores envolvidos no estabelecimento de infecções causadas por *Enterococcus*, como a resistência aos antimicrobianos e a presença de

fatores de virulência, pode ajudar a evitar a propagação desses patógenos no ambiente hospitalar (CATTOIR; LECLERCQ, 2013; SAVA; HEIKENS; HUEBNER, 2010; VAN TYNE; GILMORE, 2014).

### 1.3.1. Resistência aos antimicrobianos

A importância clínica do gênero *Enterococcus* está diretamente relacionada à sua resistência aos antimicrobianos, tendo como espécies de maior relevância humana os *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (WILLEMS; VAN SCHAİK, 2009). A procedência dos mecanismos de resistência dos enterococos pode ser intrínseca, visto que essas bactérias são inerentemente resistentes a uma ampla variedade de antimicrobianos, ou adquirida através de mutações ou por transferência horizontal de genes (HOLLENBECK; RICE, 2012; KRISTICH; RICE; ARIAS, 2014).

Entre os fármacos aos quais os enterococos possuem resistência intrínseca estão os  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos (ambos em baixos níveis), as lincosamidas, estreptograminas e sulfametoxazol associado à trimetoprima. Geralmente esse tipo de resistência está ligado à expressão de genes do próprio cromossomo bacteriano (ARIAS; MURRAY, 2012; HOLLENBECK; RICE, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2015). Os enterococos também podem se tornar refratários à ação dos antimicrobianos através da aquisição de genes que codificam resistência a diversos desses fármacos ou por eventuais mutações, tais como: Cloranfenicol, tetraciclina, macrolídeos, estreptograminas, níveis elevados de aminoglicosídeos e  $\beta$ -lactâmicos, glicopeptídeos, quinolonas, linezolida e daptomicina (ARIAS; MURRAY, 2012; HIDANO *et al.*, 2015; HIGUITA; HUYCKE, 2014; KRISTICH; RICE; ARIAS, 2014; LEBRETON; WILLEMS; GILMORE, 2014; LOZANO *et al.*, 2015; ORAVCOVA; HADELOVA; LITERAK, 2016; TREMBLAY *et al.*, 2013).

Dentre os mecanismos de resistência adquirida dos enterococos destacam-se pela importância clínica, caracterizando situações de surto ou endemicidade em várias regiões do mundo, os fenótipos HLRA (do inglês “*high-level resistance to aminoglycosides*”), que corresponde às amostras que possuem resistência a concentrações elevadas de aminoglicosídeos, e VRE (do inglês “*vancomycin-resistant enterococci*”), representado pela resistência aos glicopeptídeos (CATTOIR; LECLERCQ, 2013; MILLER *et al.*, 2016; VAN TYNE; GILMORE, 2014).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência dos enterococos — *E. faecalis* e *E. faecium* — à classe dos glicopeptídeos, mais especificamente à vancomicina, está entre os tipos de resistência de maior interesse para a saúde pública mundial (WHO, 2017). O *E. faecium* resistente à vancomicina foi incluído entre os patógenos do grupo ESKAPE, que reúne as principais espécies associadas à infecções nosocomiais, cujas alternativas terapêuticas são limitadas em decorrência do crescente padrão de resistência apresentado por esses microrganismos (RICE, 2008; SANTAJOIT; INDRAWATTANA, 2016). Em 2017, a OMS classificou o *E. faecium* resistente à vancomicina como prioridade alta na lista dos agentes patogênicos prioritários resistentes aos antibióticos, um catálogo de doze espécies de bactérias que representam a maior ameaça para a saúde humana, com o objetivo de orientar e promover a pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos (OPAS, 2017).

Desde a sua descoberta em 1986, no Reino Unido e na França, os *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) têm conquistado cada vez mais relevância como patógenos nosocomiais (CATTOIR; LECLERCQ, 2013; O'DRISCOLL; CRANK, 2015). A significância clínica dos VRE começou a repercutir, de fato, na década de 1990, com a sua rápida disseminação pelos hospitais dos Estados Unidos, também pelos hospitais da Europa e, eventualmente, no mundo todo (BONTEN; WILLEMS; WEINSTEIN, 2001; CATTOIR; LECLERCQ, 2013; FRIEDEN *et al.*, 1993).

O primeiro caso de resistência a glicopeptídeos em enterococos no Brasil, um VRE, foi notificado em 1996, representando provavelmente o primeiro caso na América do Sul (DALLA COSTA *et al.*, 1998). Desde então, múltiplos casos de infecções por VRE têm sido registrados no país (CORREA *et al.*, 2015; MERLO; DABUL; CAMARGO, 2015; SACRAMENTO *et al.*, 2017).

A identificação dos VRE é de importância clínica e epidemiológica, e para tal, são utilizadas técnicas fenotípicas — como o teste de disco-difusão e determinação de concentração inibitória mínima (CMI) — e genotípicas, como a identificação de genes codificadores de mecanismos de resistência (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* e *vanN*) por PCR (CATTOIR; LECLERCQ, 2013; COURVALIN, 2006).

### 1.3.2. Fatores de Virulência

A transição de comensal para patógeno depende da habilidade do microrganismo de se aderir ou invadir os tecidos do hospedeiro e de sobreviver e/ou suprimir os seus mecanismos de defesa imunológica. Os fatores de virulência são estruturas ou moléculas produzidas pelos patógenos responsáveis por conferir a estes tais habilidades e, conseqüentemente, pelo seu estabelecimento no organismo dos hospedeiros (JOHN; CARVALHO, 2011; MILLER *et al.*, 2016). Apesar dos enterococos não secretarem toxinas, como as produzidas por estafilococos e estreptococos, é sabido que os representantes desse gênero possuem uma variedade de determinantes de virulência, que possibilitam a sua adesão às células do trato gastrointestinal (TGI), do trato urinário e à uma diversidade de proteínas da matriz extracelular. Alguns fatores de virulência também permitem a hidrólise dessas proteínas e propiciam a formação de biofilme. Essas propriedades são essenciais para a colonização e infecção do hospedeiro (FISHER; PHILLIPS, 2009; JOHN; CARVALHO, 2011; MILLER *et al.*, 2016; SAVA; HEIKENS; HUEBNER, 2010).

Os principais fatores de virulência até então identificados nos enterococos incluem a substância agregativa (AS, do inglês *aggregation substance*), proteína de superfície de enterococos (Esp, do inglês *enterococcal surface protein*), gelatinase (GelE), citolisina (Cyl) e glicosil-hidrolase (Hyl) (BIENDO *et al.*, 2010; SAVA; HEIKENS; HUEBNER, 2010; VANKERCKHOVEN *et al.*, 2008). Além dessas proteínas, os enterococos podem usufruir de outros fatores associados à virulência, como a secreção de superóxido no ambiente extracelular (HUYCKE; GILMORE, 1997; HUYCKE; JOYCE; WACK, 1996; WANG; HUYCKE, 2007); pili Ebp (do inglês *endocarditis and biofilm-associated pilus*) de *E. faecalis* e o homólogo pili Ebp<sub>fm</sub> de *E. faecium*; proteínas MSCRAMMs (do inglês *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*); proteína EfaA (do inglês *endocardial adherence factor antigen*); antígeno polissacarídico de *Enterococcus* Epa (do inglês *enterococcal polysaccharide antigen*) presente na parede celular de *E. faecalis*; ácido lipoteicoico da parede celular e glicolípídeos de membrana, por exemplo (COMERLATO *et al.*, 2013; RIGOTTIER-GOIS *et al.*, 2015; SAVA; HEIKENS; HUEBNER, 2010; STRATEVA *et al.*, 2016).



Substância agregativa (AS) é o termo utilizado para designar um grupo de proteínas de superfície que se encontram distribuídas na forma de tufo na parede celular, são típicas de *E. faecalis* e estão envolvidas no processo de conjugação bacteriana, tendo expressão induzida por feromônios. A substância agregativa possibilita a ligação entre a célula doadora e a célula receptora, de modo a facilitar a transferência plasmidial (ARIAS; MURRAY, 2012; CLEWELL, 1993; MILLER *et al.*, 2016; OLMSTED *et al.*, 1991; VAN TYNE; GILMORE, 2014). Os feromônios que estimulam a síntese da substância agregativa nas células doadoras são pequenos peptídeos codificados pelo cromossomo e secretados pela bactéria receptora, capazes de penetrar na célula doadora e interagir de forma específica com o plasmídeo a ser estimulado, porém, já foi descrito que componentes plasmáticos do hospedeiro, como a albumina, também podem estar envolvidos na expressão dessas proteínas durante o crescimento bacteriano *in vivo* (CHANDLER; HIRT; DUNNY, 2005; HIRT; SCHLIEVERT; DUNNY, 2002; PALMER; KOS; GILMORE, 2010).

As proteínas Asa1, Asp1 e Asc10 são as mais bem estudadas deste grupo e possuem mais de 90% de identidade na sequência de aminoácidos. Dentre estas, o plasmídeo pAD1, que carrega o gene *asa1*, codificador da proteína Asa1, é o mais estudado (GALLI; FRIESENEGGER; WIRTH, 1992; GALLI; LOTTSPREICH; WIRTH, 1990; MUSCHOLL-SILBERHORN, 2000; OLMSTED *et al.*, 1991; TEIXEIRA *et al.*, 2015; WARDAL *et al.*, 2013; WARDAL; SADOWY; HRYNIEWICZ, 2010). A estrutura dessas proteínas é constituída por um domínio N-terminal, uma região variável, um domínio central, e duas sequências motivo Arg-Gly-Asp (RGD). Para a proteína Asc10, já foi demonstrado que tanto o domínio N-terminal, quanto o central, são necessários para a agregação bacteriana, em que o primeiro é capaz de se ligar ao ácido lipoteicoico da parede celular (WATERS *et al.*, 2004).

Além de viabilizar a transferência horizontal de genes, a substância agregativa também é um importante fator de virulência de *E. faecalis*, responsável por vários mecanismos que contribuem para a patogênese de infecções (MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000). Entre esses mecanismos estão: a capacidade de adesão às células do hospedeiro, como as células tubulares renais (KREFT *et al.*, 1992); adesão às proteínas da matriz extracelular (ROZDZINSKI *et al.*, 2001); aumento da hidrofobicidade da superfície celular bacteriana (HIRT; ERLANDSEN; DUNNY, 2000); resistência à fagocitose pela inibição da produção de espécies reativas de oxigênio

nos macrófagos humanos (SUSSMUTH *et al.*, 2000); sobrevivência dentro de leucócitos polimorfonucleares (RAKITA *et al.*, 1999); internalização por células epiteliais intestinais, evidenciada por experimentos *in vitro* em culturas de enterócitos humanos da linhagem HT-29, em que foi suposto que a proteína Asc10 promove a internalização através da sua ligação a um receptor específico do enterócito, gerando uma resposta no citoesqueleto da HT-29 que leva à internalização da bactéria, o que indica que a substância agregativa pode estar envolvida no processo de translocação de *E. faecalis* através do epitélio intestinal (já verificada *in vivo* em modelos de ratos), propiciando infecções sistêmicas. No entanto, os mecanismos responsáveis pela translocação ainda não foram completamente elucidados, e provavelmente existem outros fatores de virulência e mecanismos do hospedeiro que participam desse processo, como a fagocitose dos enterococos por macrófagos teciduais e seu transporte até o sistema linfático (KOCH *et al.*, 2004; SARTINGEN *et al.*, 2000; SAVA; HEIKENS; HUEBNER, 2010; WATERS; WELLS; DUNNY, 2003; WELLS *et al.*, 2000; WELLS; JECHOREK; ERLANDSEN, 1990).

Também foi observado o favorecimento da produção de biofilme, associado à persistência da bactéria em tecidos e dispositivos hospitalares, contribuindo para a formação de extensos agregados bacterianos na válvula cardíaca em casos de endocardite em modelos de coelhos e suínos (CHOW *et al.*, 1993; CHUANG-SMITH *et al.*, 2010; SCHLIEVERT *et al.*, 1998).

A proteína de superfície de enterococos (Esp) é um fator de virulência associado à parede celular dessas bactérias, como uma adesina, originalmente encontrada apenas em amostras de *E. faecalis*, porém, estudos posteriores identificaram essa estrutura também em *E. faecium* (ARCHIMBAUD *et al.*, 2002; SHANKAR *et al.*, 1999; WILLEMS *et al.*, 2001). Diferentemente dos *E. faecalis*, onde a Esp é amplamente difundida entre as amostras, tanto de origem comunitária como nosocomial, a Esp em *E. faecium* é majoritariamente identificada em amostras isoladas de hospital, corroborando com a ideia do seu envolvimento na virulência das mesmas (LEAVIS *et al.*, 2004; SAVA; HEIKENS; HUEBNER, 2010; TOP *et al.*, 2013; WILLEMS *et al.*, 2001).

O gene *esp*, responsável pela expressão da proteína de mesmo nome, encontra-se localizado em uma ilha de patogenicidade em ambas as espécies (LEAVIS *et al.*, 2004; SHANKAR; BAGHDAYAN; GILMORE, 2002). Apesar do

determinante genético ser único, ele pode codificar formas alternativas de expressão da proteína Esp, o que colabora para a evasão do sistema imunológico do hospedeiro e, conseqüentemente, para a persistência da bactéria nos sítios de infecção (SHANKAR *et al.*, 1999; VAN TYNE; GILMORE, 2014). Essa proteína de superfície é um importante fator associado à produção de biofilme tanto por *E. faecalis*, como por *E. faecium*, o que explica o fato de que amostras hospitalares dessas espécies são capazes de se aderir a dispositivos médicos, fontes comuns de infecções nosocomiais (HEIKENS; BONTEN; WILLEMS, 2007; KART *et al.*, 2017; PAGANELLI; WILLEMS; LEAVIS, 2012; TENDOLKAR *et al.*, 2004; ZHENG *et al.*, 2017).

A formação de biofilme também está relacionada às infecções do trato urinário — onde a Esp pode estar envolvida na aderência de *E. faecium* e *E. faecalis* às células epiteliais dessa região — e à endocardite, através da adesão dos enterococos às valvas cardíacas em sítios lesionados, representando um processo-chave para a colonização inicial e para o progresso da infecção em tais locais (DONLAN; COSTERTON, 2002; HEIKENS; BONTEN; WILLEMS, 2007; LEENDERTSE *et al.*, 2009; MOHAMED *et al.*, 2004; SHANKAR *et al.*, 2001).

A gelatinase (GelE) é uma protease produzida e secretada por enterococos capaz de hidrolisar gelatina, colágeno, elastina, caseína, hemoglobina, glucagon, neurotensinas e outros peptídeos bioativos, além de participar na modulação da resposta imune do hospedeiro através da hidrólise da proteína C3 do sistema complemento, resultando na inativação desse recurso da imunidade inata e causando redução substancial da fagocitose dos enterococos por leucócitos polimorfonucleares (PARK *et al.*, 2008; VERGIS *et al.*, 2002). Sua expressão é codificada pelo gene *gelE*, que é moderada por *quorum sensing* através do sistema de genes reguladores específicos Fsr, homólogo ao sistema Agr de estafilococos (responsável pela regulação de diversos determinantes genéticos de virulência em *Staphylococcus aureus*) (QIN *et al.*, 2000). Já foi relatado que esse sistema está, de fato, envolvido na patogenicidade de infecções causadas por *E. faecalis* (MYLONAKIS *et al.*, 2002; PINKSTON *et al.*, 2011).

Além da degradação dos tecidos do hospedeiro, entre as ações dessa protease estão incluídas a remoção de proteínas defeituosas da superfície bacteriana e a ativação de autolisina, que degrada o peptidoglicano da parede celular e induz a liberação de DNA no meio extracelular, o que tem um papel no desenvolvimento e

estrutura do biofilme (THOMAS *et al.*, 2009; WATERS *et al.*, 2003). Em alguns estudos com mutantes de deleção de *gelE*, foi observada redução na formação de biofilme; redução na translocação por células intestinais T84; atenuação da virulência em casos de peritonite, endocardite e endoftalmite; redução na aderência às raízes dentárias; e também o aumento na migração de células inflamatórias, como neutrófilos, para o sítio de infecção (ENGELBERT *et al.*, 2004; HUBBLE *et al.*, 2003; MOHAMED *et al.*, 2004; SIFRI *et al.*, 2002; SINGH *et al.*, 2005, 1998; THURLOW *et al.*, 2010; ZENG; TENG; MURRAY, 2005).

É importante destacar que amostras de *E. faecalis* secretoras de gelatinase já foram isoladas tanto de espécimes clínicos correspondentes a infecções graves, como de processos de colonização (SOLHEIM *et al.*, 2009).

As condições ambientais do trato gastrointestinal, o equilíbrio dos microrganismos na microbiota, o sinergismo bacteriano, a presença e persistência de muitas células viáveis são fatores que podem ocasionar a ativação de genes *gelE* previamente “silenciosos”, induzindo a expressão de gelatinase. Amostras de *E. faecalis* portadoras desses genes silenciosos já foram isoladas de materiais clínicos e de alimentos (EATON; GASSON, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

A citolisina (Cyl), também chamada de hemolisina, é uma substância produzida e secretada por aproximadamente 30% das amostras de *E. faecalis*, codificada por um operon de 8 genes (*cyIR1*, *cyIR2*, *cyILL*, *cyILS*, *cyIM*, *cyIB*, *cylA*, *cylI*) geralmente carregado em plasmídeos induzíveis por feromônios ou inserido em ilhas de patogenicidade do cromossomo bacteriano (COQUE *et al.*, 1995; SHANKAR; BAGHDAYAN; GILMORE, 2002; VAN TYNE; MARTIN; GILMORE, 2013). A citolisina é uma proteína formadora de poros composta por duas subunidades, CylL-L e CylL-S, ativada proteoliticamente através da ação da serina-protease CylA (BOOTH *et al.*, 1996; MILLER *et al.*, 2016; SEGARRA *et al.*, 1991).

Essa proteína age como uma bacteriocina amplamente ativa e eficaz contra quase todas as espécies de bactérias Gram-positivas, integrando a diversificada classe dos peptídeos lantibióticos e, dessa forma, atribuindo uma vantagem competitiva às bactérias que a secretam (VAN TYNE; MARTIN; GILMORE, 2013; WILLEY; VAN DER DONK, 2007). Também são responsáveis pela lise de eritrócitos humanos, de cavalo e de coelho, porém não possuem ação hemolítica sobre ovinos

e bovinos, o que supostamente é explicado pelos diferentes níveis de fosfatidilcolina da membrana celular (MILLER *et al.*, 2016). Além das células vermelhas do sangue, a citolisina pode promover a lise de macrófagos e neutrófilos, contribuindo para a evasão das defesas do sistema imunológico do hospedeiro (GHOSH; DOWD; ZUREK, 2011).

A associação entre a expressão de citolisina e o aumento da severidade das infecções enterocócicas já foi observada tanto em modelos animais como em casos clínicos de humanos (MISHRA *et al.*, 2017; VAN TYNE; MARTIN; GILMORE, 2013).

Os genes *cyl* já foram identificados em diversas espécies de enterococos, expressos ou silenciados, incluindo amostras de referência, amostras de origem clínica e de alimentos. O fato desses determinantes de virulência estarem amplamente distribuídos, em uma diversidade de espécies e ambientes, contribui para a evolução da patogenicidade das infecções enterocócicas, o que leva em consideração a habilidade natural dos representantes desse gênero de acumularem e compartilharem elementos genéticos extracromossomais entre si e com outras bactérias. Dessa forma, faz-se necessária a realização de estudos que busquem entender mais sobre a virulência de amostras de enterococos além das espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, uma vez que, com a evolução da patogenicidade desse gênero, estas podem passar a representar potenciais ameaças à saúde humana (SEMEDO *et al.*, 2003).

A proteína Hyl foi inicialmente descrita como homóloga à proteína hialuronidase, um fator de virulência associado a outras bactérias Gram-positivas, como os estreptococos, no entanto, a atividade de hialuronidase não é detectada em amostras de *E. faecium* portadoras do gene *hyl*, que codifica tal proteína (LAVERDE GOMEZ *et al.*, 2011; SUITS *et al.*, 2014). Trata-se, na verdade, de uma glicosil-hidrolase da família 84, dotada de atividade  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase (GAO; HOWDEN; STINEAR, 2018; PANESSO *et al.*, 2011).

Entre os enterococos, o gene *hyl* é identificado quase exclusivamente em amostras clínicas de *E. faecium*, sendo facilmente encontrado em megaplasmídeos carregados por essas bactérias, cuja presença já mostrou ampliar a sua capacidade de colonização do trato gastrointestinal e a virulência de amostras comensais em quadros de peritonite experimental (ARIAS *et al.*, 2009; GAO; HOWDEN; STINEAR, 2018). Entretanto, estudos já evidenciaram que o gene *hyl* não é o principal responsável pela

virulência conferida por esses megaplasmídeos, os quais, sabidamente, também albergam genes de resistência aos antimicrobianos e genes codificadores de pili (KIM *et al.*, 2010; LAVERDE GOMEZ *et al.*, 2011). A presença do gene *hyl* também já foi associada à do gene *esp* em amostras clínicas de *E. faecium* resistentes à vancomicina pertencentes a um grupo de bactérias de alto risco de origem hospitalar, caracterizadas pela técnica de sequenciamento de múltiplos *loci* como complexo clonal 17 (CC17). HERRERA *et al.*, 2017; LAVERDE GOMEZ *et al.*, 2011; WILLEMS *et al.*, 2012).

A localização do gene *hyl* e de outros elementos genéticos no mesmo plasmídeo conjugativo (como o gene *esp*, genes codificadores de pili e determinantes de resistência) sugere a co-seleção de potenciais fatores de virulência pelas condições do ambiente hospitalar (LAVERDE GOMEZ *et al.*, 2011). Isso indica que a proteína Hyl pode funcionar como um marcador de fatores de virulência que contribuem para a colonização do patógeno e pode ser uma explicação para a rápida e bem-sucedida adaptação de algumas subpopulações de *E. faecium* ao ambiente hospitalar (GAO; HOWDEN; STINEAR, 2018; LAVERDE GOMEZ *et al.*, 2011).

As MSCRAMMs são componentes da superfície celular bacteriana que reconhecem moléculas da matriz extracelular do hospedeiro, sendo considerados importantes elementos nos primeiros estágios da infecção. Em *Enterococcus*, algumas proteínas que fazem parte dessa família já são bem estudadas, entre elas estão as adesinas de colágeno: Ace, presente em amostras de *E. faecalis*, e a Acm, uma proteína homóloga encontrada em amostras de *E. faecium* (ARIAS; MURRAY, 2012). Assim como a substância agregativa e a *esp*, as adesinas de colágeno possuem o motivo estrutural LPXTG, que é a região da proteína que se liga ao peptidoglicano da parede celular bacteriana, permitindo o seu ancoramento na superfície (MILLER *et al.*, 2016).

A Ace e a Acm já mostraram influência na patogênese das infecções enterocócicas *in vivo* (ARIAS; MURRAY, 2012; MILLER *et al.*, 2016). Amostras bacterianas mutadas com deleção no gene *ace*, codificador da proteína de mesmo nome, se apresentaram mais atenuadas em modelos de endocardite e de infecção do trato urinário quando comparadas ao tipo selvagem (LEBRETON *et al.*, 2009; NALLAPAREDDY *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2010). Também já foi descrito que anticorpos específicos para o domínio proteico da Ace que se liga ao colágeno são

capazes de proteger ratos em modelos de endocardite, indicando que essa adesina exerce um papel substancial nesse tipo de infecção (SINGH *et al.*, 2010).

O pili de *Enterococcus* é outro elemento capaz de determinar fenótipos de virulência. O pili Ebp (do inglês *endocarditis and biofilm-associated pilus*) de *E. faecalis* e seu homólogo Ebp<sub>fm</sub>, de *E. faecium*, são protusões longas e filamentosas de natureza proteica distribuídas pela superfície celular dessas bactérias, capazes de se ligar às proteínas da matriz extracelular, fibrinogênio e colágeno e, além disso, estudos sugerem seu envolvimento na formação de biofilme (MILLER *et al.*, 2016; MONTEALEGRE *et al.*, 2015, 2016).

A proteína EfaA (do inglês *endocardial adherence factor antigen*) é uma importante adesina de *Enterococcus*, apresentando homologia com outras proteínas de superfície de *Streptococcus*, está envolvida na patogênese da endocardite em amostras de *E. faecalis* e tem expressão induzida na presença de soro humano (LOWE; LAMBERT; SMITH, 1995; TEIXEIRA *et al.*, 2015).

Glicolipídios e polissacarídeos também integram o grupo de moléculas associadas ao envelope celular que contribuem para a virulência dos enterococos. Dentre os glicolipídios, o ácido lipoteicóico é um componente antigênico presente na parede celular de *Enterococcus* e outras bactérias Gram-positivas, sendo estabelecido que esses epítomos favorecem a opsonização por anticorpos e a morte celular mediada pela ação do sistema complemento e por leucócitos (FABRETTI *et al.*, 2006; MILLER *et al.*, 2016). No entanto, alguns isolados de *E. faecalis* podem expressar um polissacarídeo capsular, capaz de formar uma proteção que blinda o ácido lipoteicóico e possibilita a evasão dos mecanismos de defesa imunológica do hospedeiro (THURLOW; THOMAS; HANCOCK, 2009).

A deficiência do glicopeptídeo  $\alpha$ -diglicosildiácilglicerol está associada a redução da produção de biofilme e redução da aderência às células do hospedeiro quando comparada aos modelos experimentais de bacteremia causada por uma cepa capaz de produzir tal substância, em modelos experimentais, sugerindo o envolvimento no mesmo em tais processos infecciosos (THEILACKER *et al.*, 2009).

Dentre os polissacarídeos destaca-se o Epa (do inglês, *enterococcal polysaccharide antigen*), rico em ramnose e presente em amostras de *E. faecalis*, são importantes para a produção de biofilme, favorecendo a persistência no ambiente

hospitalar, além de conferir proteção contra a fagocitose por polimorfonucleares e facilitar o processo de translocação intestinal (MILLER *et al.*, 2016; TEIXEIRA *et al.*, 2015; TENG *et al.*, 2002).

A identificação dos fatores de virulência de *Enterococcus* é relevante, visto que esses determinantes estão frequentemente relacionados ao desenvolvimento das infecções e à disseminação dos patógenos no ambiente (VAN TYNE; GILMORE, 2014). Dessa forma, são empregadas técnicas fenotípicas e genotípicas para avaliar a presença desses atributos entre as amostras bacterianas desse gênero. Um método rápido e conveniente utilizado para este fim é a técnica de PCR *multiplex*, que permite a detecção simultânea dos principais genes de virulência (VANKERCKHOVEN *et al.*, 2004).

#### **1.4. Aspectos epidemiológicos dos *Enterococcus***

As bactérias do gênero *Enterococcus* são colonizadoras naturais do trato gastrointestinal humano, porém, podem ser encontradas em menor proporção no trato genito-urinário, na cavidade oral e na pele (FARON; LEDEBOER; BUCHAN, 2016; O'DRISCOLL; CRANK, 2015). A transmissão dos *Enterococcus* pode ocorrer através do contato físico entre um indivíduo contaminado e um não contaminado, ou pela exposição à fômites. No ambiente hospitalar, as mãos dos profissionais de saúde e materiais hospitalares são os principais veículos de disseminação, sendo capazes de sobreviver por cerca de quatro meses nas superfícies dessas instalações (ARIAS; MURRAY, 2012; KRAMER; SCHWEBKE; KAMPF, 2006; NOSKIN *et al.*, 1999; O'DRISCOLL; CRANK, 2015; SNYDER *et al.*, 2008).

Entre os fatores que favorecem a colonização por VRE está a exposição a antimicrobianos, que exercem uma pressão seletiva sobre a microbiota e permitem o crescimento das amostras resistentes à medida que as suscetíveis são inibidas. A imunossupressão e a presença de doenças crônicas também estão entre os principais fatores de risco (FURTADO *et al.*, 2006; LINDEN, 2007; PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS *et al.*, 2014; VERGIS *et al.*, 2001; ZACHARIOUDAKIS *et al.*, 2014).

A partir da década de 1990, houve um grande aumento no número de casos de infecções enterocócicas em todo o mundo, o que pode ser explicado pela emergência da resistência aos antimicrobianos, principalmente à classe dos glicopeptídeos (CATTOIR; LECLERCQ, 2013; FRIEDEN *et al.*, 1993; WILLEMS *et al.*, 2001).



Com a emergência dos VRE, iniciou-se uma série de estudos epidemiológicos visando elucidar os aspectos envolvidos na disseminação dos clones relacionados às infecções nosocomiais. Para este fim, algumas técnicas de tipificação bacteriana foram desenvolvidas desde então, entre elas, a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE, do inglês *Pulsed field gel electrophoresis*), é considerada padrão-ouro apesar de sua laboriosidade (MONDINO *et al.*, 2003; MORRISON *et al.*, 1999). Essa técnica consiste na separação de grandes fragmentos do DNA cromossômico bacteriano, clivados pela ação de uma determinada enzima de restrição, através da reorientação do DNA em gel pela ação de campos elétricos alternados. Dessa forma, pela comparação dos perfis eletroforéticos obtidos, tornou-se possível classificar amostras bacterianas de uma mesma espécie em linhagens distintas, e conseqüentemente, analisar a correlação genética entre os isolados circulantes (GOERING, 2010; TENOVER *et al.*, 1995). A tipificação por MLST (do inglês, *Multilocus sequencing typing*) também tem sido bastante útil para estudos epidemiológicos de infecções enterocócicas, valendo-se do sequenciamento de genes de manutenção celular de *E. faecium* e *E. faecalis* (HOMAN *et al.*, 2002; RUIZ-GARBAJOSA *et al.*, 2006).

As fortes pressões seletivas exercidas pelos diferentes tipos de ambientes em que os enterococos estão presentes delineou as estratégias de aptidão desse gênero para condições específicas, garantindo a sua sobrevivência. A espécie *E. faecium*, ao decorrer de sua trajetória evolutiva, originou linhagens altamente adaptadas ao ambiente hospitalar (GUZMAN PRIETO *et al.*, 2016). Além da resistência aos antimicrobianos, a habilidade de trocar elementos genéticos codificadores de fatores de virulência é uma das explicações para o êxito da disseminação de *Enterococcus* (HEGSTAD *et al.*, 2010; LEAVIS *et al.*, 2003; PALMER; KOS; GILMORE, 2010; VAN SCHAİK *et al.*, 2010).

O primeiro elemento adaptativo descrito como específico dos clones de *E. faecium* associados ao ambiente hospitalar foi o gene *esp* (WILLEMS *et al.*, 2001). Além deste, outros determinantes foram posteriormente descobertos como específicos de amostras hospitalares, porém menos frequentes (HEIKENS *et al.*, 2008; HENDRICKX *et al.*, 2009; HENDRICKX; VAN SCHAİK; WILLEMS, 2013; LEAVIS *et al.*, 2003; PAGANELLI *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2013). As amostras de *E. faecium* oriundas de ambiente hospitalar são, majoritariamente, associadas ao CC17, uma classificação estabelecida pelo algoritmo usado para reconstruções

filogenéticas das amostras a partir das sequências obtidas pela técnica de MLST. Essas amostras têm como característica a resistência à ampicilina e às quinolonas, além de serem caracterizadas por possuírem elementos genéticos móveis, genes de fagos, sequências plasmídicas, proteínas de membrana e uma ilha de patogenicidade, que inclui o gene *esp* (GAO; HOWDEN; STINEAR, 2018; TOP; WILLEMS; BONTEN, 2008).

As amostras hospitalares de *E. faecalis* estão mais relacionadas ao CC2, CC9 e CC87, entretanto, existem outros complexos clonais também circulantes no ambiente hospitalar (KUCH *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2017). Já foi relatado que tais isolados podem possuir determinantes genéticos de resistência a antimicrobianos e virulência, como a ilha de patogenicidade de *E. faecalis*, genes codificadores de Esp, polissacarídeo capsular, gelatinase, substância agregativa, citolisina e Ace (GUZMAN PRIETO *et al.*, 2016).

Até o início dos anos 2000, *E. faecalis* era responsável por cerca de 90% das infecções enterocócicas e *E. faecium* por cerca de 5-10%, no entanto, nos últimos anos, infecções causadas por *E. faecium* têm aumentado e atualmente representam parcela significativa das infecções associadas a bactérias desse gênero, diminuindo assim, a disparidade entre a frequência de isolamento destas espécies (GAO; HOWDEN; STINEAR, 2018; TOP; WILLEMS; BONTEN, 2008).

De todas as regiões do mundo, a América do Norte possui a maior prevalência de VRE. De acordo com o *National Health-care Safety Network* (NHSN) nos Estados Unidos, de 2009 a 2010, 35.5% dos enterococos associados a infecções nosocomiais eram resistentes à vancomicina, representando a segunda maior causa de infecções dessa natureza no país (SIEVERT *et al.*, 2013). No Canadá, a prevalência de VRE é muito menor. De acordo com a CANWARD, de 2007 a 2011, apenas 6% dos enterococos isolados no país eram resistentes à vancomicina (ZHANEL *et al.*, 2013).

Na Europa, dependendo do país, a prevalência de VRE costuma ser baixa. Em 2013, os dados do *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS) revelaram apenas 4% de prevalência de VRE no continente europeu. Países como França, Espanha e Suécia apresentaram menos de 1% dessa prevalência, no entanto, países como Chipre, Grécia, Irlanda, Portugal e Reino Unido exibiram índices superiores a 20% (ECDC, 2016).

Os estudos epidemiológicos sobre VRE no Brasil, em sua maioria, foram realizados nos grandes centros urbanos, sobretudo nos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo. Os dados sobre a prevalência de amostras bacterianas do gênero *Enterococcus* no Espírito Santo são raros, e os poucos que existem são provenientes de hospitais localizados na região metropolitana do estado, onde foi detectada a presença de *E. faecium* resistente à vancomicina (ALVES *et al.*, 2017). Um estudo realizado em um hospital do município de Cachoeiro de Itapemirim, localizado no sul do estado, descreveu a presença de enterococos portadores de alta frequência de resistência fenotípica a diversos antimicrobianos (MIRANDA; SIMÕES; TEIXEIRA, 2017). Dessa forma, torna-se pertinente a investigação das características das amostras que circulam nessa região para a melhor compreensão dos fatores que favorecem a sua disseminação, como a presença de fatores de virulência, dados ainda ausentes, sendo objeto de estudo deste trabalho.

## 2. OBJETIVO

- Avaliar a prevalência e diversidade de determinantes genéticos de virulência em amostras de *Enterococcus* isoladas de pacientes de dois hospitais da cidade de Cachoeiro de Itapemirim-ES entre os meses de setembro de 2016 e setembro de 2017.

### 2.1. Objetivos específicos

- Identificar as espécies das amostras de *Enterococcus*, relacionadas a processos infecciosos ou colonização, provenientes de pacientes internados em duas unidades hospitalares de Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo;
- Determinar a susceptibilidade das amostras bacterianas a um painel de 18 antimicrobianos e a ocorrência de amostras multirresistentes;
- Identificar genes associados à expressão dos principais fatores de virulência de enterococos;
- Comparar a presença de genes de virulência entre amostras susceptíveis e resistentes à vancomicina;
- Avaliar a diversidade genética das amostras por meio da técnica de PFGE.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Amostragem

Para este estudo, de desenho descritivo transversal, foram analisadas 106 amostras de bactérias do gênero *Enterococcus* da bacterioteca do Laboratório de Apoio Biotecnológico, localizado no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Estas amostras, por sua vez, foram isoladas de espécimes clínicos considerados indicativos de infecção (urina; sangue; secreções, incluindo de ferida operatória e outras não especificadas; fragmento tecidual, incluindo amostras de fragmentos ósseos e fragmentos de epitélio de pé diabético; e ponta de cateter intravascular) ou colonização (amostras coletadas por *swab* retal). As coletas foram feitas de pacientes internados em unidades de monitoramento intensivo — centro de tratamento intensivo (CTI), unidades de tratamento intensivo (UTI) e unidade de alta dependência de cuidados (UADC) — e enfermaria — pronto socorro, maternidade e setor de oncologia — de dois hospitais da cidade de Cachoeiro de Itapemirim – ES, aqui discriminados como Hospitais A e B, e coletadas entre o período de setembro de 2016 e setembro de 2017.

O estudo seguiu o molde de uma amostra coletada por paciente, exceto em casos nos quais um mesmo indivíduo era portador de espécies distintas de *Enterococcus* ou quando amostras de uma mesma espécie apresentaram resultados divergentes nos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos.

As amostras estavam armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  na forma de suspensão contendo 10 % (p/v) de *Skim Milk* (Becton, Dickinson & Company, Sparks, MD, EUA) e 10 % (v/v) de glicerol (Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S/A, RJ, Brasil). Para a realização dos experimentos, as amostras foram previamente reativadas através de semeadura por esgotamento em meio ágar sangue de carneiro 5% de origem comercial (Plast-Labor Ind. e Com. Materiais e Equipamentos de Laboratório, Rio de Janeiro, RJ) e, em seguida, incubadas por 18h -24h a uma temperatura de  $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ .

O presente estudo ofereceu risco diminuto aos pacientes aqui incluídos, uma vez que a coleta do material biológico estava incluída na rotina das instituições hospitalares, como parte dos procedimentos necessários ao diagnóstico. Existiu, assim, dispensa de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A fim de

preservar os dados dos pacientes, quando disponibilizados, tal estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Centro Universitário São Camilo, sob número de CAAE 55844616.8.0000.0062.

### **3.2. Identificação das amostras bacterianas**

As espécies das amostras foram identificadas através da técnica de MALDI-TOF MS e, para isso, estas foram semeadas em placas de ágar sangue (Plast-Labor) e incubadas por 18h - 24h a uma temperatura de  $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ . Em seguida, uma colônia correspondente ao crescimento de cada amostra foi removida da placa com o auxílio de uma haste de madeira e aplicada sobre uma área definida na superfície da placa de aço inoxidável polida (MSP 96 *target polished steel* BC, Bruker Daltonics®, Bremen, Alemanha), a qual, logo após, foi revestida com  $1\mu\text{l}$  da matriz HCCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, Bruker Daltonics®, Bremen, Alemanha).

A análise foi feita em um espectrômetro de massa *MicroflexLT* (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemanha) equipado com laser de 337nm de nitrogênio no modo linear utilizando o *software* MALDI *Flex Control* 3.3 no modo automático (MBT\_FC.par). A calibração automática do aparelho foi realizada de acordo com as instruções do fabricante a partir de uma amostra-controle de *Escherichia coli* J56 devido ao seu perfil típico de proteínas, a qual também foi aplicada à placa de aço inoxidável polida.

Os espectros de massas foram coletados na faixa de 2.000 a 20.000 m/z e analisados com auxílio do *software* MALDI *Biotyper* 2.0 (Bruker Daltonics®, EUA) adotando configurações padrão para identificação bacteriana. A assimilação das espécies pelo *software* se dá pela comparação entre os espectros obtidos das amostras estudadas e os espectros padronizados contidos no banco de dados do equipamento. São considerados escores de confiabilidade para a identificação das espécies os situados acima de 2.3, uma escala fornecida pelo aparelho.

### **3.3. Determinação da Susceptibilidade aos Antimicrobianos**

Foram utilizados o teste de disco-difusão em ágar, determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por diluição em ágar e difusão em gradiente contínuo utilizando fitas *E-test*® (bioMérieux, França), tornando possível a classificação das amostras em susceptíveis, intermediárias e resistentes.

Os critérios de susceptibilidade, intermediária e resistência adotados neste estudo foram baseados nos padrões do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018), em que são consideradas susceptíveis as amostras bacterianas sobre as quais os fármacos, em suas dosagens usuais, possuem eficácia clínica no tratamento da infecção. São consideradas intermediárias as amostras que podem ser eliminadas dependendo da concentração do fármaco no sítio de infecção, sendo uma categoria com menor taxa de eficácia clínica. As amostras bacterianas resistentes, por sua vez, são as capazes de subsistir ao tratamento realizado com doses habituais do antimicrobiano, determinando a falha terapêutica.

As amostras foram consideradas multirresistentes (MDR, do inglês *Multidrug resistant*) quando apresentaram resistência a pelo menos três das treze classes de antimicrobianos testadas neste estudo. Adotou-se a terminologia “antibiotipo” como descrição do perfil de resistência obtido para cada amostra.

### **3.3.1. Técnica de disco difusão**

A técnica de disco-difusão em ágar foi realizada para a avaliação da susceptibilidade das amostras bacterianas a um painel de 18 antimicrobianos, segundo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015).

Para a realização do teste, inicialmente foi feita a semeadura das amostras bacterianas em placas de ágar sangue (Plast-Labor), as quais, em seguida, foram incubadas por 18h - 24h a uma temperatura de  $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ . Posteriormente, foi preparado o inóculo em solução salina estéril (NaCl 0,85%) a 0,5 na escala de turbidez de McFarland. Cada suspensão bacteriana foi semeada em placas de ágar Mueller-Hinton (Mueller-Hinton Agar, Becton, Dickinson and Company), onde, em seguida, foram posicionados os discos de antimicrobianos.

Os antimicrobianos testados (Oxoid Brasil Ltda, São Paulo, SP) abrangeram treze classes distintas:  $\beta$ -lactâmicos (ampicilina 10 $\mu\text{g}$  e penicilina 30 $\mu\text{g}$ ); ansamicinas (rifampicina 5 $\mu\text{g}$ ); estreptograminas (quinupristina/dalfopristina 15 $\mu\text{g}$ ); fluoroquinolonas (ciprofloxacina 5 $\mu\text{g}$ , norfloxacina 10 $\mu\text{g}$  e levofloxacina 5 $\mu\text{g}$ ); fênicos (cloranfenicol 30 $\mu\text{g}$ ); macrolídeos (eritromicina 15 $\mu\text{g}$ ); glicilciclinas (tigeciclina 15 $\mu\text{g}$ ); fosfomicinas (fosfomicina 200 $\mu\text{g}$ ); oxazolidinonas (linezolida 30 $\mu\text{g}$ ); furantoínas (nitrofurantoína 300 $\mu\text{g}$ ); tetraciclina (tetraciclina 30 $\mu\text{g}$ ); glicopeptídeos (vancomicina

30µg e teicoplanina 30µg) e aminoglicosídeos em elevados níveis (gentamicina 120µg e estreptomicina 300µg).

Após a aplicação dos discos de antimicrobianos, as placas foram incubadas por 24h a uma temperatura de  $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ . Com o fim deste período, os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados e interpretados de acordo com os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018), com a exceção da tigeciclina, para a qual se valeram as diretrizes do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2018). Para fins de controle da qualidade desta técnica foram empregadas amostras-controle de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC29212.

### **3.3.2. Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de aminoglicosídeos por diluição em ágar**

A determinação da CIM dos aminoglicosídeos em ágar foi feita para as amostras bacterianas que apresentaram resultados inconclusivos no teste de disco-difusão para os fármacos estreptomicina (n=8) e gentamicina (n=3).

As amostras bacterianas foram submetidas a diferentes concentrações das drogas, variando de 0,25 µg/mL a 4096 µg/mL para a estreptomicina (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) e de 0,25 µg/mL a 1024 µg/mL para gentamicina (Sigma Co.). As soluções de cada antimicrobiano foram preparadas dez vezes mais concentradas que a dose de interesse, utilizando-se água estéril como solvente (CLSI, 2018), para que, ao adicionar as mesmas no ágar Mueller-Hinton, atingissem a concentração desejada.

Os inóculos bacterianos foram preparados a partir de crescimento recente em solução salina estéril a 0,5 na escala de turbidez de McFarland. De cada inóculo bacteriano, foi diluída uma alíquota de 100 µl em 900 µl de solução salina 0,85% estéril, logo após, foram removidos 300 µl dessa nova suspensão e depositados nos respectivos poços do repicador do tipo Steers. Posteriormente, com o uso do repicador, as amostras foram aplicadas nas superfícies das placas de meio de cultura contendo as diferentes concentrações dos antimicrobianos, as quais, em seguida, foram incubadas por 24h a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ . Após esse período, as placas com estreptomicina que não apresentaram crescimento bacteriano foram reincubadas por mais 24h (CLSI,



2018). A CIM foi determinada de acordo com a menor das concentrações dos antimicrobianos capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Foram utilizadas as seguintes amostras-controle: *E. faecalis* ATCC29212 (suscetíveis a níveis elevados de estreptomicina e gentamicina) e *E. faecalis* SS1332 (resistentes a níveis elevados de estreptomicina e gentamicina).

### **3.3.3. Técnica de difusão em gradiente contínuo para determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) através de *E-test*®**

Essa técnica foi realizada para a determinação das CIMs das amostras que apresentaram resistência intermediária no teste de disco-difusão aos antimicrobianos: vancomicina (n=19), teicoplanina (n=9) e linezolida (n=7).

Inicialmente as amostras bacterianas foram semeadas em placas de ágar sangue (Plast-Labor) e incubadas por 18h-24h a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ . A partir do crescimento obtido, foram preparadas suspensões de cada amostra em solução salina estéril (NaCl 0,85%) ajustadas a 0,5 na escala de McFarland, as quais foram semeadas em placas de ágar Mueller-Hinton (Mueller-Hinton Agar, Becton, Dickinson and Company) e, posteriormente, foi adicionada uma fita de *E-test*® na superfície do meio de cultura de cada placa, com o uso de uma pinça esterilizada. As placas foram incubadas por 24h a  $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e, após esse período, procedeu-se a leitura e interpretação dos halos de inibição de crescimento bacteriano de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018).

Para o controle de qualidade do processo, foi utilizada a amostra-controle *Enterococcus faecalis* ATCC29212.

### **3.4. Extração do DNA bacteriano**

O DNA bacteriano foi extraído conforme a metodologia descrita por Pinto *et al.* (2013), onde uma pequena alíquota de 1µl da suspensão bacteriana previamente armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  foi semeada em ágar sangue (Plast-Labor) e incubada por 18h-24h a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1$  para a reativação da amostra. A partir do crescimento bacteriano obtido, cada amostra foi repicada para uma nova placa de ágar sangue e submetida às mesmas condições de cultura que as descritas na etapa anterior. Subsequentemente, utilizando uma alça bacteriológica, 1µl do crescimento bacteriano

recente foi removido e depositado em um microtubo contendo uma suspensão composta por 200 µl da resina Chellex-100® (Bio-Rad Laboratories, EUA) 5% e 2µl de proteinase K (Sigma Co.) 20mg/ml, sendo esse conteúdo homogeneizado e incubado por 1h a 50°C, logo após, foi feita uma nova homogeneização seguida de outro período de incubação, dessa vez a 95°C por 10 min. Ao final da incubação, o conteúdo foi centrifugado a 12000 rpm por 3 min, o sobrenadante foi armazenado a - 20°C e utilizado como fonte de DNA molde para procedimentos ulteriores.

### 3.5. Caracterização genotípica dos fatores de virulência

A pesquisa por genes codificadores de fatores de virulência nas amostras do presente estudo foi realizada através da técnica de PCR *multiplex*. No **Quadro 1** estão listados os genes associados à virulência de bactérias do gênero *Enterococcus*, responsáveis pela expressão de: Substância agregativa, gelatinase, citolisina, proteína de superfície de enterococos e glicosil-hidrolase.

**Quadro 1.** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para pesquisa dos genes relacionados à virulência em amostras bacterianas do gênero *Enterococcus*

Fator de virulência	Gene	Primer / Sequências iniciadoras (5'-3')	Produto (pb)	Referência
Substância agregativa	<i>asaI</i>	ASA11: GCACGCTATTACGAACTATGA ASA12: TAAGAAAGAACATCACCACGA	375	Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004
Gelatinase	<i>gelE</i>	GEL11: ACCCCGTATCATTGGTTT GEL12: ACGCATTGCTTTTCCATC	405	Gomes <i>et al.</i> , 2008
Citolisina	<i>cylA</i>	CYT I: ACTCGGGGATTGATAGGC CYT IIb: GCTGCTAAAGCTGCGCTT	688	Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004
Proteína de superfície de enterococos	<i>esp</i>	ESP 14F: AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG ESP 12R: AATTGATTCTTTAGCATCTGG	510	Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004
Glicosil-hidrolase	<i>hyl</i>	HYL n1: ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG HYL n2: GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	276	Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004

A detecção de determinantes genéticos de virulência das amostras bacterianas, pela técnica de PCR *multiplex*, foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Vankerckhoven *et al.* (2004), com pequenas modificações.

A mistura da reação, de volume total 22,5 µl, foi composta por 0,8 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, com a exceção de ASA 11 e ASA 12, que foram adicionados em uma concentração de 0,6 µM; além disso, também compuseram a mistura 0,1 µM de cada dNTP (Invitrogen®), 2,5 U da enzima Platinum® *Taq*

polimerase (Invitrogen®), 3,0 de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Invitrogen®), 1x PCR *buffer* (10 mM Tris, 50 mM KCl) de pH 8.3 (Invitrogen®) e água Milli-Q. Em seguida, foi acrescida à mistura 2,5 µl de DNA molde.

A reação foi feita em termociclador (*Veriti 96-Well Thermal Cycler; Applied Biosystems*) programado para as seguintes condições: 1 ciclo de 5 min a 94°C para desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C para desnaturação, 1 min a 56°C para anelamento, 1 min a 72°C para extensão, seguidos de 1 ciclo de 10 min a 72°C para extensão final.

A eletroforese dos produtos genéticos amplificados foi feita em gel de agarose (Ludwig Biotecnologia Ltda, Alvorada – RS, Brasil) a 1.8% (p/v) em cuba horizontal (*HE 33, GE Healthcare, Amersham Systems-BRL*, Little Chalfont, Reino Unido), sob uma tensão constante de 100V. A solução tampão para a corrida eletroforética utilizada foi TBE 0.5X (Tris base 44mM, ácido bórico 44mM e EDTA 1mM) de pH 8.0. Após a corrida, os géis foram corados com brometo de etídio 0.5µg/mL (Sigma Co.) por 20 minutos, e em seguida, visualizados e fotografados com o auxílio de um transluminador sob a luz ultravioleta (UV) e do sistema *MiniBis Pro* (DNR Bio-Imaging Systems Ltda., Jerusalém, Israel).

Para a identificação dos genes de acordo com os seus respectivos pesos moleculares, em cada corrida foi utilizado o padrão de 100pb de DNA *Ladder* (Ludwig Biotecnologia Ltda, Alvorada – RS, Brasil). Para fins de controle de qualidade, foram utilizadas as seguintes amostras-controle: *E. faecalis* AC-72 para os genes *asa1* e *cylA*; *E. gallinarum* AC-19 para o gene *hyl* e *E. faecalis* Fa- 52 para os genes *esp* e *gelE*.

### **3.6. Avaliação da diversidade genética das amostras através da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE)**

A análise do DNA cromossômico das amostras bacterianas deste estudo foi realizada para avaliar a diversidade genética e a relação clonal entre as mesmas. A metodologia empregada para este fim foi baseada nas descrições de Mondino *et al.* (2003) e Teixeira *et al.* (1997), com pequenas modificações, em que o DNA cromossômico bacteriano foi preparado pela técnica da lise *in situ*, valendo-se da

enzima de restrição *Sma*I e separado através de eletroforese em campo pulsado (PFGE).

Para o preparo do DNA, inicialmente as amostras bacterianas foram ativadas em meio ágar triptona de soja (TSA, Becton, Dickson and Company) e incubadas por 18 - 24h a uma temperatura de  $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ . A partir do crescimento bacteriano obtido, a amostra foi repicada para uma nova placa sob as mesmas condições de cultura. Uma suspensão bacteriana em 500  $\mu\text{l}$  de tampão PIV (NaCl 1M, Tris-HCl 10mM) de pH 7,6, ajustada ao padrão de turbidez 5 na escala de McFarland, foi preparada a partir do crescimento mais recente. Um volume de 500  $\mu\text{l}$  de agarose de baixa temperatura de fusão (NuSieve GTG Agarose; FMC Bioproducts, Rockland, ME, EUA) a 2% (p/v) foi adicionado à esta suspensão bacteriana e, posteriormente, este conteúdo foi distribuído em moldes para dar origem aos blocos.

Os blocos de agarose contendo as células bacterianas, já solidificados, foram submetidos ao tratamento com uma solução de lise [Tris-HCl 6 mM (pH 7,6), NaCl 1 M, EDTA 100 mM (pH 7,5), 8,5% (p/v) de Brij 58, 0,5% (p/v) de lauril sarcosinato de sódio, 0,2% (p/v) de desoxicolato de sódio, 1 mg/mL de lisozima (Sigma Co.) e 5 U/mL de mutanolisina (Sigma Co.)] e incubados por 18 - 24h a uma temperatura de  $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , sob agitação constante. Após esse período de incubação, a solução foi substituída pela solução ES [EDTA 0,5M (pH 8,0), lauril sarcosinato de sódio a 1% (p/v)] acrescida de proteinase K (Sigma Co.) a 0,1mg/mL e, em seguida, os blocos em tratamento foram incubados em banho-maria a  $50^{\circ}\text{C}$  por 8h. A incubação em solução ES e proteinase K foi repetida sob as mesmas condições.

Subsequentemente, para eliminar os restos celulares oriundos da degradação, de modo a preservar apenas o DNA cromossômico das amostras, os blocos de agarose foram lavados sucessivamente com 2mL de solução TE [Tris-HCl 10mM (pH 7,6), EDTA 0,1mM] por oito vezes, respeitando-se um período de uma hora de incubação a  $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$  sob agitação para cada lavagem.

Um bloco de cada amostra bacteriana foi selecionado e incubado por 2h em 20 $\mu\text{l}$  de solução tampão 10X *CutSmart Buffer* (New England's BioLabs Inc.) (água deionizada qsp. 200 $\mu\text{l}$ ) a  $25^{\circ}\text{C}$ , a fim de se obter as condições de equilíbrio eletrostático ideais para a atividade da enzima *Sma*I. Em seguida, essa solução foi substituída por 20 $\mu\text{l}$  do mesmo tampão, adicionando-se 12 U da enzima de restrição

*SmaI* (New England's BioLabs Inc.) seguido por um período de incubação de 18-20h na temperatura de 25°C, em banho maria.

A solução com enzima *SmaI* foi removida e cada bloco foi fundido a uma temperatura de 70°C (Multi Blok Heater, Lab Line, Illinois, EUA), formando uma solução em fase líquida, onde uma alíquota de 35 µl de cada amostra foi aplicada no gel de corrida eletroforética, este tendo sido preparado com agarose (Invitrogen®) 1,2% (p/v) em tampão TBE 0,5X de pH 8,3. A fim de facilitar a estimativa do tamanho dos fragmentos de DNA, também foi adicionada à corrida marcadores de massa molecular conhecida (Lambda Ladder PFG Marker, 50-1000 Kb; NewEngland's BioLabs Inc.).

Os fragmentos de DNA foram separados através da técnica de eletroforese em campo pulsado, utilizando-se o equipamento CHEF DR III (Bio-Rad), sob os seguintes parâmetros: pulso inicial de 5,0 s, pulso final de 35 s; voltagem de 6V/cm<sup>3</sup>; ângulo de 120°; temperatura de 12°C e tempo de corrida de 22h. Os parâmetros da corrida para amostras da espécie *Enterococcus gallinarum* foram os seguintes: pulso inicial de 2,0 s e final de 15,0 s; voltagem de 6 V/cm; temperatura de 14°C e tempo de corrida de 21h e, para a estimativa do tamanho dos fragmentos, foram utilizados os marcadores de massa molecular conhecidos (Pulse Marker, 0,1 – 200 Kb; Sigma Co.).

Após a corrida, para a visualização dos fragmentos, os géis foram corados com 0,5µg/mL de brometo de etídio por 20 min, descorados por 1h em água deionizada e em seguida, visualizados e fotografados com auxílio do sistema *MiniBis Pro* (DNR Bio-Imaging Systems Ltd).

A partir da comparação entre os perfis eletroforéticos exibidos pelas amostras (denominados aleatoriamente em algarismos romanos em ordem crescente), estas foram analisadas através do *software Bionumerics 7.6* (Applied-Maths, Bélgica) e organizadas em dendrogramas de acordo com os seus respectivos graus de similaridade, determinados de acordo com o coeficiente de Dice, este baseado no posicionamento das bandas de DNA no gel. A correlação para agrupamento das amostras foi calculada por UPGMA (do inglês *Unweighted pair group method with abithmetic mean*), empregando-se tolerância e otimização de 2,0% para *E. faecalis*, de 1,2% para *E. faecium* e de 1% para *E. avium*.

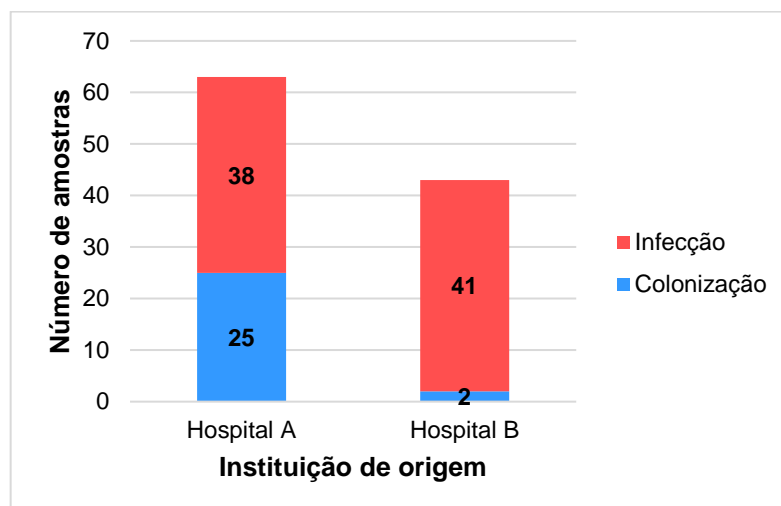
As amostras foram consideradas amostras bacterianas pertencentes a um mesmo grupo clonal, sendo esses nomeados por ordem alfabética, quando apresentaram grau de similaridade superior a 80% (CARRIÇO *et al.*, 2005), e foram consideradas clones quando apresentaram 100% de similaridade, pertencendo a um mesmo pulsotipo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Amostragem

Compuseram este estudo 106 amostras bacterianas que foram obtidas de duas unidades hospitalares do município de Cachoeiro de Itapemirim-ES, sendo 63 (59,4%) dessas amostras oriundas do hospital A e 43 (40,6%) do hospital B.

Dentre as 106 amostras, 79 (74,5%) foram coletadas de espécimes clínicos indicativos de infecção, sendo 38 provenientes do hospital A e 41 do hospital B. Vinte e sete (25,5%) amostras foram indicativas de colonização, dentre essas, 25 foram isoladas de pacientes do hospital A e apenas duas do hospital B.



**Figura 1.** Distribuição das amostras de *Enterococcus* de acordo com a fonte de isolamento (infecção e colonização) e a instituição de origem

De todas as amostras, foram predominantes as obtidas por urocultura, representando 40 (37,7%) das mesmas. Amostras oriundas de outras fontes de isolamento características de infecção também integraram este estudo, porém, em menor proporção em relação ao número total de amostras. Foram elas: 20 (18,9%) amostras de sangue; 12 (11,3%) amostras de secreções diversas; seis (5,7%) amostras de fragmento tecidual; além dessas, uma única amostra foi isolada de ponta de cateter intravascular. Na **Tabela 1** pode-se observar a distribuição das amostras considerando as fontes de isolamento de acordo com a instituição de origem.

**Tabela 1.** Distribuição das amostras de enterococos de acordo com os espécimes clínicos sugestivos de infecção e a instituição de origem

<b>Espécime clínico</b>	<b>Hospital A</b>	<b>Hospital B</b>
<b>Urina</b>	20 (52,6%)	20 (48,8%)
<b>Sangue</b>	9 (23,7%)	11 (26,8%)
<b>Secreção</b>	5 (13,2%)	7 (17,1%)
<b>Fragmento tecidual</b>	4 (10,5%)	2 (4,9%)
<b>Ponta de cateter</b>	0 (0,0%)	1 (2,4%)
<b>Total</b>	38 (100,0%)	41 (100,0%)

Em relação aos setores hospitalares de origem das amostras, 44 (69,8%) destas foram isoladas de unidades de monitoramento intensivo no hospital A. Nesse mesmo hospital, 11 (17,5%) das amostras foram obtidas de enfermaria e uma parcela de oito amostras (12,7%) tem origem setorial desconhecida.

No que tange à origem setorial das amostras do hospital B, 17 (39,5%) foram obtidas de unidades de monitoramento intensivo, enquanto 20 (46,5%) foram isoladas de pacientes de enfermaria e seis (14,0%) possuem origem desconhecida.

A utilização da técnica de MALDI-TOF MS permitiu a identificação de quatro espécies do gênero *Enterococcus* entre as amostras, sendo *E. faecalis* a espécie predominante, representando 77 (72,6%) de todas as amostras bacterianas que compõem este estudo. A segunda espécie mais frequente do estudo, de um modo geral, foi o *E. faecium* com 24 (22,6%) amostras. Em quantidade inferior, foram isoladas três amostras (2,8%) de *E. avium* e duas (1,9%) de *E. gallinarum*. Na **Tabela 2** pode-se observar a distribuição das amostras por unidade hospitalar de origem.

**Tabela 2.** Distribuição das amostras de acordo com a espécie e a instituição de origem

<b>Espécies</b>	<b>Hospital A</b>	<b>Hospital B</b>	<b>Total de amostras por espécie</b>
<b><i>E. faecalis</i></b>	41 (65,1%)	36 (83,7%)	77 (72,6%)
<b><i>E. faecium</i></b>	18 (28,6%)	6 (14,0%)	24 (22,6%)
<b><i>E. avium</i></b>	2 (3,2%)	1 (2,3%)	3 (2,8%)
<b><i>E. gallinarum</i></b>	2 (3,2%)	0 (0,0%)	2 (1,9%)
<b>N Total</b>	63 (100%)	43 (100%)	106 (100%)



A análise da distribuição das espécies de acordo com os sítios de isolamento dos pacientes mostra que a maior parte das amostras de *E. faecalis* (36,4%) e de *E. faecium* (50,0%) foram obtidas de urina. É possível observar que dentre as três amostras de *E. avium* coletadas, duas foram isoladas de fragmentos teciduais. Destaca-se também a diversidade de espécies que foram associadas à colonização do TGI, de onde foram isolados microrganismos das quatro espécies detectadas nesse estudo. Na **Tabela 3** pode ser conferida a distribuição das diferentes espécies entre os sítios anatômicos de onde foram isoladas.

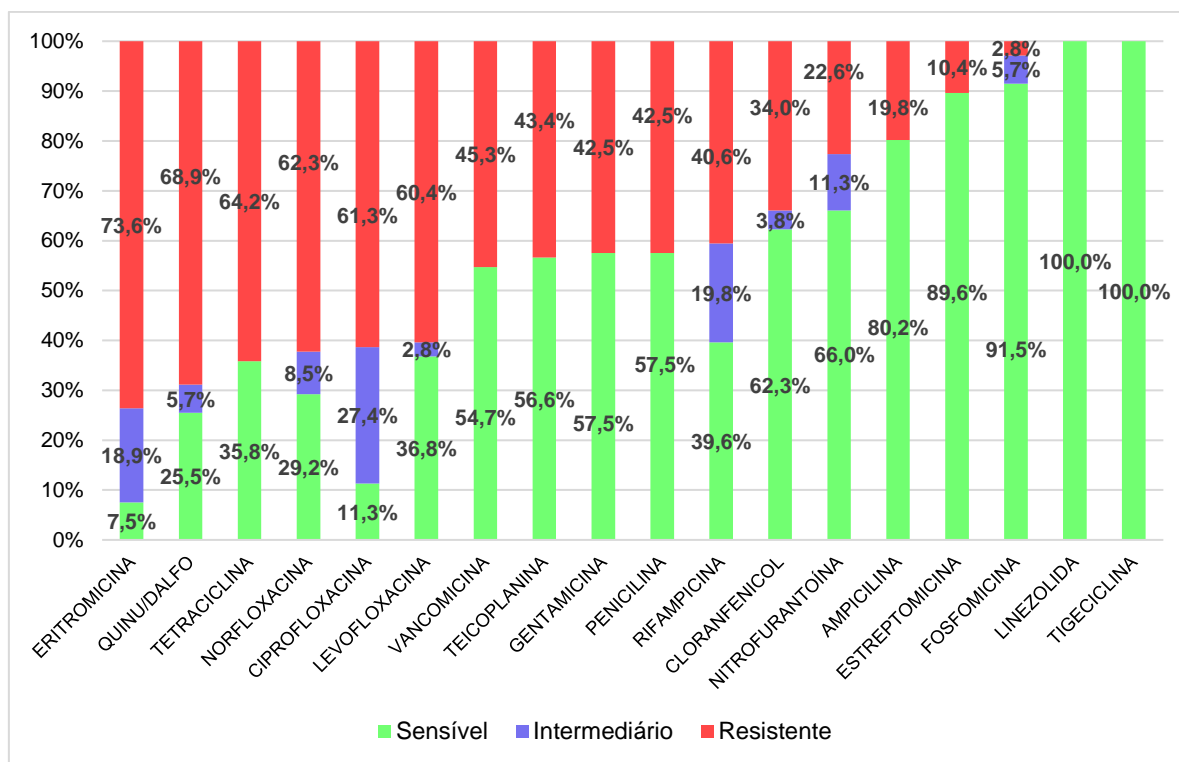
**Tabela 3.** Distribuição das espécies de acordo com a fonte de isolamento do paciente

Espécies	Urina (n=40)	Sangue (n=20)	Secreção (n=12)	Fragmento tecidual (n=6)	Ponta de cateter (n=1)	Swab retal (n=27)	Total (n=106)
<i>E. faecalis</i>	28 (36,4%)	18 (23,4%)	11 (14,3%)	4 (5,2%)	0 (0,0%)	16 (20,8)	77 (100,0%)
<i>E. faecium</i>	12 (50,0%)	2 (8,3%)	1 (4,2%)	0 (0,0%)	1 (4,2%)	8 (33,3%)	24 (100,0%)
<i>E. avium</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (66,7%)	0 (0,0%)	1 (33,3%)	3 (100,0%)
<i>E. gallinarum</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (100%)	2 (100,0%)

Em relação à distribuição das espécies de acordo o setor hospitalar de origem, pode ser observado que a maioria das amostras de *E. faecalis* [39 (50,6%)] foram isolados de pacientes internados em unidades de monitoramento intensivo, ao passo que 24 (31,2%) amostras dessa espécie foram oriundas de enfermaria. No entanto, é preciso notar que 14 (18,2%) dessas possuem origem setorial desconhecida. Entre as amostras de *E. faecium*, 19 (79,2%) foram isoladas de pacientes em monitoramento intensivo e cinco (20,8%) de enfermaria. Já entre as amostras de *E. avium*, duas foram obtidas de enfermaria e uma de monitoramento intensivo, enquanto as duas amostras de *E. gallinarum* foram oriundas de pacientes em monitoramento intensivo.

#### 4.2. Susceptibilidade aos antimicrobianos

Os resultados dos testes de susceptibilidade aos 18 antimicrobianos, realizados com as 106 amostras do estudo, considerando os critérios de interpretação do CLSI (2018), são sumarizados na **Figura 2**, onde podem ser observados de forma decrescente os maiores percentuais de resistência aos fármacos.



**Figura 2.** Distribuição dos resultados de susceptibilidade das amostras do estudo aos antimicrobianos testados

Constatou-se que as maiores frequências de resistência foram obtidas frente aos antimicrobianos: eritromicina (73,6%), quinupristina/dalfopristina (68,9%), tetraciclina (64,2%), norfloxacina (62,2%), ciprofloxacina (61,3%) e levofloxacina (60,4%). Os glicopeptídeos, vancomicina e teicoplanina, também alcançaram percentuais de resistência altos, exibindo 45,3% e 43,4% de amostras resistentes, respectivamente, a tais fármacos. Por outro lado, as drogas linezolid e tigeciclina inibiram o crescimento de todas as amostras, independentemente da espécie, setor hospitalar de origem ou sítio de isolamento, mostrando-se as mais eficazes, seguidas das drogas: fosfomicina (2,8%) e estreptomicina em elevados níveis (10,4%), com os menores índices de resistência.

Dentre as 106 amostras, houve a presença de amostras classificadas como intermediárias aos seguintes fármacos: ciprofloxacina (27,4%), rifampicina (19,8%), eritromicina (18,9%), nitrofurantoína (11,3%), norfloxacina (8,5%), fosfomicina e quinupristina/dalfopristina (5,7%), cloranfenicol (3,8%) e levofloxacina (2,8%).

A análise comparativa do percentual de resistência entre as espécies (**Tabela 4**) revelou que as amostras de *E. faecalis* apresentaram frequências superiores aos de *E. faecium*, no que tange aos seguintes antimicrobianos: quinupristina/dalfopristina

(88,3% em *E. faecalis* versus 12,5% em *E. faecium*), tetraciclina (83,1% em *E. faecalis* versus 0,0% em *E. faecium*), gentamicina em elevados níveis (57,1% em *E. faecalis* versus 4,2% em *E. faecium*) e cloranfenicol (45,5% em *E. faecalis* versus 4,2% em *E. faecium*).

A maioria das amostras de *E. faecalis* também apresentou alta frequência de resistência a eritromicina (70,1%), norfloxacina (59,7%), ciprofloxacina (58,4%) e levofloxacina (57,1%), similares aos observados entre as amostras de *E. faecium*, como pode ser observado na **Tabela 4**.

Em relação às amostras de *E. faecium*, foi observada alta frequência de resistência à ampicilina (87,5%), nitrofurantoína (83,3%), penicilina (95,8%), rifampicina (83,3%), vancomicina (70,8%) e teicoplanina (66,7%), superior aos percentuais verificados entre as amostras de *E. faecalis*. Das 17 (70,8%) amostras de *E. faecium* resistentes à vancomicina, 16 (66,7%) foram também resistentes à teicoplanina. No entanto, uma única amostra se apresentou sensível à esta droga, após determinação da CIM. Das 21 amostras de *E. faecium* resistentes à ampicilina (87,5%), todas apresentaram também resistência à penicilina.

As amostras de *E. avium* mostraram susceptibilidade à grande maioria dos antimicrobianos testados, exceto às seguintes drogas: eritromicina (uma amostra), quinupristina/dalfopristina (uma amostra), tetraciclina (duas amostras) e vancomicina (uma amostra). Para a única amostra de *E. avium* resistente à vancomicina, segundo a técnica de disco-difusão, foi feito o teste de difusão em gradiente contínuo com fitas *E-test*®, a fim de confirmar esse resultado, bem como a susceptibilidade à teicoplanina, também determinada pelo teste de disco-difusão. Os dados de CIM obtidos para teicoplanina (8 µg/mL) confirmaram a sua classificação como sensível a esta droga e de vancomicina ( $\geq 256$  µg/mL) como resistente. Já no que diz respeito aos isolados de *E. gallinarum*, as amostras exibiram resistência à uma variedade de antimicrobianos, destacando-se a resistência de ambas aos glicopeptídeos, à eritromicina e à tetraciclina.

**Tabela 4.** Distribuição dos percentuais de resistência das amostras aos antimicrobianos de acordo com a espécie

Antimicrobianos	Percentual de resistência			
	<i>E. faecalis</i> (n=77)	<i>E. faecium</i> (n=24)	<i>E. avium</i> (n=3)	<i>E. gallinarum</i> (n=2)
Ampicilina	0 (0,0%)	21 (87,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Ciprofloxacina	45 (58,4%)	19 (79,2%)	0 (0,0%)	1 (50,0%)
Cloranfenicol	35 (45,5%)	1 (4,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Eritromicina	54 (70,1%)	21 (87,5%)	1 (33,3%)	2 (100%)
Estreptomicina EN <sup>a</sup>	10 (13,0%)	1 (4,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Fosfomicina	0 (0,0%)	2 (8,3%)	0 (0,0%)	1 (50,0%)
Gentamicina EN <sup>a</sup>	44 (57,1%)	1 (4,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Levofloxacina	44 (57,1%)	19 (79,2%)	0 (0,0%)	1 (50,0%)
Linezolida	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (50,0%)
Nitrofurantoína	3 (3,9%)	20 (83,3%)	0 (0,0%)	1 (50,0%)
Norfloxacina	46 (59,7%)	19 (79,2%)	0 (0,0%)	1 (50,0%)
Penicilina	21 (27,3%)	23 (95,8%)	0 (0,0%)	1 (50,0%)
Quinupristina/dalfopristina	68 (88,3%)	3 (12,5%)	1 (33,3%)	1 (50,0%)
Rifampicina	22 (28,6%)	20 (83,3%)	0 (0,0%)	1 (50,0%)
Teicoplanina	28 (36,4%)	16 (66,7%)	0 (0,0%)	2 (100,0%)
Tetraciclina	64 (83,1%)	0 (0,0%)	2 (66,7%)	2 (100,0%)
Tigeciclina	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Vancomicina	28 (36,4%)	17 (70,8%)	1 (33,3%)	2 (100,0%)

EN<sup>a</sup>, elevados níveis

Dos 106 exemplares do gênero *Enterococcus* que compõem a amostragem deste estudo, 83 (78,3%) apresentaram multirresistência aos antimicrobianos. Entre as 24 amostras de *E. faecium*, 23 foram classificadas como multirresistentes, distribuindo-se em 19 perfis de não-susceptibilidade diferentes, que podem ser observados na **Tabela 5**. Em relação às amostras de *E. faecalis*, 57 (74,0%) exibiram multirresistência às drogas testadas, dividindo-se em 30 perfis de não-susceptibilidade, sendo um desses característico de 14 (18,2%) das amostras dessa espécie. Já entre as três amostras de *E. avium*, apenas uma se mostrou como MDR, enquanto ambas as amostras de *E. gallinarum* apresentaram esse atributo.

**Tabela 5.** Distribuição dos antibiótipos das 83 amostras classificadas como multirresistentes de acordo com as espécies de *Enterococcus* do estudo

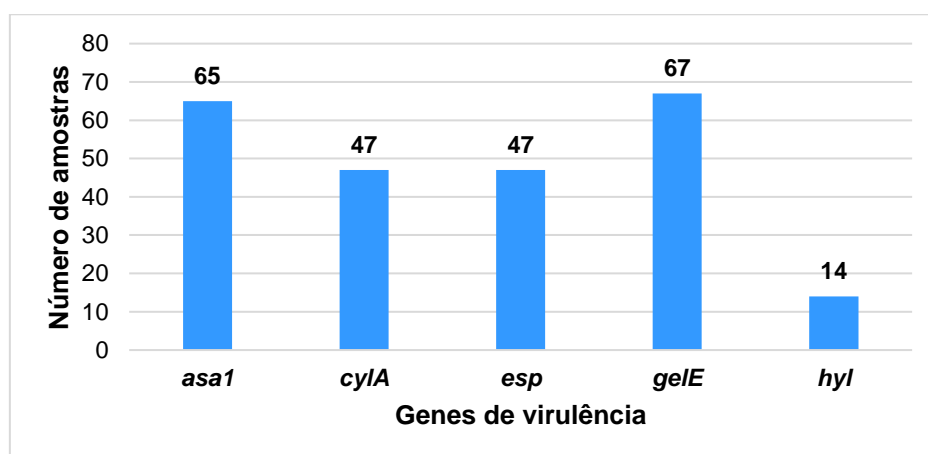
Antibiótipos	n	Espécie	
AMP <sup>R</sup> , CIP <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NIT <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TEI <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	5	<i>E. faecium</i>	
AMP <sup>R</sup> , CIP <sup>I</sup> , ERI <sup>R</sup> , NIT <sup>R</sup> , NOR <sup>I</sup> , PEN <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>I</sup> , ERI <sup>I</sup> , NIT <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup>	1		
AMP <sup>R</sup> , CIP <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , EST <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NIT <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TEI <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	1		
AMP <sup>R</sup> , CIP <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , FOS <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NIT <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TEI <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>I</sup> , ERI <sup>I</sup> , NIT <sup>R</sup> , NOR <sup>I</sup> , PEN <sup>R</sup> , QD <sup>I</sup> , RIF <sup>R</sup>	1		
AMP <sup>R</sup> , CIP <sup>R</sup> , CLO <sup>I</sup> , ERI <sup>R</sup> , FOS <sup>I</sup> , LEV <sup>R</sup> , NIT <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TEI <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	1		
AMP <sup>R</sup> , CIP <sup>R</sup> , CLO <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , FOS <sup>R</sup> , GEN <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NIT <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TEI <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	1		
AMP <sup>R</sup> , CIP <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , FOS <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NIT <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TEI <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	1		
AMP <sup>R</sup> , CIP <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NIT <sup>I</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , RIF <sup>I</sup> , TEI <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	1		
AMP <sup>R</sup> , CIP <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , FOS <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NIT <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup>	1		
AMP <sup>R</sup> , CIP <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , FOS <sup>I</sup> , LEV <sup>R</sup> , NIT <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TEI <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	1		
AMP <sup>R</sup> , CIP <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NIT <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , RIF <sup>I</sup> , TEI <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	1		
AMP <sup>R</sup> , CIP <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NIT <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , TEI <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	1		
AMP <sup>R</sup> , CIP <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , FOS <sup>I</sup> , LEV <sup>R</sup> , NIT <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup>	1		
AMP <sup>R</sup> , CIP <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TEI <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	1		
AMP <sup>R</sup> , CIP <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NIT <sup>I</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	1		
AMP <sup>R</sup> , CIP <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NIT <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>R</sup> , CLO <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , GEN <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NIT <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TEI <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	1		<i>E. faecalis</i>
CIP <sup>I</sup> , ERI <sup>I</sup> , LEV <sup>I</sup> , NIT <sup>R</sup> , NOR <sup>I</sup> , RIF <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup>	1		
CLO <sup>I</sup> , ERI <sup>R</sup> , GEN <sup>R</sup> , NIT <sup>I</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>R</sup> , CLO <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , GEN <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , TEI <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	14		
CIP <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , GEN <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>I</sup> , TET <sup>R</sup>	6		
CIP <sup>R</sup> , CLO <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , GEN <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NIT <sup>I</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>R</sup> , CLO <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , GEN <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TEI <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>I</sup> , CLO <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , EST <sup>R</sup> , NIT <sup>I</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>I</sup> , CLO <sup>I</sup> , ERI <sup>I</sup> , NIT <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , GEN <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>I</sup> , CLO <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , EST <sup>R</sup> , NIT <sup>R</sup> , NOR <sup>I</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>I</sup> , TET <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>R</sup> , CLO <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , GEN <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>I</sup> , TEI <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	2		
CIP <sup>R</sup> , CLO <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , GEN <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>I</sup> , TEI <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	2		
CIP <sup>R</sup> , CLO <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , GEN <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , TEI <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	5		
CIP <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , TEI <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>I</sup> , CLO <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , EST <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup>	3		
CIP <sup>I</sup> , ERI <sup>R</sup> , GEN <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>I</sup> , ERI <sup>R</sup> , EST <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>I</sup> , ERI <sup>R</sup> , EST <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup>	1		
ERI <sup>R</sup> , EST <sup>R</sup> , GEN <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>I</sup> , ERI <sup>R</sup> , EST <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>R</sup> , CLO <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , EST <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup>	1		
ERI <sup>R</sup> , GEN <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>R</sup> , CLO <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , FOS <sup>I</sup> , GEN <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , TEI <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>R</sup> , CLO <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , GEN <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>I</sup> , TET <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , GEN <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup>	2		
CIP <sup>R</sup> , CLO <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , GEN <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>R</sup> , ERI <sup>I</sup> , GEN <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup>	1		
CIP <sup>I</sup> , ERI <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	1	<i>E. avium</i>	
ERI <sup>R</sup> , QD <sup>R</sup> , TEI <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	1	<i>E. gallinarum</i>	
CIP <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , FOS <sup>R</sup> , LEV <sup>R</sup> , NIT <sup>R</sup> , NOR <sup>R</sup> , PEN <sup>R</sup> , RIF <sup>R</sup> , TEI <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup> , VAN <sup>R</sup>	1		

R: resistente; I: intermediária; AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina; CLO: cloranfenicol; ERI: eritromicina; EST: estreptomicina; FOS: fosfomicina; GEN: gentamicina; LEV: levofloxacina; NIT: nitrofurantoina; NOR: norfloxacina; PEN: penicilina; QD: quinupristina/dalfopristina; RIF: rifampicina; TEI: teicoplanina; TET: tetraciclina e VAN: vancomicina.

### 4.3. Caracterização dos genótipos associados à virulência em *Enterococcus*

As 106 amostras do estudo foram elencadas para pesquisa genotípica dos principais fatores de virulência de enterococos, através da técnica de PCR-*Multiplex*, sendo eles: citolisina (*cylA*), gelatinase (*gelE*), substância agregativa (*asa1*), proteína de superfície de enterococos (*esp*) e glicosil-hidrolase (*hyl*).

Com o resultado, foi observado que o determinante genético de virulência mais frequente entre as amostras foi *gelE*, encontrado em 67 (63,2%) das 106 amostras, seguido por *asa1*, presente em 65 (61,3%), *cylA* e *esp* em 47 (44,3%) e, em menor frequência, o gene *hyl*, detectado em apenas 14 (11,3%) amostras, conforme observado na **Figura 3**.



**Figura 3.** Distribuição dos determinantes genéticos de virulência entre as amostras do estudo

Em relação à distribuição dos principais genes de virulência entre as espécies, e de acordo com a instituição de origem das amostras (**Tabela 6**), foi observado que os determinantes genéticos *asa*, *cylA* e *gelE* só se apresentaram em amostras de *E. faecalis*. O gene *esp* esteve presente em diferentes espécies, sendo 26 amostras de *E. faecalis*, 20 amostras de *E. faecium* e em uma amostra de *E. avium*. Enquanto o gene *hyl*, por outro lado, foi verificado exclusivamente entre 14 amostras de *E. faecium*. Entre as amostras de *E. gallinarum*, nenhum dos determinantes genéticos de virulência pesquisados foi detectado.

**Tabela 6.** Distribuição dos determinantes genéticos de virulência de acordo a espécie e instituição de origem da amostra

Determinantes genéticos de virulência	Hospital A (n=63)				Hospital B (n=43)			Total
	<i>E. faecalis</i> (n=41)	<i>E. faecium</i> (n=18)	<i>E. avium</i> (n=2)	<i>E. gallinarum</i> (n=2)	<i>E. faecalis</i> (n=36)	<i>E. faecium</i> (n=6)	<i>E. avium</i> (n=1)	
<i>asa1</i>	35 (53,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	30 (46,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	65 (100%)
<i>cylA</i>	28 (59,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	19 (40,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	47 (100%)
<i>esp</i>	12 (25,5%)	16 (34,0%)	1 (2,1%)	0 (0,0%)	14 (29,8%)	4 (8,5%)	0 (0,0%)	47 (100%)
<i>gelE</i>	36 (53,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	31 (46,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	67 (100%)
<i>hyl</i>	0 (0,0%)	12 (85,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (14,3%)	0 (0,0%)	14 (100%)

Quanto ao setor hospitalar de origem das amostras, observou-se que a maioria das amostras portadoras dos genes associados à virulência foram isoladas de pacientes internados em unidades de monitoramento intensivo (**Tabela 7**).

**Tabela 7.** Distribuição dos determinantes genéticos de virulência de acordo com o setor hospitalar de origem da amostra

Determinantes genéticos de virulência	Setor hospitalar			Total (n=106)
	Enfermaria (n=31)	Monitoramento intensivo (n=61)	Não-disponibilizado (n=14)	
<i>asa1</i>	17 (26,2%)	35 (53,8%)	13 (20,0%)	65 (100,0%)
<i>cylA</i>	10 (21,3%)	29 (61,7%)	8 (17,0%)	47 (100,0%)
<i>esp</i>	14 (29,8%)	29 (61,7%)	4 (8,5%)	47 (100,0%)
<i>gelE</i>	22 (32,8%)	33 (49,3%)	12 (17,9%)	67 (100,0%)
<i>hyl</i>	1 (7,1%)	13 (92,9%)	0 (0,0%)	14 (100,0%)

Em relação à fonte de isolamento das amostras carreadoras dos genes de virulência (**Tabela 8**), foi observado que a maioria desses determinantes estiveram presentes em sítios sugestivos de infecção, com a exceção do gene *hyl*, que foi detectado em quantidade similar entre amostras associadas à colonização e a processos infecciosos. É possível notar a maior frequência dos genes *asa1*, *esp* e *gelE* em amostras de urina e, também, a presença do gene *cylA* entre as amostras oriundas de sangue.

**Tabela 8.** Distribuição dos determinantes genéticos de virulência de acordo com a fonte de isolamento de origem da amostra

Determinantes genéticos de virulência	Colonização		Infecção			Total
	Swab retal (n=27)	Urina (n=40)	Sangue (n=20)	Secreção (n=12)	Fragmento tecidual (n=6)	
<i>asa1</i>	15 (23,1%)	21 (32,3%)	16 (24,6%)	9 (13,8%)	4 (6,2%)	65 (100,0%)
<i>cylA</i>	15 (31,9%)	9 (19,1%)	13 (27,7%)	7 (14,9%)	3 (6,4%)	47 (100,0%)
<i>esp</i>	10 (21,3%)	22 (46,8%)	7 (14,9%)	6 (12,8%)	2 (4,3%)	47 (100,0%)
<i>gelE</i>	15 (22,4%)	26 (38,8%)	14 (20,9%)	8 (11,9%)	4 (6,0%)	67 (100,0%)
<i>hyl</i>	7 (50,0%)	5 (35,7%)	2 (14,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	14 (100,0%)

De acordo com a análise das variações de distribuição dos principais genes de virulência entre amostras resistentes à vancomicina (VRE) e amostras susceptíveis à vancomicina (VSE), foi observada maior frequência dos genes *asa1* (43,1% em VRE versus 56,9% em VSE), *esp* (38,3% em VRE versus 61,7% em VSE) e *gelE* (38,8% em VRE versus 61,2% em VSE) entre os VSEs, sendo o oposto observado para os genes *cylA* (59,6% em VRE versus 40,4% em VSE) e *hyl* (85,7% em VRE versus 14,3% em VSE), mais frequentes entre VRE.

A análise da distribuição dos determinantes genéticos de virulência entre amostras MDR e não-MDR revelou que todos os genes de virulência pesquisados apresentaram maior frequência entre amostras MDR, conforme observado na **Tabela 9**.

**Tabela 9.** Distribuição dos determinantes genéticos de virulência entre amostras MDR e não-MDR

Determinantes genéticos de virulência	Amostras MDR (n=83)	Amostras não-MDR (n=23)	Total
<i>asa1</i>	51 (78,5%)	14 (21,5%)	65 (100,0%)
<i>cylA</i>	43 (91,5%)	4 (8,5%)	47 (100,0%)
<i>esp</i>	36 (76,6%)	11 (23,4%)	47 (100,0%)
<i>gelE</i>	53 (79,1%)	14 (20,9%)	67 (100,0%)
<i>hyl</i>	13 (92,9%)	1 (7,1%)	14 (100,0%)

MDR: Multirresistente

As amostras também foram organizadas pela combinação dos determinantes genéticos de virulência, ou seja, por seus respectivos perfis genéticos de virulência. A análise da distribuição de tais perfis de *E. faecalis* entre as instituições de origem



permitiu a percepção de um perfil predominante entre as amostras dessa espécie, associada a ambos os hospitais, constituído pelos genes *asa1*, *cylA* e *gelE*, presente em 23 (56,1%) das amostras do hospital A e 12 (33,3%) das amostras do hospital B, totalizando 35 (45,5%) amostras do total da espécie (Outros perfis também puderam ser observados, embora menos frequentes, conforme exibido na **Tabela 10**).

**Tabela 10.** Distribuição dos perfis genéticos de virulência de *Enterococcus faecalis* de acordo com a instituição de origem da amostra

Perfis de virulência de amostras de <i>E. faecalis</i>	Hospital A	Hospital B
<i>asa1</i>	0 (0,0%)	2 (5,6%)
<i>asa1, cylA</i>	0 (0,0%)	2 (5,6%)
<i>asa1, cylA, esp, gelE</i>	4 (9,8%)	5 (13,9%)
<i>asa1, cylA, esp</i>	1 (2,4%)	0 (0,0%)
<i>asa1, cylA, gelE</i>	23 (56,1%)	12 (33,3%)
<i>asa1, esp</i>	2 (4,9%)	0 (0,0%)
<i>asa1, esp, gelE</i>	2 (4,9%)	4 (11,1%)
<i>asa1, gelE</i>	3 (7,3%)	5 (13,9%)
<i>esp</i>	2 (4,9%)	1 (2,8%)
<i>esp, gelE</i>	1 (2,4%)	4 (11,1%)
<i>gelE</i>	3 (7,3%)	1 (2,8%)
<b>Total</b>	<b>41 (100,0%)</b>	<b>36 (100,0%)</b>

Em relação aos perfis de virulência das amostras de *E. faecium*, foi observada uma menor diversidade, sendo possível a detecção do gene *esp*, em quatro amostras do hospital A e duas do hospital B, bem como a associação dos genes *esp* e *hyl*, presente em 12 amostras do hospital A e duas do hospital B. Além disso, quatro amostras, sendo duas de cada hospital, previamente identificadas como *E. faecium*, não possuíram os marcadores genotípicos de virulência pesquisados.

No que diz respeito à fonte de isolamento, o perfil *asa1, cylA, gelE*, pertencente exclusivamente a amostras de *E. faecalis*, foi o mais frequente tanto entre amostras de colonização, presente em 15 (93,8%) dessas, quanto em amostras coletadas de sítios de infecção, detectado em 20 (32,8%) dessas, conforme observado na **Tabela 11**.

**Tabela 11.** Distribuição dos perfis genéticos de virulência de *Enterococcus faecalis* de acordo com a fonte de isolamento de origem da amostra

Perfis de virulência de amostras de <i>E. faecalis</i>	Colonização		Infecção		
	Swab retal (n=16)	Urina (n=28)	Sangue (n=18)	Secreção (n=11)	Fragmento tecidual (n=4)
<i>asa1</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (5,6%)	1 (9,1%)	0 (0,0%)
<i>asa1, cyla</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (11,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<i>asa1, cyla, esp, gelE</i>	0 (0,0%)	2 (7,1%)	3 (16,7%)	2 (18,2%)	2 (50,0%)
<i>asa1, cyla, esp</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (9,1%)	0 (0,0%)
<i>asa1, cyla, gelE</i>	15 (93,8%)	7 (25,0%)	8 (44,4%)	4 (36,4%)	1 (25,0%)
<i>asa1, esp</i>	0 (0,0%)	1 (3,6%)	1 (5,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<i>asa1, esp, gelE</i>	0 (0,0%)	5 (17,9%)	0 (0,0%)	1 (9,1%)	0 (0,0%)
<i>asa1, gelE</i>	0 (0,0%)	6 (21,4%)	1 (5,6%)	0 (0,0%)	1 (25,0%)
<i>esp</i>	1 (6,3%)	1 (3,6%)	0 (0,0%)	1 (9,1%)	0 (0,0%)
<i>esp, gelE</i>	0 (0,0%)	4 (14,3%)	1 (5,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<i>gelE</i>	0 (0,0%)	2 (7,1%)	1 (5,6%)	1 (9,1%)	0 (0,0%)

Entre as amostras de *E. faecium* associadas à colonização do trato intestinal (n=8), o perfil constituído pelos genes *esp* e *hyl* se mostrou presente em sete (87,5%), enquanto uma (12,5%) possuiu somente o gene *esp*. Entre as amostras dessa mesma espécie isoladas de sítios sugestivos de infecção (n=16), o perfil *esp* e *hyl* foi detectado em sete (43,8%) dessas, seguido pelo perfil *esp*, presente em cinco (31,2%) e quatro (25,0%) amostras não exibiram nenhum dos genes pesquisados.

Em relação à associação entre os diferentes perfis de virulência e os setores hospitalares de origem das amostras, foi observado que o perfil *asa1, cyla* e *gelE* (o mais comum entre as amostras de *E. faecalis*) e o perfil composto pelos genes *esp* e *hyl* (o mais comum entre amostras de *E. faecium*) foram os mais frequentes entre as amostras oriundas de pacientes internados em unidades de monitoramento intensivo, estando presentes em 24 (39,3%) e 13 (21,3%) das mesmas, respectivamente, como pode ser conferido na **Tabela 12**.

**Tabela 12.** Distribuição dos perfis genéticos de virulência de acordo com o setor hospitalar de origem da amostra

Perfis de virulência	Setor hospitalar		
	Enfermaria (n=31)	Monitoramento intensivo (n=61)	Não-disponibilizado (n=14)
<i>asa1</i>	1 (3,2%)	0 (0,0%)	1 (7,1%)
<i>asa1, cyaA</i>	0 (0,0%)	2 (3,3%)	0 (0,0%)
<i>asa1, cyaA, esp, gelE</i>	4 (12,9%)	3 (4,9%)	2 (14,3%)
<i>asa1, cyaA, esp</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (7,1%)
<i>asa1, cyaA, gelE</i>	6 (19,4%)	24 (39,3%)	5 (35,7%)
<i>asa1, esp</i>	0 (0,0%)	2 (3,3%)	0 (0,0%)
<i>asa1, esp, gelE</i>	3 (9,7%)	3 (4,9%)	0 (0,0%)
<i>asa1, gelE</i>	3 (9,7%)	1 (1,6%)	4 (28,6%)
<i>esp</i>	2 (6,5%)	8 (13,1%)	0 (0,0%)
<i>esp, gelE</i>	4 (12,9%)	0 (0,0%)	1 (7,1%)
<i>esp, hyl</i>	1 (3,2%)	13 (21,3%)	0 (0,0%)
<i>gelE</i>	2 (6,5%)	2 (3,3%)	0 (0,0%)
Nenhum marcador	5 (16,1%)	3 (4,9%)	0 (0,0%)

Verificou-se a disposição dos perfis genéticos de virulência entre amostras VRE e VSE, notando-se que as amostras resistentes à vancomicina apresentaram perfis mais específicos, sendo mais presentes amostras portadoras do perfil *asa1, cyaA* e *gelE* (detectado em 54,2% das amostras VRE) e do perfil *esp* e *hyl* (encontrado em 25,0% dessas amostras). Em relação às amostras susceptíveis à vancomicina, foi observada uma diversidade maior entre tais perfis (**Tabela 13**).

**Tabela 13.** Distribuição dos perfis genéticos de virulência entre amostras de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) e susceptíveis (VSE)

Perfis de virulência	VRE (n=48)	VSE (n=58)
<i>asa1</i>	0 (0,0%)	2 (3,4%)
<i>asa1, cyaA</i>	2 (4,2%)	0 (0,0%)
<i>asa1, cyaA, esp, gelE</i>	0 (0,0%)	9 (15,5%)
<i>asa1, cyaA, esp</i>	0 (0,0%)	1 (1,7%)
<i>asa1, cyaA, gelE</i>	26 (54,2%)	9 (15,5%)
<i>asa1, esp</i>	0 (0,0%)	2 (3,4%)
<i>asa1, esp, gelE</i>	0 (0,0%)	6 (10,3%)
<i>asa1, gelE</i>	0 (0,0%)	8 (13,8%)
<i>esp</i>	6 (12,5%)	4 (6,9%)
<i>esp, gelE</i>	0 (0,0%)	5 (8,6%)
<i>esp, hyl</i>	12 (25,0%)	2 (3,4%)
<i>gelE</i>	0 (0,0%)	4 (6,9%)
Nenhum marcador	2 (4,2%)	6 (10,3%)
Total	48 (100,0%)	58 (100,0%)

A análise comparada da distribuição dos perfis genéticos de virulência de amostras MDR e não-MDR mostra que os perfis mais frequentes entre as primeiras foram *asa1*, *cylA* e *gelE* [35 (42,2%)] e *esp* e *hyl* [13 (15,7%)], enquanto entre as não-MDR o perfil mais frequente foi *asa1* e *gelE* [6 (26,1%)].

**Tabela 14.** Distribuição dos perfis genéticos de virulência entre amostras MDR e não-MDR

Perfis de virulência	Amostras MDR (n=83)	Amostras não-MDR (n=23)
<i>asa1</i>	1 (1,2%)	1 (4,3%)
<i>asa1, cylA</i>	2 (2,4%)	0 (0,0%)
<i>asa1, cylA, esp, gelE</i>	6 (7,2%)	3 (13,0%)
<i>asa1, cylA, esp</i>	0 (0,0%)	1 (4,3%)
<i>asa1, cylA, gelE</i>	35 (42,2%)	0 (0,0%)
<i>asa1, esp</i>	0 (0,0%)	2 (8,7%)
<i>asa1, esp, gelE</i>	5 (6,0%)	1 (4,3%)
<i>asa1, gelE</i>	2 (2,4%)	6 (26,1%)
<i>esp</i>	8 (9,6%)	2 (8,7%)
<i>esp, gelE</i>	4 (4,8%)	1 (4,3%)
<i>esp, hyl</i>	13 (15,7%)	1 (4,3%)
<i>gelE</i>	1 (1,2%)	3 (13,0%)
Nenhum marcador	6 (7,2%)	2 (8,7%)
<b>Total</b>	<b>83 (100,0%)</b>	<b>23 (100,0%)</b>

MDR: Multirresistente

#### 4.4. Avaliação da diversidade genética das amostras através da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE)

##### 4.4.1. Diversidade genética das amostras de *E. faecalis*

A análise da diversidade genética dos exemplares de *E. faecalis* por PFGE permitiu a disposição das 75 amostras em 48 pulsotipos (FsI a FsXLVIII), organizados em 12 grupos clonais (FsA a FsL) (**Figura 4**). Duas amostras dessa espécie não foram clivadas pela atividade da enzima *SmaI*.

Os integrantes do grupo clonal FsA foram predominantes no estudo, constituindo um total de 27 amostras (35,1% das amostras de *E. faecalis*), entre essas foram incluídos os pulsotipos FsI, FsII, FsIII e FsXXXVIII. No geral, as amostras desse grupo foram VRE (com a exceção de uma única amostra de pulsotipo FsIII). Este grupo abrangeu 26 das 28 amostras de *E. faecalis* resistentes à vancomicina do estudo. A maioria das amostras de FsA foi obtida de pacientes do hospital A (20 amostras, representando 74,1% do total desse grupo) e parte do hospital B (7 amostras, representando 25,9% do total desse grupo), em relação aos sítios de isolamento, as amostras variaram entre amostras de colonização e de infecção

(sangue e urina) e a grande maioria das amostras desse grupo clonal (24 amostras, 88,9%) apresentou o perfil de virulência composto pelos genes *asa1*, *cylA* e *gelE*.

O pulsotipo Fsl foi integrado por 20 amostras, sendo o mais prevalente ao representar 74,1% das amostras do grupo clonal FsA. Todas as amostras desse pulsotipo foram VRE, 14 (70%) obtidas do hospital A e seis (30%) do hospital B; 10 (50%) amostras foram associadas à colonização, dentre essas, 9 foram isoladas de pacientes do hospital A e apenas uma do hospital B, enquanto as outras 10 (50%) foram isoladas de espécimes clínicos sugestivos de infecção (sangue e urina) de pacientes de ambos os hospitais; Dentre as 20 amostras desse pulsotipo, 18 (90,0%) apresentaram o perfil *asa1*, *cylA* e *gelE* e apenas duas exibiram o perfil composto somente pelos genes *asa1* e *cylA*. No que tange ao pulsotipo FsII, composto por quatro amostras (14,8% do grupo clonal FsA), todas foram VRE e apresentaram o perfil de virulência *asa1*, *cylA* e *gelE*, além de compartilharem da mesma origem (amostras de colonização oriundas do hospital A). Já o pulsotipo FsIII, foi constituído por duas amostras de origens e características distintas, tendo sido uma isolada de sangue de um paciente do hospital A e a outra de urina de um paciente do hospital B, a primeira mostrou resistência à vancomicina, ao passo que a última mostrou susceptibilidade a esta droga. Houve diversidade entre os perfis genéticos de virulência apresentados deste pulsotipo, em que a isolada de sangue se mostrou portadora da combinação *asa1*, *cylA* e *gelE*, enquanto a de urina exibiu o perfil *asa1*, *esp* e *gelE*. Por fim, a única amostra representante do pulsotipo FsXXXVIII foi coletada por *swab* retal de um paciente do hospital A, era VRE e apresentou os genes *asa1*, *cylA* e *gelE*.

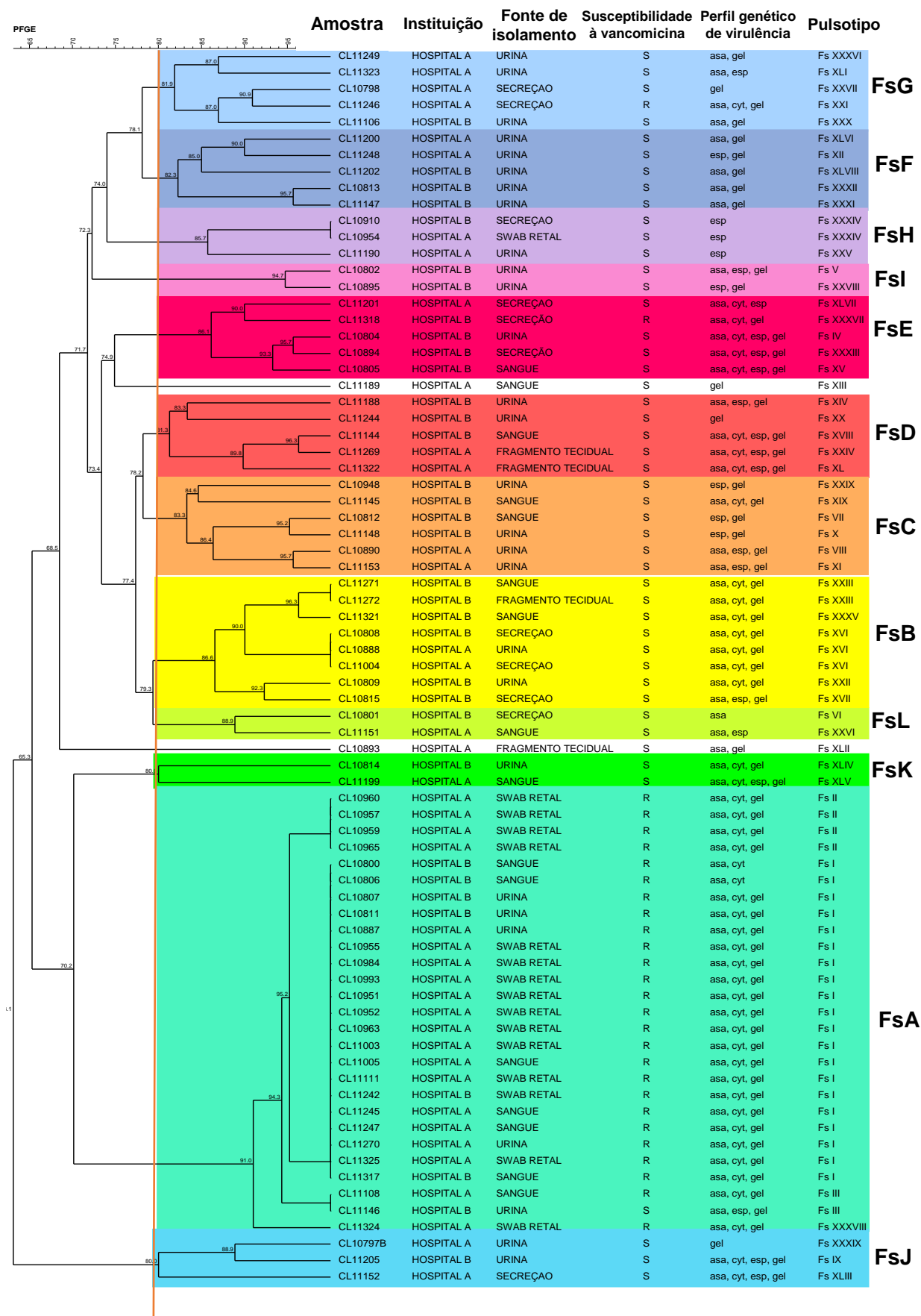
O grupo clonal FsB, por sua vez, constituído por oito amostras (10,4% das amostras de *E.faecalis*), apresentou cinco pulsotipos diferentes. Todas as amostras desse grupo foram VSEs e apresentaram o perfil de virulência composto pelos genes *asa1*, *cylA* e *gelE*, com a exceção de uma amostra, caracterizada pelo perfil *asa1*, *esp* e *gelE*. As origens dessas amostras foram diversificadas entre os dois hospitais e todas foram isoladas de espécimes clínicos sugestivos de infecção (fragmento tecidual, secreção de ferida, sangue e urina). Entre os clones desse grupo, pertencentes aos pulsotipos FsXXIII e FsXVI, a semelhança observada consistiu na susceptibilidade dessas amostras à vancomicina e na presença do mesmo perfil de virulência.

As seis amostras que conceberam o grupo clonal FsC possuem em comum a susceptibilidade à vancomicina, todas são representantes de pulsotipos distintos e foram provenientes de ambas as unidades hospitalares. Duas dessas amostras foram isoladas de sangue e quatro de urina. Em relação aos perfis genéticos de virulência observados nesse grupo, observou-se a presença de três amostras (50,0%) portadoras da combinação *esp* e *gel*, duas amostras (33,3%) com a combinação *asa1*, *esp* e *gelE* e apenas uma (16,7%) com o perfil formado pelos genes *asa1*, *cylA* e *gelE*.

Os grupos clonais FsD e FsE, cada um composto por cinco amostras de pulsotipos distintos, apresentando características semelhantes em relação aos perfis de virulência das amostras, entre as quais o conjunto formado pelos genes *asa1*, *cylA*, *esp* e *gelE* foi mais frequente, presente em três amostras de cada um dos grupos clonais. Todas essas amostras foram classificadas como susceptíveis à vancomicina, com a exceção de uma única amostra do grupo FsE, isolada de secreção, que além de ser VRE, apresentou o perfil *asa1*, *cylA* e *gelE*. As amostras que compuseram FsD e FsE foram provenientes de ambos os hospitais e de espécimes clínicos sugestivos de infecção.

Das cinco amostras que integram o grupo clonal FsF, de pulsotipos distintos, todas foram isoladas de urina, sendo duas oriundas de pacientes do hospital A e três do hospital B. Além disso, todas foram susceptíveis à vancomicina e quatro destas apresentaram a combinação dos determinantes genéticos de virulência *asa1* e *gelE*. O grupo clonal FsG, também foi constituído por cinco amostras, entre as quais quatro foram classificadas como VSEs e uma como VRE, esta última apresentando o perfil de virulência composto pelos genes *asa1*, *cylA* e *gelE*, enquanto as outras exibiram heterogeneidade nos perfis genéticos de virulência.

O grupo clonal FsH foi composto por três amostras susceptíveis à vancomicina, sendo que duas, por exibirem mesmo perfil eletroforético, foram consideradas clones, embora oriundas de hospitais diferentes. As três amostras que compuseram FsH possuíram somente o gene *esp* como determinante de virulência. Já o grupo clonal Fsl, constituído por duas amostras susceptíveis à vancomicina, apesar de não possuir uniformidade entre os perfis de virulência em suas amostras (uma possuindo a combinação *asa1*, *esp* e *gel* e a outra apenas *esp* e *gel*), ambas foram isoladas de urina e de pacientes do hospital B.



**Figura 4.** Dendrograma resultante da análise computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico das 75 amostras de *Enterococcus faecalis*. R: resistente; S: susceptível

Os grupos clonais FsJ, FsK e FsL compreenderam, em conjunto, sete amostras susceptíveis à vancomicina (sendo o FsJ composto por três amostras e os grupos clonais FsK e FsL por duas amostras cada), de pulsotipos distintos e oriundos de ambas as unidades hospitalares, além de terem sido isoladas de espécimes clínicos sugestivos de infecção (urina, sangue, secreção de ferida e fragmento tecidual). Duas amostras do grupo clonal FsJ exibiram o perfil de virulência composto pelos genes *asa1*, *cyIA*, *esp* e *gelE*, enquanto a outra amostra apresentou apenas o determinante *gelE*. No grupo FsK, uma amostra apresentou a combinação dos genes *asa1*, *cyIA*, *esp* e *gelE* e a outra a combinação *asa1*, *cyIA* e *gelE*. Já em relação ao grupo FsL, uma amostra exibiu o perfil de virulência composto pelos genes *asa1* e *esp* e a outra somente pelo gene *asa1*.

Apenas duas amostras não foram incluídas em nenhum dos grupos clonais, representadas pelos pulsotipos únicos FsXIII (isolada do sangue de um paciente do hospital A, susceptível à vancomicina e portadora do determinante genético de virulência *gelE*) e FsXLII (isolada de fragmento tecidual de uma paciente do hospital A, susceptível à vancomicina e portadora do perfil de virulência composto pelos genes *asa1* e *gelE*).

#### **4.4.2. Diversidade genética das amostras de *E. faecium***

A análise da diversidade genética das 24 amostras de *E. faecium*, permitiu a distribuição dessas em 18 pulsotipos (FmI a FmXVIII) e a definição de três grupos clonais (FmA, FmB e FmC). O grupo clonal FmA, que integra a maior parte (11 amostras, 45,8%) das amostras dessa espécie, foi caracterizado pela inclusão de seis pulsotipos, entre os quais o pulsotipo FmVII se destaca por representar um clone composto por quatro dessas amostras, seguido pelo pulsotipo FmIX, que alberga duas amostras. Das 11 amostras que constituem esse grupo clonal, 10 possuem o perfil genético de virulência que compreende os genes *esp* e *hyl*, enquanto uma possui apenas o gene *esp*. Essas amostras são majoritariamente resistentes à vancomicina, com a exceção de duas, e nove são oriundas de pacientes internados no hospital A. Em relação às fontes de isolamento das mesmas, cinco amostras foram isoladas de *swab* retal, cinco de urina e uma de sangue.

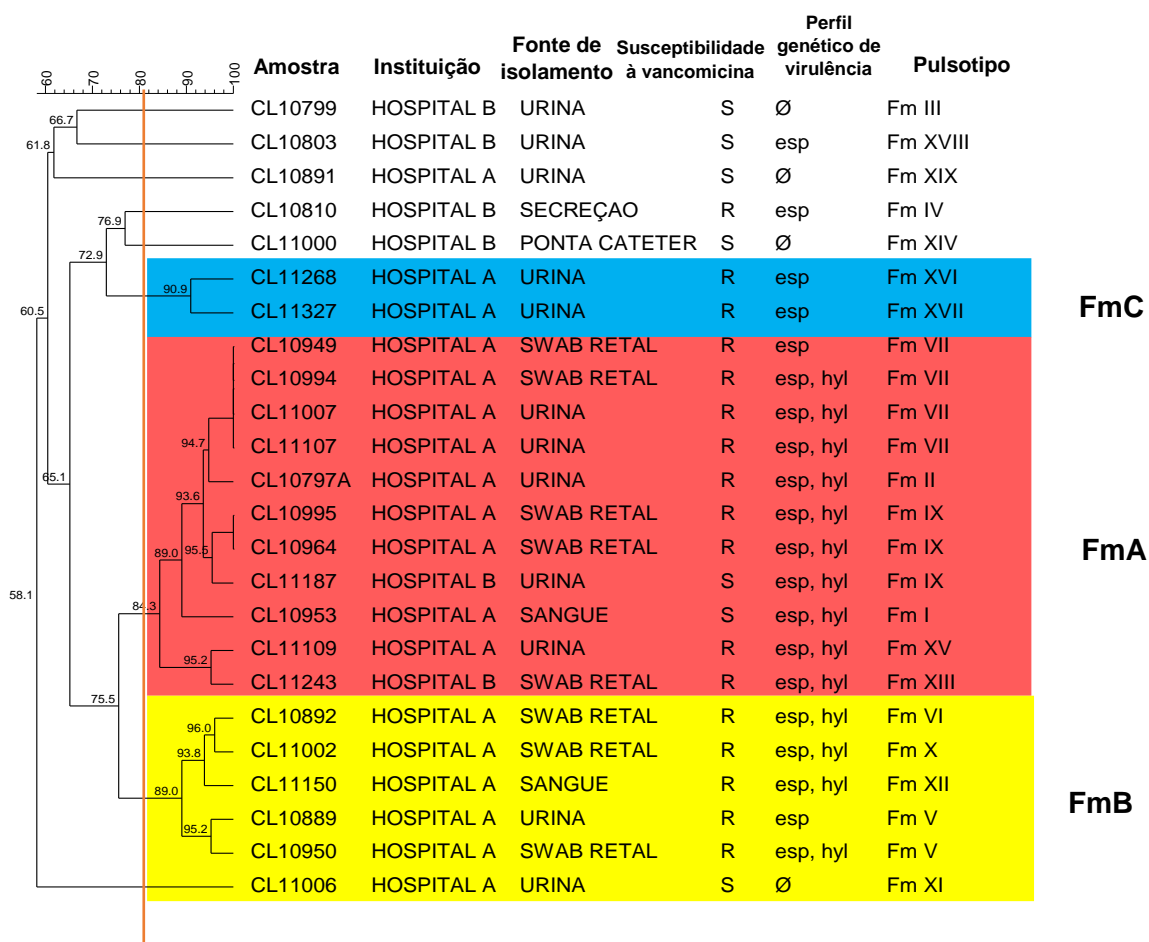
As cinco amostras que constituem o grupo clonal FmB foram classificadas como VRE, em que três foram associadas à colonização e duas à infecção (uma



oriunda de sangue e outra de urina) e todas foram coletadas de pacientes internados no hospital A. O perfil de virulência composto pelos determinantes genéticos *esp* e *hyl* foi observado em quatro das cinco amostras desse grupo. No que diz respeito ao grupo clonal FmC, as duas únicas amostras que o integram foram VRE isolados de urina de pacientes internados no hospital B, sendo ambas portadoras apenas do gene *esp*.

Um total de seis (25,0%) das amostras de *E. faecium* analisadas não foram incluídas em nenhum dos grupos clonais, entre essas, cinco foram susceptíveis à vancomicina e quatro não apresentaram os determinantes genéticos de virulência pesquisados, enquanto duas exibiram somente o gene *esp*.

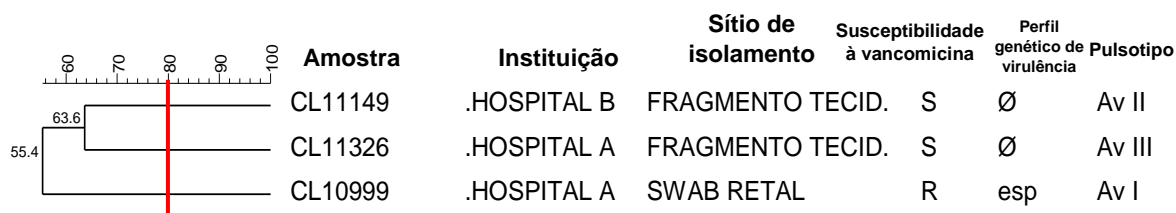
A organização das amostras em seus respectivos pulsotipos e grupos clonais, bem como as suas características associadas, pode ser conferida no dendrograma abaixo (**Figura 5**).



**Figura 5.** Dendrograma resultante da análise computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico das 24 amostras de *Enterococcus faecium*. R: resistente; S: susceptível

#### 4.4.3. Diversidade genética das amostras de *E. avium*

Em relação à análise da diversidade genética das amostras de *E. avium* pela técnica de PFGE, foi observado que as três amostras exibiram pulsotipos diferentes, não compondo nenhum grupo clonal. No entanto, os pulsotipos AvII e AvIII apresentaram maior similaridade entre si, e apesar de serem provenientes de instituições distintas, ambas as amostras são susceptíveis à vancomicina e foram isoladas de fragmento tecidual, além de não possuírem nenhum dos determinantes genéticos de virulência avaliados. Por outro lado, o pulsotipo AvI, que representa uma amostra de colonização de uma paciente internado no hospital A, além de ter exibido resistência à vancomicina, apresentou o determinante genético de virulência *esp*. (Figura 6).



**Figura 6.** Dendrograma resultante da análise computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico das três amostras de *Enterococcus avium*. R: resistente; S: susceptível

#### 4.4.4. Diversidade genética das amostras de *E. gallinarum*

As duas amostras de *E. gallinarum* exibiram o mesmo perfil eletroforético, sendo, portanto, consideradas clones. Ambas foram associadas à colonização de pacientes internados no hospital A e apresentaram resistência à vancomicina, além de não terem apresentado nenhum dos determinantes genéticos de virulência pesquisados neste estudo.

## 5. DISCUSSÃO

O gênero *Enterococcus* tem emergido como importante causador de infecções em pacientes hospitalizados nas últimas décadas, o que pode ser atribuído a diferentes fatores, como a vantagem seletiva provida pela resistência aos antimicrobianos e a expressão de fatores de virulência, ambos envolvidos na adaptação desses microrganismos ao ambiente hospitalar, bem como na sua persistência no hospedeiro (ARIAS; MURRAY, 2012; MILLER *et al.*, 2016; VAN TYNE; GILMORE, 2014).

No presente estudo, a maioria das amostras de *Enterococcus* foram coletadas de espécimes clínicos sugestivos de processos infecciosos (**Figura 1**), sendo observada maior frequência das amostras isoladas de urina em ambos os hospitais (**Tabela 1**), representadas por 28 (36,4%) das amostras de *E. faecalis* e 12 (50,0%) das amostras de *E. faecium* (**Tabela 3**). A colonização inicial do trato urinário por *Enterococcus* pode ser comumente viabilizada pelo uso de dispositivos como cateteres urinários (MILLER *et al.*, 2016; SYDNOR; PERL, 2011). Infecções do trato urinário estão entre os tipos mais comuns de infecções causadas por *Enterococcus* em adultos, o que corrobora com o observado no nosso estudo (BARROS; MARTINELLI; ROCHA, 2009; FISHER; PHILLIPS, 2009; GOEL *et al.*, 2016; SWAMINATHAN; ALANGADEN, 2010).

O segundo espécime clínico de onde as amostras de *E. faecalis* foram mais frequentemente isoladas foi o sangue [18 (23,4%)] (**Tabela 3**). A bacteremia enterocócica tem sido associada a altos índices de morbidade entre pacientes, e alguns fatores de risco estão associados à incidência dessas infecções, entre eles estão o uso de cateteres intravenosos, que podem carrear os microrganismos do ambiente para a corrente sanguínea, além de propiciarem a formação de biofilme; condições hematológicas como neutropenia, transplante de medula óssea e hipoalbuminemia, que estão associadas à imunossupressão e ao rompimento das barreiras da mucosa intestinal, levando a um desequilíbrio do sistema imune do hospedeiro e à migração de enterococos colonizadores do trato gastrointestinal para a corrente sanguínea (EDGEWORTH; TREACHER; EYKYN, 1999; LUCAS *et al.*, 1998; PEEL *et al.*, 2012; VYDRA *et al.*, 2012). A presença de enterococos no sangue possibilita a colonização do endocárdio e de vasos sanguíneos, bem como a formação de biofilme em próteses cardíacas, tais eventos podem contribuir para a patogênese

da endocardite enterocócica, um processo infeccioso de alta gravidade e associado à mortalidade de pacientes (MOHAMED; HUANG, 2007; MUNITA; ARIAS; MURRAY, 2012). Em países da América do Norte, como nos Estados Unidos, os *Enterococcus* estão frequentemente associados à etiologia de bacteremias, sendo uma de suas principais causas (ARIAS; MURRAY, 2012; BILLINGTON *et al.*, 2014).

Apesar da ausência de informações sobre as condições clínicas dos pacientes de onde foram isoladas as amostras indicativas de infecção neste trabalho, sabemos que a maioria das amostras de *E. faecalis* [39 (50,6%)], de *E. faecium* [19 (79,2%)], uma das amostras de *E. avium* e ambas as amostras de *E. gallinarum* foram isoladas de pacientes internados em setores de monitoramento intensivo, como UTI, CTI e UADC, que compreendem pacientes em estados de saúde mais fragilizados e, portanto, mais vulneráveis a aquisição de infecções. Já foi descrito que a incidência de infecções nosocomiais em unidades de terapia intensiva é de duas a cinco vezes maior do que na população hospitalar geral de pacientes internados (ARIAS; MURRAY, 2012; DASGUPTA *et al.*, 2015; ZIAKAS *et al.*, 2013).

Das 27 amostras sugestivas de colonização do trato gastrointestinal, 25 (92,6%) foram isoladas de pacientes internados no hospital A e apenas duas (7,4%) de pacientes do hospital B, essa diferença pode ser justificada pelo regime de rastreamento de VRE desses hospitais, visto que no hospital A a coleta de espécimes por *swab* retal é uma prática de rotina, enquanto no hospital B a mesma só é realizada mediante prescrição médica. No entanto, todas as 27 amostras foram isoladas de pacientes internados em unidades de monitoramento intensivo, albergando amostras das quatro espécies de *Enterococcus* identificadas, dentre essas, 26 (96,3%) foram classificadas com VRE. Tendo em vista a característica oportunista dos *Enterococcus*, a colonização de pacientes em tais circunstâncias por bactérias desse gênero, principalmente por VRE representa uma grave ameaça à saúde pública, uma vez que a colonização é a primeira etapa para a instalação de uma infecção enterocócica, além de que esses pacientes estão mais propensos ao desenvolvimento de infecções graves, de difícil tratamento e com grande potencial de evolução para óbito (GOH *et al.*, 2017; MILLER *et al.*, 2016; VAN TYNE; GILMORE, 2014). Além disso, a disseminação desses microrganismos ocorre facilmente através dos profissionais de saúde e pela contaminação de dispositivos hospitalares (ARIAS; MURRAY, 2012; CHATTERJEE *et al.*, 2007). Um estudo longitudinal que acompanhou 752 pacientes

de transplante de células-tronco hematopoiéticas entre 2004 e 2008 constatou que 93 (12,4%) dos pacientes desenvolveram bacteremia por VRE no primeiro ano após o transplante. E entre os pacientes que já eram colonizados por VRE antes do transplante, 14,0% desenvolveram bacteremia, enquanto entre os que não eram colonizados essa incidência foi somente de 4,0%, o que comprovou estatisticamente que pacientes colonizados por VRE tem mais riscos de desenvolver bacteremia após esse tipo de procedimento do que pacientes não-colonizados (SALGADO, 2008; VYDRA *et al.*, 2012).

Levando em consideração que o fenótipo VanA é caracterizado pela resistência simultânea aos antimicrobianos vancomicina e teicoplanina, dentre as amostras VRE, 45 [28 (36,4%) de *E. faecalis*, 16 (66,7%) de *E. faecium* e uma (50,0%) de *E. gallinarum*] foram associadas a esse fenótipo, sendo também resistentes à teicoplanina, enquanto apenas duas amostras (uma de *E. faecium* e uma de *E. avium*) foram associadas ao fenótipo VanB, caracterizado pela resistência à vancomicina e susceptibilidade à teicoplanina. A prevalência do fenótipo VanA sobre o fenótipo VanB corrobora com os dados da literatura (**Tabela 4**) (CARIAS *et al.*, 1998; CATTOIR; LECLERCQ, 2013; COURVALIN, 2006; MARCHI *et al.*, 2018).

A frequência de resistência à vancomicina e à ampicilina em *E. faecium* foi superior à observada em *E. faecalis*, o que, em relação à ampicilina, já vem sendo descrita desde o final da década de 1970, quando foi observado o aumento na CIM de ampicilina de 4 para 64 µg/mL em isolados de *E. faecium*, e na década seguinte, um fenótipo resistente a altos níveis desse antimicrobiano emergiu, com CIM superior a 128 µg/mL. Isso também corrobora com a alta frequência de amostras de *E. faecium* resistentes à penicilina [23 (95,8%)], sendo esse um fenótipo comum nessa espécie (GALLOWAY-PEÑA *et al.*, 2009; GRAYSON *et al.*, 1991; MILLER *et al.*, 2016). Já no que tange à maior frequência de resistência à vancomicina em *E. faecium* [17 (70,8%)], essa foi percebida na década de 1990 em diversos países, decorrente do uso difundido de vancomicina e antimicrobianos de amplo espectro de ação em hospitais dos Estados Unidos e do uso de avoparcina na criação de animais na Europa, o que também respalda a alta frequência de resistência à teicoplanina em amostras dessa espécie [16 (66,7%)], pois essa também pertence à classe dos glicopeptídeos (CATTOIR; LECLERCQ, 2013; GAO; HOWDEN; STINEAR, 2018; HIDRON *et al.*, 2008; WILLEMS; VAN SCHAİK, 2009).

Alta frequência de resistência a nitrofurantoína também foi observada entre as amostras de *E. faecium* [20 (83,3%)]. Esse antimicrobiano costuma ser prescrito para o tratamento de infecções do trato urinário baixo, sendo considerada até recentemente uma alternativa eficaz para o tratamento de infecções por VRE nesse sítio (MEENA *et al.*, 2017; ZHANEL; HOBAN; KARLOWSKY, 2001). No entanto, os resultados deste trabalho mostram o oposto, das 17 amostras de *E. faecium* resistentes à vancomicina, nenhuma apresentou susceptibilidade à nitrofurantoína, sendo 15 resistentes e duas intermediárias a esta droga. Isso indica que a nitrofurantoína talvez não seja mais uma garantia de sucesso terapêutico para infecções dessa natureza.

O aumento no número de infecções causadas por *E. faecium* nos últimos anos representa grande ameaça à saúde pública, em vista dos altos índices de resistência a diferentes classes de antimicrobianos apresentados por essa espécie, sendo muito mais difíceis de serem tratadas do que as causadas por *E. faecalis* (ARIAS; MURRAY, 2012; GAO; HOWDEN; STINEAR, 2018).

A alta frequência de amostras de *E. faecalis* resistentes à tetraciclina [64 (83,1%)] e a altas concentrações de gentamicina [44 (57,1%)] observada nesse estudo é comum, e é sabidamente decorrente de processos de transferência horizontal de genes de resistência (CAUWERTS *et al.*, 2007; CHOI; WOO, 2015; EMANEINI *et al.*, 2016; MILLER; MUNITA; ARIAS, 2014; OSUKA *et al.*, 2016). Também foi observada alta frequência de resistência para a associação dos antimicrobianos quinupristina/dalfopristina [68 (88,3%)], o que já era esperado ao levar-se em consideração que a resistência à classe das estreptograminas é uma característica intrínseca dessa espécie (HOLLENBECK; RICE, 2012; MILLER; MUNITA; ARIAS, 2014). No entanto, a presença de cinco (6,5%) amostras de *E. faecalis* susceptíveis a quinupristina/dalfopristina e de quatro (5,2%) amostras intermediárias também foi constatada. A susceptibilidade de *E. faecalis* a estreptograminas também já foi descrita em estudos prévios e pode ser atribuída a mutações no *locus lsa*, responsável pela expressão da resistência à essa classe de antimicrobianos (DINA; MALBRUNY; LECLERCQ, 2003; SINGH; MURRAY, 2005).

De um modo geral, tanto as amostras de *E. faecium*, quanto as de *E. faecalis* apresentaram altos percentuais de resistência à eritromicina, norfloxacin, ciprofloxacina e levofloxacina (**Tabela 4**). A resistência à eritromicina, antimicrobiano da classe dos macrolídeos, foi a mais frequente do estudo, albergando um total de 78

(73,6%) amostras (**Figura 2**). Essa característica é bem difundida entre *Enterococcus* e está relacionada à aquisição de genes resistência (LÓPEZ *et al.*, 2010; PORTILLO *et al.*, 2000). Observou-se alta frequência de resistência das amostras estudadas à norfloxacin [66 (62,2%)], ciprofloxacina [65 (61,3%)] e levofloxacina [64 (60,4%)], essa pode ser explicada pela presença de mutações em genes codificadores de enzimas envolvidas nos processos de replicação, transcrição e síntese de ácidos nucleicos entre os membros desse gênero, promovendo uma alteração no sítio alvo das fluoroquinolonas (MILLER; MUNITA; ARIAS, 2014; YASUFUKU *et al.*, 2011).

A capacidade dos antimicrobianos linezolid e tigeciclina de inibirem o crescimento de todas as amostras de *Enterococcus* do estudo (**Figura 2**) reafirma a escolha desses fármacos como alternativas ainda promissoras para o tratamento de infecções causadas por VRE. No entanto, a prescrição de tais medicamentos deve ser feita com cautela e de forma controlada, visto que já foram relatados casos de bactérias resistentes a ambos como agentes de infecções severas. Logo, o uso difundido dessas drogas poderia favorecer a disseminação das amostras resistentes e limitar ainda mais as poucas estratégias terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções por VRE (ARIAS; CONTRERAS; MURRAY, 2010; BI *et al.*, 2018; BONORA *et al.*, 2006; CORDINA *et al.*, 2012; DE ALMEIDA *et al.*, 2014; FIEDLER *et al.*, 2016; MUTSCHLER *et al.*, 2013; WERNER *et al.*, 2008).

Em relação à distribuição dos determinantes genéticos de virulência pesquisados nesse estudo, foi observado que os genes *asa1*, *cyIA* e *gelE* se apresentaram exclusivamente em amostras de *E. faecalis*, sendo também os mais frequentes entre as amostras dessa espécie em ambos os hospitais, o que corrobora com os achados de outros autores (HEIDARI *et al.*, 2016; SABIA *et al.*, 2008; SHARIFI *et al.*, 2013; SHOKOOHIZADEH *et al.*, 2018). O gene *gelE*, detectado em 67 amostras, foi o determinante que se apresentou em maior frequência no estudo (**Figura 3**), o que é consistente com os resultados de outros pesquisadores (HEIDARI *et al.*, 2016; SABIA *et al.*, 2008; SHARIFI *et al.*, 2013; SHOKOOHIZADEH *et al.*, 2018). O gene *esp* foi detectado com maior frequência entre amostras de *E. faecalis*, mas também presente em amostras de *E. faecium* e em *E. avium* (**Tabela 6**). A frequência de genes codificadores de adesinas, como *asa1* e *esp*, e de gelatinase (*gelE*) entre amostras de *E. faecalis* também foi observada em um estudo realizado na Bulgária entre junho de 2013 e junho de 2015, envolvendo 510 amostras de *Enterococcus* (370 de *E.*

*faecalis* e 140 de *E. faecium*), sendo significativamente superior quando comparada à frequência desses genes entre as amostras de *E. faecium* (STRATEVA *et al.*, 2016).

A detecção do determinante genético de virulência *hyl* apenas entre amostras de *E. faecium* nesse estudo é condizente com os relatos da literatura, que descrevem esse gene com frequência quase exclusiva entre bactérias dessa espécie (ARIAS *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2010; GAO; HOWDEN; STINEAR, 2018).

Um achado interessante da nossa pesquisa foi a detecção do gene *esp* em uma das amostras de *E. avium*. A presença desse determinante genético de virulência entre amostras não pertencentes às espécies *E. faecalis* e *E. faecium* é rara, sendo importante ressaltar que se trata de uma amostra isolada por *swab* retal de um paciente internado em terapia intensiva no hospital A. A expressão da proteína de superfície de *Enterococcus* codificada por esse gene em *E. avium* pode conferir diversas vantagens à patogenicidade dessa espécie (usualmente associadas apenas a *E. faecalis* e *E. faecium*) como a sua função de adesina e a sua capacidade de formar biofilme, que favorecem o processo de colonização, bem como a persistência da bactéria em superfícies abióticas, além de poder conferir escape às defesas do sistema imune do hospedeiro pela expressão de diferentes fenótipos da proteína (HEIKENS; BONTEN; WILLEMS, 2007; PAGANELLI; WILLEMS; LEAVIS, 2012; VAN TYNE; GILMORE, 2014; ZHENG *et al.*, 2017).

Apesar da maior frequência dos determinantes genéticos de virulência entre amostras isoladas de sítios indicativos de infecção, como sangue e urina, é possível notar que a presença desses genes não foi restritamente associada a processos infecciosos, visto que também foram bastante frequentes entre amostras oriundas de colonização do trato gastrintestinal (**Tabela 8**). A colonização dessa região pode preceder a invasão do tecido do hospedeiro e o alcance de outros sítios através da corrente sanguínea, o que pode ser favorecido por danos ao epitélio intestinal, com a perda da barreira da mucosa, e pela presença dos fatores de virulência bacterianos (BISWAS *et al.*, 2014; CHAVERS *et al.*, 2003; KARA *et al.*, 2015). Além disso, a alta frequência desses genes de virulência associada a amostras isoladas de pacientes em terapia intensiva (**Tabela 7**) pode potencializar a patogênese dos processos infecciosos, levando em consideração que esses pacientes são frequentemente imunossuprimidos (CHATTERJEE *et al.*, 2007).



A maior distribuição dos genes *asa1*, *esp* e *gelE* entre amostras susceptíveis à vancomicina e a maior frequência dos genes *cylA* e *hyl* em amostras VRE foi observada no presente estudo. Em um estudo realizado com 115 amostras de *E. faecalis* oriundas de diversas regiões do Brasil em 2008, sendo 24 VRE e 91 VSE, foi investigada a presença dos genes *cylL<sub>L</sub>*, *cylL<sub>S</sub>*, *cylA*, *esp* e *asa1*, não sendo relatada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre amostras VRE e VSE na distribuição desses genes (CAMARGO *et al.*, 2008). Em outro estudo realizado em Porto Alegre em 2013, onde 50 amostras de *Enterococcus* (30 de *E. faecalis* e 20 de *E. faecium*), sendo 20 amostras de *E. faecalis* VRE assim como todas as de *E. faecium*, foi pesquisada a presença dos determinantes genéticos *asa1*, *gelE* e *esp*, também não sendo alegada diferença significativa na distribuição desses genes de acordo com a resistência à vancomicina (COMERLATO *et al.*, 2013).

No entanto, um estudo de 2016 realizado na Índia com 500 amostras de *Enterococcus* (440 VSE e 60 VRE) relatou que a presença de *gelE*, *esp* e *hyl* entre amostras VRE de origem clínica foi superior à observada entre amostras VSE de mesma origem. E em relação às amostras de origem fecal, a frequência de *asa1*, *esp* e *gelE* em VRE também foi significativamente superior à de VSE, o que difere dos achados do nosso estudo (BISWAS *et al.*, 2016).

A maior frequência de todos os determinantes genéticos de virulência analisados no estudo entre amostras MDR (**Tabela 9**) pode ser explicada pela coexistência de genes de virulência e de resistência em um mesmo elemento genético móvel ou ilha de patogenicidade. A co-seleção desses genes fornece uma grande vantagem evolutiva às bactérias do gênero *Enterococcus*, uma vez que a presença de fatores de virulência pode favorecer a colonização do organismo do hospedeiro e a evasão das defesas do seu sistema imune, à medida que a resistência aos antimicrobianos permite à bactéria contornar as estratégias terapêuticas, contribuindo para o aumento da sua patogenicidade e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de infecções mais persistentes e severas (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013; BURRUS; WALDOR, 2004; MCBRIDE *et al.*, 2009; VAN TYNE; GILMORE, 2014; WURSTER; SAAVEDRA; GILMORE, 2016).

Em relação aos perfis genéticos de virulência e suas distribuições entre as amostras, foi observado que a combinação dos determinantes *asa1*, *cylA* e *gelE* foi a mais frequente entre amostras de *E. faecalis* em ambos os hospitais (**Tabela 10**). Esse

perfil se mostrou relacionado tanto a amostras obtidas de sítios indicativos de infecção quanto a amostras associadas à colonização do trato gastrointestinal (**Tabela 11**). A expressão dos fatores de virulência codificados por esses genes confere grande patogenicidade a essas bactérias, pois suas ações combinadas favorecem diferentes processos, como a colonização do hospedeiro através da formação de biofilme, adesão e invasão de células, lise de outros microrganismos procariontes, assim como a lise de células do hospedeiro, componentes da matriz extracelular e eritrócitos. Permite também a evasão do sistema imune e a transferência de genes de resistência e virulência por conjugação (ARIAS; MURRAY, 2012; MILLER *et al.*, 2016; VAN TYNE; GILMORE, 2014).

No estudo realizado por Camargo *et al.* (2008) com 115 amostras de *E. faecalis* oriundas de diversas regiões brasileiras, o conjunto dos fatores: substância agregativa (*asa1*), gelatinase (*gelE*) e proteína de superfície de *Enterococcus* (*esp*) se mostrou mais comum entre as amostras, estando presente em 12 (75,0%) de 16 amostras do clone predominante, diferindo dos achados do nosso estudo pela presença de *esp* ao invés de *cylA* entre os perfis genéticos de virulência mais frequentes. O mesmo padrão foi observado em um estudo realizado com 132 amostras de *Enterococcus* (sendo 108 dessas identificadas como *E. faecalis*) provenientes de pacientes oncológicos no Rio de Janeiro, entre as quais o perfil genético de virulência composto pelos genes *asa1*, *esp* e *gelE* também foi o mais frequente (SANTOS *et al.*, 2017). O gene *cylA*, apesar de ter sido menos frequente no estudo de Santos *et al.* (2017), foi constantemente encontrado em associação aos genes *asa1*, *esp* e *gelE*, o que pode ser atribuído à presença desses determinantes em um mesmo elemento genético móvel ou em uma mesma ilha de patogenicidade.

No entanto, no estudo de Camargo *et al.* (2008), uma única amostra intimamente relacionada ao clone predominante expressou citolisina ao invés de *Esp*, o que sugere que essa amostra pode ter adquirido o operon envolvido na expressão de citolisina e perdido o gene *esp*. Essa teoria pode fornecer uma explicação para a origem das amostras de *E. faecalis* portadoras do perfil *asa1*, *cylA* e *gelE* que são predominantes no presente estudo.

De forma semelhante, um perfil genético característico foi mais frequente entre amostras de *E. faecium*, composto pelos genes *esp* e *hyl*, predominante tanto entre amostras associadas ao processo de colonização do trato gastrointestinal, como aos

sugestivos casos de infecção. A combinação dos fatores de virulência codificados por esses genes pode fornecer atributos importantes às amostras dessa espécie, como a formação de biofilme, evasão das defesas do sistema imune do hospedeiro (já que o gene *esp* pode codificar formas alternativas da proteína), adesão às células epiteliais do trato urinário, além de facilitar a colonização intestinal e a invasão do peritônio (FREITAS *et al.*, 2010; MILLER *et al.*, 2016; PAGANELLI; WILLEMS; LEAVIS, 2012; ZHENG *et al.*, 2017).

Os perfis de virulência formados pelos genes *asa1*, *cylA* e *gelE* de *E. faecalis* e *esp* e *hyl* de *E. faecium* também foram os mais frequentes entre amostras isoladas de pacientes internados em terapia intensiva (n=61), representando 24 (39,3%) e 13 (21,3%) dessas amostras, respectivamente (**Tabela 12**). A maior frequência de ambos os perfis também foi observada entre amostras VRE [26 (54,2%) e 12 (25,0%), respectivamente] (**Tabela 13**) e entre amostras MDR [35 (42,2%) e 13 (15,7%), respectivamente] (**Tabela 14**).

A combinação dos padrões de distribuição desses perfis pode ser justificada pela correlação genética das amostras que os compõem, onde a grande maioria das amostras de *E. faecalis* resistentes à vancomicina e portadoras do perfil genético de virulência *asa1*, *cylA* e *gelE* constituem o grupo clonal FsA, que alberga 35,1% do total de amostras dessa espécie (**Figura 4**).

As amostras de *E. faecium* resistentes à vancomicina e portadoras do perfil genético de virulência *esp* e *hyl*, em grande maioria estão incluídas nos grupos clonais FmA e FmB, que representam 45,8 e 20,8% do total de amostras dessa espécie no presente estudo, respectivamente (**Figura 5**). As amostras de *E. faecium* do CC17, altamente adaptadas ao ambiente hospitalar e detectadas em diversas regiões do mundo, são caracterizadas também por possuírem uma ilha de patogenicidade carreadora dos genes *esp* e/ou *hyl* e resistência a ampicilina e fluoroquinolonas, o que sugere a possibilidade dos grupos clonais FmA e FmB pertencerem a esse complexo clonal (visto que a maioria dessas amostras, com exceção de uma, são resistentes a esses antimicrobianos), além fornecer uma explicação para a frequência desse perfil genético de virulência entre amostras de *E. faecium* (OCHOA *et al.*, 2013; RAVEN *et al.*, 2016; WILLEMS *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2015).

Além das amostras de *E. faecalis* e de *E. faecium*, vale ressaltar a presença de um pulsotipo de *E. avium* caracterizado por resistência à vancomicina e pela detecção do determinante genético de virulência *esp* (**Figura 6**), além de ambas as amostras de *E. gallinarum*, que apesar de não terem exibido nenhum gene de virulência, também são resistentes à vancomicina e MDR, pertencendo a um mesmo pulsotipo.

A circulação dos grupos clonais FsA, FmA e FmB foi associada a ambas as unidades hospitalares de origem das amostras, o que pode ser um indício da disseminação de amostras de *Enterococcus* altamente patogênicas entre os hospitais da cidade de Cachoeiro de Itapemirim no Espírito Santo (SANTOS *et al.*, 2017). Dessa forma, o presente estudo fornece evidências que fundamentam a necessidade do controle de clones de alto risco associados a infecções nosocomiais do gênero *Enterococcus* nessa região.

## 6. CONCLUSÃO

A emergência das bactérias do gênero *Enterococcus* como importantes patógenos nosocomiais nas últimas décadas reflete a necessidade de se investigar os fatores envolvidos na patogênese das infecções causadas por esses microrganismos. Entre esses fatores estão a crescente resistência aos antimicrobianos que acompanha essas infecções ao longo dos anos e a presença de fatores de virulência que contribuem para o desenvolvimento das mesmas.

A inexistência de informações sobre os atributos de virulência e sobre diversidade genética dos *Enterococcus* que circulam os hospitais da cidade de Cachoeiro de Itapemirim no Espírito Santo motivou a realização dessa pesquisa. Das amostras coletadas para tal, a grande maioria foi identificada como pertencente à espécie *E. faecalis*, seguidas das espécies *E. faecium*, *E. avium* e *E. gallinarum*. As fontes clínicas de maior frequência de isolamento dessas amostras foram a urina, TGI e sangue, indicando a presença desses microrganismos tanto em associação à colonização como a processos infecciosos.

Os maiores percentuais de resistência das amostras do estudo foram aos antimicrobianos: eritromicina, quinupristina/dalfopristina, tetraciclina e aos membros da classe das fluoroquinolonas (norfloxacina, ciprofloxacina e levofloxacina) e a vancomicina. Além disso, 83 (78,3%) das amostras do estudo foram classificadas como MDR.

Entre as amostras de *E. faecalis*, o determinante genético de virulência encontrado com maior frequência foi *gelE*, seguido dos genes *asa1*, *cylA* e *esp*, enquanto entre as amostras de *E. faecium* a frequência foi superior para o gene *esp*, seguido do gene *hyl*.

Foram encontrados três grupos clonais de maior importância clínica predominantes entre as amostras do estudo, sendo um de *E. faecalis*, definido, em maioria, por amostras resistentes à vancomicina e a elevados níveis de aminoglicosídeos e portadoras do perfil genético de virulência formado pelos genes *asa1*, *cylA* e *gelE*; e os outros dois englobando amostras de *E. faecium*, em sua maioria resistentes à vancomicina e carreadoras dos determinantes genéticos de virulência *esp* e *hyl*.

Além dos grupos clonais circulantes de *E. faecalis* e *E. faecium*, destaca-se a presença de uma única amostra de *E. avium* resistente à vancomicina e portadora do gene de virulência *esp*, o que consiste em uma raridade entre amostras dessa espécie, sendo associada à colonização do TGI de um paciente do hospital A,. Duas amostras clones de *E. gallinarum* resistentes à vancomicina também foram isoladas do TGI de pacientes internados no hospital A, o que também representa um evento não usual. Entre essas amostras houve alta frequência de multirresistência e a grande maioria foi isolada de pacientes internados em unidades de monitoramento intensivo.

A identificação de fatores de virulência associados à invasão e à severidade das infecções enterocócicas revela a possibilidade do desenvolvimento de alternativas para o controle dessas enfermidades, como a prevenção da formação de biofilme por essas espécies ou a inibição de outros fatores de virulência, o que é relevante, considerando que as opções de tratamento terapêutico por antimicrobianos são limitadas para este gênero. Além disso, esse é o primeiro estudo sobre virulência de *Enterococcus* na cidade de Cachoeiro de Itapemirim no Espírito Santo, contribuindo com dados epidemiológicos de um importante patógeno nosocomial de importância nacional e internacional.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, A. *et al.* Insects in confined swine operations carry a large antibiotic resistant and potentially virulent enterococcal community. **BMC Microbiology**, v. 11, 2011.
- ALVES, G. DA S. *et al.* Clonal dissemination of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST412 in a Brazilian region. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 656–659, 2017.
- ANDREWES, F. W.; HORDER, T. J. A study of the streptococci pathogenic for man. **the Lancet**, v. 168, n. 4333, p. 708–713, 1906.
- ARCHIMBAUD, C. *et al.* In vitro adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 2, p. 75–80, 2002.
- ARIAS, C. A. *et al.* Cotransfer of antibiotic resistance genes and a Hylef<sub>m</sub> - containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 10, p. 4240–4246, 2009.
- ARIAS, C. A.; CONTRERAS, G. A.; MURRAY, B. E. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 6, p. 555–562, 2010.
- ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the *Enterococcus*: Beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 266–278, 2012.
- BARGHOUTHI, S. A. A Universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 430–444, 2011.
- BARNES, E. M. Tetrazolium Reduction as a Means of Differentiating *Streptococcus faecalis* from *Streptococcus faecium*. **Journal of General Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 57–68, 1956.
- BARROS, M.; MARTINELLI, R.; ROCHA, H. Enterococcal urinary tract infections in a university hospital: clinical studies. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 294–6, 2009.
- BECEIRO, A.; TOMÁS, M.; BOU, G. Antimicrobial resistance and virulence: A successful or deleterious association in the bacterial world? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 185–230, 2013.
- BI, R. *et al.* The emerging problem of linezolid-resistant enterococci. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 13, p. 11–19, 2018.
- BIENDO, M. *et al.* Molecular characterization of glycopeptide-resistant enterococci from hospitals of the picardy region (France). **International Journal of Microbiology**, v. 2010, p. 1–8, 2010.
- BILLINGTON, E. O. *et al.* Incidence, risk factors, and outcomes for *Enterococcus* spp. blood stream infections: A population-based study. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 76–82, 2014.

- BISWAS, P. *et al.* Virulence markers of vancomycin resistant enterococci isolated from infected and colonized patients. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 6, n. 4, p. 157–163, 2014.
- BISWAS, P. P. *et al.* Molecular characterization of virulence genes in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive enterococci. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 16–24, 2016.
- BOERLIN, P. *et al.* Diversity of *Enterococcus cecorum* from chickens. **Veterinary Microbiology**, v. 157, n. 3–4, p. 405–411, 2012.
- BONORA, M. G. *et al.* Emergence of linezolid resistance in the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* multilocus sequence typing C1 epidemic lineage. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 1153–1155, 2006.
- BONTEN, M. J.; WILLEMS, R.; WEINSTEIN, R. A. Vancomycin-resistant enterococci: Why are they here, and where do they come from? **Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 5, p. 314–325, 2001.
- BOOTH, M. C. *et al.* Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. **Molecular Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 1175–1184, 1996.
- BURRUS, V.; WALDOR, M. K. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 5, p. 376–386, 2004.
- CAMARGO, I. L. B. C. *et al.* Virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 273–278, 2008.
- CARIAS, L. L. *et al.* 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. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 17, p. 4426–4434, 1998.
- CARRIÇO, J. A. *et al.* Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5483–5490, 2005.
- CATTOIR, V.; GIARD, J.-C. Antibiotic resistance in *Enterococcus faecium* clinical isolates. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 12, n. 2, p. 239–248, 2014.
- CATTOIR, V.; LECLERCQ, R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 4, p. 731–742, 2013.
- CAUWERTS, K. *et al.* High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the *erm(B)* gene. **Avian Pathology**, v. 36, n. 5, p. 395–399, 2007.
- CHANDLER, J. R.; HIRT, H.; DUNNY, G. M. A paracrine peptide sex pheromone also acts as an autocrine signal to induce plasmid transfer and virulence factor expression in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 43, p. 15617–15622, 2005.
- CHATTERJEE, I. *et al.* The implications of enterococci for the intensive care unit.



**Critical care and resuscitation : journal of the Australasian Academy of Critical Care Medicine**, v. 9, n. 1, p. 69–75, 2007.

CHAVERS, L. S. *et al.* Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. **Journal of Hospital Infection**, v. 53, n. 3, p. 159–171, 2003.

CHOI, J. M.; WOO, G. J. Transfer of tetracycline resistance genes with aggregation substance in food-borne *Enterococcus faecalis*. **Current Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 476–484, 2015.

CHOW, J. W. *et al.* Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 11, p. 2474–2477, 1993.

CHUANG-SMITH, O. N. *et al.* Acceleration of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by aggregation substance expression in an Ex Vivo model of cardiac valve colonization. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. e15798, 2010.

CLEWELL, D. B. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. **Cell**, v. 73, n. 1, p. 9–12, 1993.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th Informational Supplement M100, EUA, 2018.

COMERLATO, C. B. *et al.* Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p. 590–595, 2013.

COQUE, T. M. *et al.* Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. **Journal of Infectious Diseases**, v. 171, n. 5, p. 1223–1229, 1995.

CORDINA, C. *et al.* Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* associated with omeprazole use in a surgical patient. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 7, p. 1806–1807, 2012.

CORREA, A. A. F. *et al.* Small hospitals matter: Insights from the emergence and spread of vancomycin-resistant enterococci in 2 public hospitals in inner Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 82, n. 3, p. 227–233, 2015.

COURVALIN, P. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. Supplement 1, p. S25–S34, 2006.

DALLA COSTA LM *et al.* Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: First Case in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 160–163, 1998.

DASGUPTA, S. *et al.* Nosocomial infections in the intensive care unit: Incidence, risk factors, outcome and associated pathogens in a public tertiary teaching hospital of Eastern India. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, v. 19, n. 1, p. 14, 2015.

DE ALMEIDA, L. M. *et al.* Linezolid resistance in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates in a brazilian hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2993–2994, 2014.

DEIBEL, R. H. THE GROUP D STREPTOCOCCI. **Bacteriological reviews**, v. 28, n.

3, p. 330–66, 1964.

DINA, J.; MALBRUNY, B.; LECLERCQ, R. Nonsense mutations in the *Isa*-like gene in *Enterococcus faecalis* isolates susceptible to lincosamides and streptogramins A. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 7, p. 2307–2309, 2003.

DOLKA, B. *et al.* Draft genome sequences of two commensal *Enterococcus cecorum* strains isolated from chickens in Belgium. **Genome Announcements**, v. 3, n. 5, p. 1–2, 2015.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167–193, 2002.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1628–1635, 2001.

EDGEWORTH, J. D.; TREACHER, D. F.; EYKYN, S. J. A 25-year study of nosocomial bacteremia in an adult intensive care unit. **Critical Care Medicine**, v. 27, n. 8, p. 1421–1428, 1999.

EMANEINI, M. *et al.* Prevalence of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in an Iranian hospital. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 4, p. 197–200, 2016.

ENGELBERT, M. *et al.* Contribution of gelatinase, serine protease, and *fsr* to the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 6, p. 3628–3633, 2004.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease. Clinical breakpoints, v 8.0, 2018.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Surveillance and disease data for antimicrobial resistance**. Disponível em: <<https://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data>>. Acesso em: 16 jun. 2018.

EUZÉBY, J. P. **List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.net>>. Acesso em: 22 maio. 2018.

FABRETTI, F. *et al.* Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 7, p. 4164–4171, 2006.

FACKLAM, R. R.; COLLINS, M. D. Identification of *Enterococcus* Species Isolated from Human Infections by a Conventional Test Scheme. v. 27, n. 4, p. 731–734, 1989.

FARON, M. L.; LEDEBOER, N. A.; BUCHAN, B. W. Resistance mechanisms, epidemiology, and approaches to screening for vancomycin-resistant *Enterococcus* in the health care setting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 10, p. 2436–2447, 2016.

FIEDLER, S. *et al.* Tigecycline resistance in clinical isolates of *Enterococcus faecium*

- is mediated by an upregulation of plasmid-encoded tetracycline determinants *tet(L)* and *tet(M)*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 4, p. 871–881, 2016.
- FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, n. 6, p. 1749–1757, 2009.
- FREITAS, A. R. *et al.* Global spread of the *hyl*<sub>Efm</sub> colonization-virulence gene in megaplasmids of the *Enterococcus faecium* CC17 polyclonal subcluster. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2660–2665, 2010.
- FRIEDEN, T. R. *et al.* Emergence of vancomycin-resistant enterococci in New York City. **Lancet**, v. 342, n. 8863, p. 76–9, 1993.
- FURTADO, G. H. C. *et al.* Risk factors for vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* bacteremia in hospitalized patients: An analysis of two case-control studies. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 7, p. 447–451, 2006.
- GALLI, D.; FRIESENEGGER, A.; WIRTH, R. Transcriptional control of sex-pheromone-inducible genes on plasmid pAD1 of *Enterococcus faecalis* and sequence analysis of a third structural gene for (pPD1 -encoded) aggregation substance. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 1297–1308, 1992.
- GALLI, D.; LOTTSPREICH, F.; WIRTH, R. Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 895–904, 1990.
- GALLOWAY-PENÑA, J. R. *et al.* Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 10, p. 1566–1573, 2009.
- GAO, W.; HOWDEN, B. P.; STINEAR, T. P. Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. **Current Opinion in Microbiology**, v. 41, p. 76–82, 2018.
- GARSIN, D. A. *et al.* **Pathogenesis and Models of Enterococcal Infection**. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.
- GHOSH, A.; DOWD, S. E.; ZUREK, L. Dogs leaving the ICU carry a very large multi-drug resistant enterococcal population with capacity for biofilm formation and horizontal gene transfer. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. 1-13, 2011.
- GOEL, V. *et al.* Community acquired enterococcal urinary tract infections and antibiotic resistance profile in North India. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 8, n. 1, p. 50, 2016.
- GOERING, R. V. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 866–875, 2010.
- GOH, H. M. S. *et al.* Model systems for the study of enterococcal colonization and infection. **Virulence**, v. 8, n. 8, p. 1–38, 2017.
- GRAYSON, M. L. *et al.* Increasing resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics among clinical isolates of *Enterococcus faecium*: A 22-year review at one institution. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 11, p. 2180–2184, 1991.

- GUZMAN PRIETO, A. M. *et al.* Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: Attack of the clones? **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAY, p. 1–15, 2016.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95–108, 2004.
- HARTMAN, P. A.; REINBOLD, G. W.; SARASWAT, D. S. Indicator Organisms- A Review. I. Taxonomy of the Fecal Streptococci. **International journal of systematic bacteriology**, v. 16, n. 2, p. 197–221, 1966.
- HEGSTAD, K. *et al.* Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 6, p. 541–554, 2010.
- HEIDARI, H. *et al.* Virulence factors, antimicrobial resistance pattern and molecular analysis of Enterococcal strains isolated from burn patients. **Microbial Pathogenesis**, v. 90, p. 93–97, 2016.
- HEIKENS, E. *et al.* Identification of a novel genomic island specific to hospital-acquired clonal complex 17 *Enterococcus faecium* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 22, p. 7094–7097, 2008.
- HEIKENS, E.; BONTEN, M. J. M.; WILLEMS, R. J. L. Enterococcal surface protein esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 8233–8240, 2007.
- HENDRICKX, A. P. A. *et al.* LPxTG surface proteins of enterococci. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 423–430, 2009.
- HENDRICKX, A. P.; VAN SCHAİK, W.; WILLEMS, R. J. The cell wall architecture of *Enterococcus faecium*: from resistance to pathogenesis. **Future Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 993–1010, 2013.
- HERRERA, S. *et al.* Caracterización y control rápido de un brote de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina en una unidad de trasplantados renales en España: el ambiente importa. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 35, n. 1, p. 5–11, 2017.
- HIDANO, A. *et al.* Unraveling antimicrobial resistance genes and phenotype patterns among *Enterococcus faecalis* isolated from retail chicken products in Japan. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0121189, 2015.
- HIDRON, A. I. *et al.* 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. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 11, p. 996–1011, 2008.
- HIGUITA, N. I. A.; HUYCKE, M. M. Enterococcal disease, epidemiology, and implications for treatment. **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**, p. 1–27, 2014.
- HIRT, H.; ERLANDSEN, S. L.; DUNNY, G. M. Heterologous inducible expression of *Enterococcus faecalis* pCF10 aggregation substance Asc10 in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus gordonii* contributes to cell hydrophobicity and adhesion to fibrin.

**Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 8, p. 2299–2306, 2000.

HIRT, H.; SCHLIEVERT, P. M.; DUNNY, G. M. In vivo induction of virulence and antibiotic resistance transfer in *Enterococcus faecalis* mediated by the sex pheromone-sensing system of pCF10. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 716–723, 2002.

HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. **Virulence**, v. 3, n. 5, p. 421–433, 2012.

HOMAN, W. L. *et al.* Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 1963–1971, 2002.

HUBBLE, T. S. *et al.* Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 18, n. 2, p. 121–126, 2003.

HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. In vivo survival of *Enterococcus faecalis* is enhanced by extracellular superoxide production. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 418, p. 781–784, 1997.

HUYCKE, M. M.; JOYCE, W.; WACK, M. F. Augmented production of extracellular superoxide by blood isolates of *Enterococcus faecalis*. **J Infect Dis**, v. 173, n. 3, p. 743–746, 1996.

HUYCKE, M. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. S. Multiple-drug resistant enterococci: The nature of the problem and an agenda for the future. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 239–249, 1998.

JÄRVINEN, A.-K. *et al.* Rapid identification of bacterial pathogens using a PCR- and microarray-based assay. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 161, 2009.

JOHN, U. V.; CARVALHO, J. *Enterococcus*: Review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. **Frontiers in Biology**, v. 6, n. 5, p. 357–366, 2011.

KALINA, A. P. The taxonomy and nomenclature of enterococci. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 20, n. 2, p. 185–189, 1970.

KARA, A. *et al.* Risk of vancomycin-resistant enterococci bloodstream infection among patients colonized with vancomycin-resistant enterococci. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 58–61, 2015.

KART, D. *et al.* Evaluation of antimicrobial durability and anti-biofilm effects in urinary catheters against *Enterococcus faecalis* clinical isolates and reference strains. **Balkan Medical Journal**, v. 34, n. 6, p. 546–552, 2017.

KIM, D. S. *et al.* The *fms21 (pilA)-fms20* locus encoding one of four distinct pili of *Enterococcus faecium* is harboured on a large transferable plasmid associated with gut colonization and virulence. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 505–507, 2010.

KOCH, S. *et al.* Enterococcal infections: Host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. **Vaccine**, v. 22, n. 7, p. 822–830, 2004.

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. **BMC Infectious Diseases**, v. 6,

p. 130, 2006.

KREFT, B. *et al.* Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 1, p. 25–30, 1992.

KRISTICH, C. J.; RICE, L. B.; ARIAS, C. A. Enterococcal infection treatment and antibiotic resistance. **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**, p. 87–134, 2014.

KUCH, A. *et al.* Insight into antimicrobial susceptibility and population structure of contemporary human *Enterococcus faecalis* isolates from Europe. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 3, p. 551–558, 2012.

LANCEFELD, R. C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. **Journal of Experimental Medicine**, v. 57, n. 4, p. 571–595, 1933.

LAVARDE GOMEZ, J. A. *et al.* A multiresistance megaplasmid pLG1 bearing a hyl<sub>Em</sub> genomic island in hospital *Enterococcus faecium* isolates. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 2, p. 165–175, 2011.

LEAVIS, H. *et al.* A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 3, p. 672–682, 2004.

LEAVIS, H. L. *et al.* Epidemic and nonepidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1108–1115, 2003.

LEBRETON, F. *et al.* *ace*, which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by *Ers* and is involved in virulence. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 7, p. 2832–2839, 2009.

LEBRETON, F.; WILLEMS, R. J. L.; GILMORE, M. S. *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization. In: **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**. [s.l.: s.n.]. p. 1–56.

LEENDERTSE, M. *et al.* Enterococcal surface protein transiently aggravates *Enterococcus faecium*-induced urinary tract infection in mice. **The Journal of infectious diseases**, v. 200, n. 7, p. 1162–1165, 2009.

LINDEN, P. K. Optimizing therapy for vancomycin-resistant enterococci (VRE). **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 28, n. 6, p. 632–645, 2007.

LÓPEZ, F. *et al.* Antimicrobial susceptibility and macrolide resistance genes in *Enterococcus faecium* with reduced susceptibility to quinupristin-dalfopristin: level of quinupristin-dalfopristin resistance is not dependent on *erm(B)* attenuator region sequence. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, n. 1, p. 73–77, 2010.

LOWE, A. M.; LAMBERT, P. A.; SMITH, A. W. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: Homology with adhesins from some oral streptococci. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 2, p. 703–706, 1995.

LOZANO, C. *et al.* Detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* ST6-*vanB2* and *E. faecium* ST915-*vanA* in faecal samples of wild *Rattus rattus* in Spain.

**Veterinary Microbiology**, v. 177, n. 1–2, p. 168–174, 2015.

LUCAS, G. M. *et al.* Vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bacteremia: comparison of clinical features and outcomes. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 26, n. 5, p. 1127–1133, 1998.

MACCALLUM, W. G.; HASTINGS, T. W. A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* (nov. Spec.), with a description of the microorganism. **The Journal of experimental medicine**, v. 4, n. 5–6, p. 521–34, 1899.

MARCHI, A. P. *et al.* Vancomycin-resistant enterococci isolates colonizing and infecting haematology patients: clonality, and virulence and resistance profile. **Journal of Hospital Infection**, v. 99, n. 3, p. 346–355, 2018.

MCBRIDE, S. M. *et al.* Genetic variation and evolution of the pathogenicity island of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 10, p. 3392–3402, 2009.

MEENA, S. *et al.* Revisiting nitrofurantoin for vancomycin resistant enterococci. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 11, n. 6, p. 19-22, 2017.

MERLO, T. P.; DABUL, A. N. G.; CAMARGO, I. L. B. C. Different *vanA* elements in *E. faecalis* and in *E. faecium* suggest at least two origins of Tn1546 among VRE in a brazilian hospital. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 21, n. 3, p. 320–8, 2015.

MERQUIOR, V. L. C. *et al.* Bacteraemia associated with a vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* strain harbouring both the *vanA* and *vanC1* genes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 244–245, 2008.

MILLER, W. R. *et al.* Vancomycin-resistant enterococci: therapeutic challenges in the 21st Century. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 415–439, 2016.

MILLER, W. R.; MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 12, n. 10, p. 1221–1236, 2014.

MIRANDA, M. M.; SIMÕES, A. C. A.; TEIXEIRA, C. D. Resistência a antimicrobianos em cepas de *Enterococcus spp.* Isoladas da UTI de um hospital de Cachoeiro de Itapemirim – ES. **Revista Univap**, v. 22, n. 40, p. 364, 2017.

MISHRA, R. K. *et al.* A study for the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, haemolysin among clinical isolates in a tertiary care hospital. **Research & Reviews: A Journal of Microbiology and Virology**, v. 7, n. 3, p. 14–18, 2017.

MOELLERING, R. C. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 14, n. 6, p. 1173–6, 1992.

MOHAMED, J. A. *et al.* Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 6, p. 3658–3663, 2004.

MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1581–1588, 2007.

- MONDINO, S. S. B. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of clinical and intestinal enterococci isolated from inpatients and outpatients in two Brazilian hospitals. **Microbial Drug Resistance**, v. 9, n. 2, p. 167–174, 2003.
- MONTEALEGRE, M. C. *et al.* The *Enterococcus faecalis* EbpA pilus protein: Attenuation of expression, biofilm formation, and adherence to fibrinogen start with the rare initiation codon ATT. **mBio**, v. 6, n. 3, p. e00467-15, 2015.
- MONTEALEGRE, M. C. *et al.* Role of the Emp pilus subunits of *Enterococcus faecium* in biofilm formation, adherence to host extracellular matrix components, and experimental infection. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 5, p. 1491–1500, 2016.
- MORRISON, D. *et al.* DNA banding pattern polymorphism in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and criteria for defining strains. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 4, p. 1084–91, 1999.
- MUNDY, L. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 513–522, 2000.
- MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. Enterococcal endocarditis: can we win the war? **Current Infectious Disease Reports**, v. 14, n. 4, p. 339–349, 2012.
- MURUZÁBAL-LECUMBERRI, I. *et al.* Spread of an *Enterococcus faecalis* sequence type 6 (CC2) clone in patients undergoing selective decontamination of the digestive tract. **APMIS**, v. 123, n. 3, p. 245–251, 2015.
- MUSCHOLL-SILBERHORN, A. B. Pheromone-regulated expression of sex pheromone plasmid pAD1-encoded aggregation substance depends on at least six upstream genes and a cis-acting, orientation-dependent factor. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 13, p. 3816–3825, 2000.
- MUTSCHLER, M. *et al.* Severe sepsis caused by a linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in a 10-year-old girl after multiple trauma. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 6, p. e466–e467, 2013.
- MYLONAKIS, E. *et al.* The *Enterococcus faecalis* *fsrB* gene, a key component of the *fsr* quorum-sensing system, is associated with virulence in the rabbit endophthalmitis model. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4678–4681, 2002.
- NALLAPAREDDY, S. R. *et al.* Relative contributions of Ebp Pili and the collagen adhesin ace to host extracellular matrix protein adherence and experimental urinary tract infection by *Enterococcus faecalis* OG1RF. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 7, p. 2901–2910, 2011.
- NEVES, F. P. G. *et al.* Emergence of the *vanA* genotype among *Enterococcus gallinarum* isolates colonising the intestinal tract of patients in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 3, p. 211–215, 2009.
- NOSKIN, G. A. *et al.* Successful treatment of persistent vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia with linezolid and gentamicin. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 3, p. 689–690, 1999.
- OCHOA, S. A. *et al.* Molecular analysis and distribution of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* isolates belonging to clonal complex 17 in a tertiary care



center in Mexico City. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 291, 2013.

O'DRISCOLL, T.; CRANK, C. W. Vancomycin-resistant enterococcal infections: Epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. **Infection and Drug Resistance**, v. 8, p. 217–230, 2015.

OLMSTED, S. B. *et al.* Role of the pheromone-inducible surface protein Asc10 in mating aggregate formation and conjugal transfer of the *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 23, p. 7665–7672, 1991.

ORAVCOVA, V.; HADELOVA, D.; LITERAK, I. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with *vanA* gene isolated for the first time from wildlife in Slovakia. **Veterinary Microbiology**, v. 194, p. 43–47, 2016.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente**. Disponível em: <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5357:om-s-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:om-s-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812)>. Acesso em: 31 maio. 2018.

ORLA-JENSEN, S. The lactic acid bacteria. **Mem. Acad. R. Soc. Denmark Sect. Sci.**, v. 5, p. 81–197, 1919.

OSUKA, H. *et al.* High-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* causing invasive infection: Twelve-year surveillance in the Minami Ibaraki Area. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 22, n. 1, p. 61–63, 2016.

PAGANELLI, F. L. *et al.* Genome-wide screening identifies phosphotransferase system permease *bepA* to be involved in *Enterococcus faecium* endocarditis and Biofilm Formation. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 2, p. 189–195, 2016.

PAGANELLI, F. L.; WILLEMS, R. J.; LEAVIS, H. L. Optimizing future treatment of enterococcal infections: attacking the biofilm? **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 40–49, 2012.

PALMER, K. L.; KOS, V. N.; GILMORE, M. S. Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 632–639, 2010.

PANESSO, D. *et al.* The *hylEfm* gene in pHylEfm of *Enterococcus faecium* is not required in pathogenesis of murine peritonitis. **BMC Microbiology**, v. 11, p. 20, 2011.

PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS, M. *et al.* Risk factors for enterococcal infection and colonization by vancomycin-resistant enterococci in critically ill patients. **Infection**, v. 42, n. 6, p. 1013–1022, 2014.

PARK, S. Y. *et al.* Immune evasion of *Enterococcus faecalis* by an extracellular gelatinase that cleaves C3 and iC3b. **Journal of immunology**, v. 181, n. 9, p. 6328–6336, 2008.

PASTERNAK, J. Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. **einstein**, v. 10316, n. 1311, p. 118–9, 2012.

- PEEL, T. *et al.* Differing risk factors for vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive enterococcal bacteraemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 4, p. 388–394, 2012.
- PINKSTON, K. L. *et al.* The Fsr quorum-sensing system of *Enterococcus faecalis* modulates surface display of the collagen-binding MSCRAMM Ace through regulation of *gelE*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 17, p. 4317–4325, 2011.
- PINTO, T. C. A. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Brazil, with description of five novel mutations in the ATPC gene. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 10, p. 3242–2013.
- PORTILLO, A. *et al.* Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 4, p. 967–971, 2000.
- QIN, X. *et al.* Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2579–2586, 2000.
- RAKITA, R. M. *et al.* *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 11, p. 6067–6075, 1999.
- RAVEN, K. E. *et al.* A decade of genomic history for healthcare-associated *Enterococcus faecium* in the United Kingdom and Ireland. **Genome Research**, v. 26, n. 10, p. 1388–1396, 2016.
- RICE, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 8, p. 1079–1081, 2008.
- RIGOTTIER-GOIS, L. *et al.* The surface rhamnopolysaccharide epa of *Enterococcus faecalis* is a key determinant of intestinal colonization. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 1, p. 62–71, 2015.
- ROZDZINSKI, E. *et al.* Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. **Microbial Pathogenesis**, v. 30, n. 4, p. 211–220, 2001.
- RUDRIK, J. T. *et al.* Safety and accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to identify highly pathogenic organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 3513–3129, 2017.
- RUIZ-GARBAJOSA, P. *et al.* Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2220–2228, 2006.
- SABIA, C. *et al.* Detection of bacteriocin production and virulence traits in vancomycin-resistant enterococci of different sources. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 4, p. 970–979, 2008.
- SACRAMENTO, A. G. *et al.* Environmental dissemination of *vanA*-containing *Enterococcus faecium* strains belonging to hospital-associated clonal lineages. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 1, p. 264–266, 2016.

- SACRAMENTO, A. G. *et al.* Changed epidemiology during intra and interhospital spread of high-risk clones of *vanA*-containing *Enterococcus* in Brazilian hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 88, n. 4, p. 348–351, 2017.
- SALGADO, C. D. The risk of developing a vancomycin-resistant *Enterococcus* bloodstream infection for colonized patients. **American Journal of Infection Control**, v. 36, n. 10, p. S175.e5-S175.e8, 2008.
- SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–8, 2016.
- SANTOS, B. A. *et al.* Major globally disseminated clonal complexes of antimicrobial resistant enterococci associated with infections in cancer patients in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 55, n. August, p. 56–62, 2017.
- SARTINGEN, S. *et al.* Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells in vitro. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 10, p. 6044–6047, 2000.
- SAVA, I. G.; HEIKENS, E.; HUEBNER, J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. **Clinical microbiology and infection**, v. 16, n. 6, p. 533–40, 2010.
- SCHLEIFER, K. H.; KILPPER-BALZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, n. 1, p. 31–34, 1984.
- SCHLIEVERT, P. M. *et al.* Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 1, p. 218–223, 1998.
- SEGARRA, R. A. *et al.* Molecular characterization of the *Enterococcus faecalis* cytolysin activator. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 4, p. 1239–1246, 1991.
- SEMEDO, T. *et al.* Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2569–2576, 2003.
- SHANKAR, N. *et al.* Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 7, p. 4366–4372, 2001.
- SHANKAR, N.; BAGHDAYAN, A. S.; GILMORE, M. S. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Nature**, v. 417, n. 6890, p. 746–750, 2002.
- SHANKAR, V. *et al.* Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 193–200, 1999.
- SHARIFI, Y. *et al.* Virulence and antimicrobial resistance in enterococci isolated from urinary tract infections. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 3, n. 1, p. 197–201, 2013.

- SHERMAN, J. M. The streptococci. **Bacteriological reviews**, v. 1, n. 1, p. 3–97, 1937.
- SHOKOOHIZADEH, L. *et al.* Antimicrobial resistance patterns and virulence factors of enterococci isolates in hospitalized burn patients. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 1, p. 1, 2018.
- SIEVERT, D. M. *et al.* Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 34, n. 01, p. 1–14, 2013.
- SIFRI, C. D. *et al.* Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 10, p. 5647–5650, 2002.
- SILVEIRA, E. *et al.* Co-transfer of resistance to high concentrations of copper and first-line antibiotics among *Enterococcus* from different origins (humans, animals, the environment and foods) and clonal lineages. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 4, p. 899–906, 2014.
- SINGH, K. V. *et al.* *fsr*-independent production of protease(s) may explain the lack of attenuation of an *Enterococcus faecalis* *fsr* mutant versus a *gelE-sprE* mutant in induction of endocarditis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 8, p. 4888–4894, 2005.
- SINGH, K. V. *et al.* Importance of the collagen adhesin ace in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 1, p. e1000716, 2010.
- SINGH, K. V.; MURRAY, B. E. Differences in the *Enterococcus faecalis* *Isa* locus that influence susceptibility to quinupristin-dalfopristin and clindamycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 32–39, 2005.
- SINGH, K. V. *et al.* Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. **The Journal of infectious diseases**, v. 178, n. 5, p. 1416–1420, 1998.
- SNYDER, G. M. *et al.* Detection of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci on the gowns and gloves of healthcare workers. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 07, p. 583–589, 2008.
- SOARES, R. O. *et al.* Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus spp.* clinical isolates. **Virulence**, v. 5, n. 5, p. 634–637, 2014.
- SOLHEIM, M. *et al.* Comparative genomics of *Enterococcus faecalis* from healthy Norwegian infants. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 194, 2009.
- STRATEVA, T. *et al.* Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. 127–133, 2016.
- SUITS, M. D. L. *et al.* Conformational analysis of the *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase and characterization of its hyaluronanspecific carbohydrate-binding module. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 39, p. 27264–27277, 2014.
- SUSSMUTH, S. D. *et al.* Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis,

and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 4900–4906, 2000.

SWAMINATHAN, S.; ALANGADEN, G. J. Treatment of resistant enterococcal urinary tract infections. **Current Infectious Disease Reports**, v. 12, n. 6, p. 455–465, 2010.

SYDNOR, E. R. M.; PERL, T. M. Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 141–173, 2011.

TEIXEIRA, L.M., CARVALHO, M. G., FACKLAM, R.R., SHEWMAKER, P.L. *Enterococcus*. In: JORGENSEN J.H., PFALLER M.A., CARROLL K.C., FUNKE G., LANDRY M.L., RICHTER S.S., WARNOCK D.W., (Org.). Manual of Clinical Microbiology. 11. ed. Washington DC, EUA, **American Society for Microbiology Press**, p. 403-421, 2015.

TEIXEIRA, L. M. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of *Vagococcus fluvialis*, including strains isolated from human sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2778–2781, 1997.

TEIXEIRA, N. *et al.* The incongruent gelatinase genotype and phenotype in *Enterococcus faecalis* are due to shutting off the ability to respond to the gelatinase biosynthesis-activating pheromone (GBAP) quorum-sensing signal. **Microbiology**, v. 158, n. 2, p. 519–528, 2012.

TENDOLKAR, P. M. *et al.* Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 6032–6039, 2004.

TENG, F. *et al.* Evidence that the enterococcal polysaccharide antigen gene (*epa*) cluster is widespread in *Enterococcus faecalis* and influences resistance to phagocytic killing of *E. faecalis*. **Infection and immunity**, v. 70, n. 4, p. 2010–2015, 2002.

TENOVER, F. C. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233–2239, 1995.

THEILACKER, C. *et al.* Glycolipids are involved in biofilm accumulation and prolonged bacteraemia in *Enterococcus faecalis*. **Molecular Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1055–1069, 2009.

THIERCELIN, M. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogen. **Comptes rendus des seances de la societe de biologie**, v. 5, p. 269–271, 1899.

THOMAS, V. C. *et al.* A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. **Molecular Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 1022–1036, 2009.

THURLLOW, L. R. *et al.* Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 11, p. 4936–4943, 2010.

THURLLOW, L. R.; THOMAS, V. C.; HANCOCK, L. E. Capsular polysaccharide production in *Enterococcus faecalis* and contribution of CpsF to capsule

- serospecificity. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 20, p. 6203–6210, 2009.
- TOP, J. *et al.* The *Enterococcus faecium* enterococcal biofilm regulator, *ebrB*, regulates the *esp* operon and is implicated in biofilm formation and intestinal colonization. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e65224, 2013.
- TOP, J.; WILLEMS, R.; BONTEN, M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: From commensal to hospital-adapted pathogen. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 297–308, 2008.
- TREMBLAY, C. L. *et al.* Characterization of hospital-associated lineages of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* from clinical cases in dogs and humans. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. AUG, p. 245, 2013.
- VAN SCHAİK, W. *et al.* Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 239, 2010.
- VAN TYNE, D.; GILMORE, M. S. Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. **Annual Review of Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 337–356, 2014.
- VAN TYNE, D.; MARTIN, M. J.; GILMORE, M. S. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. **Toxins**, v. 5, n. 5, p. 895–911, 2013.
- VANKERCKHOVEN, V. *et al.* Development of a multiplex PCR for the detection of *asal*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among european hospital isolates of *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4473–4479, 2004.
- VANKERCKHOVEN, V. *et al.* Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 14, p. 4247–4255, 2008.
- VERGIS, E. N. *et al.* Determinants of vancomycin resistance and mortality rates in enterococcal bacteremia. A prospective multicenter study. **Annals of Internal Medicine**, v. 135, n. 7, p. 484–492, 2001.
- VERGIS, E. N. *et al.* Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 5, p. 570–575, 2002.
- VYDRA, J. *et al.* Enterococcal bacteremia is associated with increased risk of mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 6, p. 764–770, 2012.
- WANG, X.; HUYCKE, M. M. Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* promotes chromosomal instability in mammalian cells. **Gastroenterology**, v. 132, n. 2, p. 551–561, 2007.
- WARDAL, E. *et al.* Abundance and diversity of plasmid-associated genes among clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. **Plasmid**, v. 70, n. 3, p. 329–342, 2013.
- WARDAL, E.; SADOWY, E.; HRYNIEWICZ, W. Complex nature of enterococcal

pheromone-responsive plasmids. **Polish Journal of Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 79–87, 2010.

WATERS, C. M. *et al.* Role of the *Enterococcus faecalis* Ge1E protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 12, p. 3613–3623, 2003.

WATERS, C. M. *et al.* An amino-terminal domain of *Enterococcus faecalis* aggregation substance is required for aggregation, bacterial internalization by epithelial cells and binding to lipoteichoic acid. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1159–1171, 2004.

WATERS, C. M.; WELLS, C. L.; DUNNY, G. M. The aggregation domain of aggregation substance, not the RGD motifs, is critical for efficient internalization by HT-29 enterocytes. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 10, p. 5682–5689, 2003.

WELLS, C. L. *et al.* Inducible expression of *Enterococcus faecalis* aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 12, p. 7190–7194, 2000.

WELLS, C. L.; JECHOREK, R. P.; ERLANDSEN, S. L. Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. **Journal of Infectious Diseases**, v. 162, n. 1, p. 82–90, 1990.

WERNER, G. *et al.* Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from a German intensive care unit patient. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. 1182–1183, 2008.

WILLEMS, R. J. L. *et al.* Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 821–828, 2005.

WILLEMS, R. J. L. *et al.* Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. **Lancet**, v. 357, n. 9259, p. 853–855, 2001.

WILLEMS, R. J. L. *et al.* Restricted gene flow among hospital subpopulations of *Enterococcus faecium*. **mBio**, v. 3, n. 4, p. e00151-12-e00151-12, 2012.

WILLEMS, R. J.; VAN SCHAİK, W. Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. **Future Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1125–1135, nov. 2009.

WILLEY, J. M.; VAN DER DONK, W. A. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 477–501, 2007.

WINSLOW, C.-E. A.; WINSLOW, A. (ROGERS). **The systematic relationships of the Coccaceae, with a discussion of the principles of bacterial classification**, 1st ed. ed. New York: J. Wiley, 1908.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Drug resistance**. Disponível em: <[http://www.who.int/drugresistance/AMR\\_Importance/en/](http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/en/)>. Acesso em: 31 maio. 2018.

WURSTER, J. I.; SAAVEDRA, J. T.; GILMORE, M. S. Impact of antibiotic use on the

evolution of *Enterococcus faecium*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 12, p. 1862–1865, 2016.

YANG, J. X. *et al.* Molecular characterization of resistance, virulence and clonality in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*: A hospital-based study in Beijing, China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 33, p. 253–260, 2015.

YASUFUKU, T. *et al.* Mechanisms of and risk factors for fluoroquinolone resistance in clinical *Enterococcus faecalis* isolates from patients with urinary tract infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 11, p. 3912–3916, 2011.

ZACHARIOUDAKIS, I. M. *et al.* Vancomycin-resistant enterococci colonization among dialysis patients: A meta-analysis of prevalence, risk factors, and significance. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 65, n. 1, p. 88–97, 2014.

ZENG, J.; TENG, F.; MURRAY, B. E. Gelatinase is important for translocation of *Enterococcus faecalis* across polarized human enterocyte-like T84 cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 3, p. 1606–1612, 2005.

ZHANEL, G. G. *et al.* Antimicrobial susceptibility of 22746 pathogens from canadian hospitals: results of the CANWARD 2007-11 study. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 68 Suppl 1, n. suppl 1, p. 7–22, 2013.

ZHANEL, G. G.; HOBAN, D. J.; KARLOWSKY, J. A. Nitrofurantoin is active against vancomycin-resistant enterococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 324–326, 2001.

ZHANG, X. *et al.* Identification of a genetic determinant in clinical *Enterococcus faecium* strains that contributes to intestinal colonization during antibiotic treatment. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 11, p. 1780–1786, 2013.

ZHENG, J. X. *et al.* Characteristics of and virulence factors associated with biofilm formation in clinical *Enterococcus faecalis* isolates in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. NOV, p. 2338, 2017.

ZIAKAS, P. D. *et al.* Trends and significance of VRE colonization in the ICU: A meta-analysis of published studies. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e75658, 2013.