



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização molecular de isolados ambientais de
Enterococcus faecalis e *Enterococcus faecium***

Lucas David Rodrigues dos Santos

**Ribeirão Preto
2021**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**Título: Caracterização molecular de isolados ambientais de
Enterococcus faecalis e *Enterococcus faecium***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia

Orientado: Lucas David Rodrigues dos Santos

Orientador: Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto em 25/06/2021. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2021

LOMBADA

SANTOS, L.D.R.	Caracterização molecular de isolados ambientais de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Enterococcus faecium</i>	Espaço de 2,5 cm reservado para etiqueta de localização da biblioteca	MESTRADO FCFRPUSP 2021
-------------------	---	---	--------------------------------------

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Rodrigues dos Santos, Lucas David

Caracterização molecular de isolados ambientais de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. Ribeirão Preto, 2021.
48p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia
Orientador: Stehling, Eliana Guedes.

1. *Enterococcus faecium* 2. *Enterococcus faecalis* 3. Resistência aos antimicrobianos 4. Virulência 5. Meio ambiente

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lucas David Rodrigues dos Santos

Caracterização molecular de isolados ambientais de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus maiores tesouros, à minha avó Divina e ao meu avô Santos (*in memoriam*), que foram os pilares para um dia eu acreditar que “educação” é direito de todos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus, por ser a força que me trouxe até aqui, por ser meu amigo, meu bom pastor, pai e salvador.

De uma forma muito especial, quero agradecer à minha avó Divina, pelo exemplo de garra e força. Por acreditar em mim e nunca me deixar esquecer o valor de um sonho.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling, pela oportunidade, confiança e auxílio. Pelo exemplo profissional e de ser humano, por sempre me motivar e me fazer acreditar que tudo é possível... da maneira mais verdadeira: fazendo.

Agradeço ao João Pedro Rueda Furlan, por todo o apoio durante o mestrado, ao qual nunca hesitou em estender a mão amiga.

Agradeço aos meus parceiros, amigos e irmãos de laboratório, Micaela, Rafael e Ralf, por todos os momentos especiais que passamos juntos nesse período.

Agradeço à técnica do laboratório e amiga, Inara Fernanda, por todos os ensinamentos, os quais foram fundamentais no meu processo de formação.

Agradeço aos meus pais, Sheyla, Charley e Alessandra e a todos os meus familiares, por todo apoio, suporte e noites de orações.

Agradeço à minha madrinha Leiliane e à minha tia Pê, por serem minha bússola e sempre me mostrarem que ainda vale a pena ter fé e acreditar.

Agradeço de uma forma muito carinhosa aos meus amigos (as) Luciana, Dhára, Júlia, Hevellin, Bruno e Victor, aos quais eu tive a honra de conhecer em Ribeirão Preto- SP, onde construímos o mais puro sentimento, tornando, assim, a minha caminhada mais leve.

Agradeço ao meu professor e orientador da graduação, Flávio Júnior Barbosa Figueiredo, por sempre me motivar e ser responsável pela minha iniciação na vida acadêmica.

À Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, Ribeirão Preto) por ter fornecido parte das amostras de água utilizadas neste estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Por fim, quero agradecer a todos que de alguma forma participaram no desenvolvimento desse estudo.

*“Era como se tudo que eu acreditasse fosse algo de mim
É um sentimento de expandir e fazer parte do mundo
É como se eu fosse uma nuvem e me movesse com as estações”*

Lucas Santos

RESUMO

SANTOS, L.D.R. **Caracterização molecular de isolados ambientais de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium***. 2021. 48f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

As bactérias do gênero *Enterococcus* são cocos Gram-positivos pertencentes à microbiota de humanos e de animais e amplamente distribuídos na natureza. Diversas espécies pertencentes a esse gênero já foram descritas na literatura, sendo *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* as mais importantes, visto que são comumente reportadas em infecções em humanos e animais. Diferentes genes de resistência aos antimicrobianos já foram relatados nos *Enterococcus* sp., sendo os genes de resistência à vancomicina e às oxazolidinonas os de maior importância clínica. O objetivo do presente estudo foi isolar e caracterizar isolados ambientais de *E. faecium* e *E. faecalis* quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos e detectar os genes de resistência e de virulência dos mesmos. Um total de 54 isolados foram obtidos de amostras de solo e de água coletadas em diferentes cidades localizadas na região sudeste do Brasil. Dentre esses isolados, 43 foram identificados como *E. faecium* e 11 como *E. faecalis*. Todos os isolados apresentaram resistência a pelo menos quatro antimicrobianos, sendo a grande maioria resistente à eritromicina e 49 deles (90,7%) foram classificados como multirresistentes. Diferentes genes de resistência aos antimicrobianos foram detectados, sendo que os genes *tetM*, *tetL* e *ermB* foram os mais prevalentes. Outros genes clinicamente relevantes também foram detectados, tais como *vanC1*, *tetO*, *ermA*, *ermC*, *mefAE*, *ant(6')-Ia*, *ant(4')-Ia*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *aph(2'')-Id*. Dentre os genes de virulência, o gene *gelE* foi o mais prevalente, seguido dos genes *ace*, *esp* e *asa1*. *Enterococcus* sp. resistentes aos antimicrobianos e carreando diferentes genes de resistência e de virulência em amostras ambientais, sugerem uma possível transmissão desses patógenos, bem como seus genes entre o ambiente, os humanos e os animais.

Palavras-chave: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, resistência aos antimicrobianos, virulência, meio ambiente

ABSTRACT

SANTOS, L.D.R. **Molecular characterization of environmental isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium***. 2021. 48f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Bacteria belonging of the genus *Enterococcus* are Gram-positive cocci belonging to the microbiota of humans and animals and widely distributed in nature. Several species belonging to this genus have already been described in the literature, being *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* the most important, since they are commonly reported in infections in humans and animals. Different antimicrobial resistance genes have already been reported in *Enterococcus* spp., being resistance genes for vancomycin and oxazolidinones the most important. The aim of the present study was to isolate and characterize environmental isolates of *E. faecium* and *E. faecalis* regarding the antimicrobial resistance profile and to detect their resistance and virulence genes. A total of 54 isolates were obtained from soil and water samples collected in different cities located in the southeastern region of Brazil. Among these isolates, 43 were identified as *E. faecium* and 11 as *E. faecalis*. These isolates were resistant to at least four antimicrobials, the vast majority being resistant to erythromycin and 49 (90.7%) were classified as multidrug-resistant. Different antimicrobial resistance genes were detected, with the *tetM*, *tetL* and *ermB* genes being the most prevalent. Other clinically relevant genes have also been detected, such as *vanC1*, *tetO*, *ermA*, *ermC*, *mefAE*, *ant (6') - Ia*, *ant (4') - Ia*, *aac (6') - Ia-aph (2') - Ia*, *aph (3') - IIIa*, *aph (2') - Id*. Among the virulence genes, the *gelE* gene was the most prevalent, followed by the *ace*, *esp* and *asa1* genes. *Enterococcus* sp. resistant to antimicrobials and harboring different resistance and virulence genes suggest a possible transmission of these pathogens, as well as their genes between the environment, humans and animals.

Keywords: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, resistance to antimicrobials, virulence, environment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização das cidades em que foram coletadas as amostras de água e de solo. .	16
Figura 2 – Fonte de isolamento dos <i>Enterococcus</i> (a) Isolados obtidos de solo. (b) Isolados obtidos de água.	21
Figura 3 - Quantidade de isolados de <i>Enterococcus</i> sp. por ponto amostral (a) Isolados obtidos de água. (b) Isolados obtidos de solo.....	22
Figura 4 - Perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados de <i>Enterococcus</i> sp.....	25
Figura 5 – Porcentagens dos genes de resistência aos antimicrobianos nos isolados de <i>Enterococcus</i> sp.....	26
Figura 6 - Detecção dos genes de virulência em isolados em isolados de <i>Enterococcus</i> sp...	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais genes e mecanismos de resistência aos antimicrobianos descritos em <i>Enterococcus</i> sp.....	11
Tabela 2 - <i>Primers</i> utilizados na identificação dos isolados de <i>Enterococcus</i> sp.	18
Tabela 3 - <i>Primers</i> utilizados para a pesquisa dos genes resistência aos antimicrobianos	19
Tabela 4 - <i>Primers</i> utilizados para detecção dos genes de virulência	20
Tabela 5 - Isolados de <i>Enterococcus</i> sp. obtidos de acordo com a fonte, cidade e estado.....	23
Tabela 6 – Perfil de resistência dos <i>Enterococcus</i> sp. às classes de antimicrobianos.....	24
Tabela 7 - Isolados de <i>Enterococcus</i> sp. de acordo com o perfil de resistência aos antimicrobianos e genes encontrados.	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERV	<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina
EUA	Estados Unidos da América
F	<i>Forward</i>
FUNDHERP	Fundação do Hemocentro de Ribeirão Preto -SP
KEA	<i>Kanamycin Aesculin Azide</i>
MDR	<i>Multidrug-resistant</i>
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
Min	Minuto (s)
NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
R	<i>Reverse</i>
RBB	Rompimento da barragem em Brumadinho
TAE	Tris Acetado EDTA
UFC	Unidade formada de colônia
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
g	Gramma
L	Litro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mL	Mililitro
M	Molar
n°	Número
nm	Nanômetro
%	Porcento
™	Trademark

SUMÁRIO

ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
LISTA DE SÍMBOLOS	vi
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 <i>Enterococcus</i> spp.....	2
1.1.1 <i>Enterococcus faecalis</i>	3
1.1.2 <i>Enterococcus faecium</i>	4
1.2 <i>Enterococcus</i> sp. no meio ambiente	4
1.3 Resistência aos antimicrobianos.....	5
1.3.1 β -lactâmicos.....	6
1.3.2 Glicopeptídeos.....	6
1.3.3 Macrolídeos	7
1.3.4 Tetraciclina	7
1.3.5 Fluorquinolonas.....	8
1.3.6 Aminoglicosídeos.....	8
1.3.7 Oxazolidinonas	9
1.4 Mecanismos de virulência	12
2 JUSTIFICATIVA	14
3 OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo geral.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4 MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 Obtenção das amostras ambientais	16
4.2 Isolamento bacteriano.....	16
4.3 Identificação molecular dos isolados bacterianos.....	17
4.4 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	18
4.5 Pesquisa dos genes de resistência aos antimicrobianos	19
4.6 Pesquisa dos genes de virulência.....	20
5 RESULTADOS	21
5.1 Isolados de <i>Enterococcus</i> sp.....	21
5.2 Perfil de resistência aos antimicrobianos.....	24
5.3 Detecção dos genes de resistência aos antimicrobianos	25
5.4 Detecção dos determinantes de virulência.....	26
6 DISCUSSÃO	30
7 CONCLUSÕES	35
8 REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Enterococcus* spp.

As bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* foram descritas pela primeira vez em 1899, na França, pelo pesquisador Thiercelin, como um novo grupo de diplococos Gram-positivos, saprófitos e de origem intestinal (THIERCELIN & JOUHAUD, 1899). Após a sua descoberta, o termo “enterocoque” foi designado devido à sua morfologia e origem (MURRAY, 1990). Posteriormente, Thiercelin descreveu que esses microorganismos eram patogênicos para ratos e, possivelmente, poderiam causar infecções em seres humanos (THIERCELIN & JOUHAUD, 1899). Em um período próximo a essas descobertas, MacCallum e Hastings reportaram uma bactéria que inicialmente foi nomeada de *Micrococcus zymogenes* e, posteriormente, reclassificada como *Enterococcus faecalis*, tendo sido isolada de um ser humano com um grave quadro de endocardite (MACCALLUM & HASTINGS, 1899). Devido ao frequente isolamento dessa espécie em outros pacientes, a mesma foi inicialmente descrita como “*very hardy and tenacious of life*” (MACCALLUM & HASTINGS, 1899).

Após a sua descoberta, os diplococos foram incluídos dentro do gênero *Streptococcus*, e em 1906, o nome *Streptococcus faecalis* foi utilizado pelos pesquisadores Andrewes e Horder para caracterizar e indicar uma espécie de origem intestinal em seres humanos. Além disso, foi observado que essa espécie bacteriana coagulava o leite, fermentava o manitol e a lactose, mas não fermentava a rafinose (ANDREWES & HORDER, 1906). Em seguida, o pesquisador Orla-Jensen fez a primeira descrição de que os *Streptococcus faecium* se diferenciavam dos *Streptococcus faecalis* devido aos seus padrões de fermentação (ORLA-JENSEN, 1919). Após essas descobertas, outras espécies foram sendo reportadas por diversos pesquisadores, entre elas, *Streptococcus durans*, *Streptococcus avium* e *Streptococcus casseliflavus* (LEBRETON *et al.*, 2014).

Em 1970, devido às características dos arranjos celulares e diferenças fenotípicas, foi proposta a criação do gênero *Enterococcus* (KALINA, 1970); entretanto, essa denominação não foi inicialmente aceita por outros pesquisadores. Posteriormente, em 1984, os pesquisadores Schleifer e Kilpper-Balz demonstraram diferenças genéticas que evidenciaram que os *Streptococcus faecium* e *Streptococcus faecalis* se divergiam em comparação com outras bactérias do gênero *Streptococcus*, considerando-as como um novo gênero denominado *Enterococcus* (SCHLEIFER & KILPPER-BALZ, 1984).

Atualmente, as espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* são descritas como cocos Gram-positivos dispostos em pares ou cadeias, são anaeróbias facultativas, e podem crescer em ambientes escassos de nutrientes e em temperaturas variando entre 10 e 45 °C, sendo 35 °C a temperatura ideal para o seu crescimento (PRIETRO *et al.*, 2016). Além disso, essas bactérias crescem em meios de cultura contendo 6,5 % de cloreto de sódio e hidrolisam a esculina na presença de sais biliares (MURRAY, 1990; FACKLAM *et al.*, 2002). Os *Enterococcus* spp. fazem parte da microbiota gastrointestinal de humanos e de animais, entretanto, podem atuar como patógenos oportunistas, causando diversos tipos de infecções, principalmente em pacientes imunocomprometidos, sendo *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* as espécies mais relatadas (PIETRO *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2019).

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou os *Enterococcus* spp. entre os patógenos de alta importância devido ao elevado nível de resistência aos antimicrobianos, estando entre as 12 bactérias que representam maior risco à saúde humana (OMS, 2017). Corroborando com essa classificação, alguns estudos conduzidos nos Estados Unidos descreveram que bactérias do gênero *Enterococcus* atuam como um dos patógenos mais isolados em infecções no trato urinário, pelve e sistema nervoso central, sendo a terceira causa mais comum de infecções bacterianas no âmbito hospitalar (CETINKAYA *et al.*, 2000; MARRA *et al.*, 2011; CHOI & WOO, 2015).

1.1.1 *Enterococcus faecalis*

Os isolados de *E. faecalis* têm emergido como um dos principais patógenos nosocomiais, apresentando resistência a praticamente todos os antimicrobianos disponíveis para o tratamento (ZAHEER *et al.*, 2020). As infecções ocasionadas por esse patógeno são mais comumente reportadas que aquelas causadas pelas demais espécies do gênero *Enterococcus* (LEBRETON *et al.*, 2014). Essa espécie é responsável por diversos tipos de infecções em seres humanos, principalmente infecções do trato urinário e bacteremia, sendo a terceira causa mais comum de endocardite em infecções hospitalares, as quais representam aproximadamente 14 % dos casos publicados (PRIETO *et al.*, 2016; FERNÁNDEZ & VERGÉ, 2019; NAHA *et al.*, 2020). Diferentes clones de *E. faecalis* estão associados aos surtos hospitalares em todo mundo, sendo os complexos clonais (CC) 2, 8, 9, 16 e 87 os mais frequentemente reportados (KUCH *et al.*, 2012; PRIETO *et al.*, 2016).

1.1.2 *Enterococcus faecium*

Os *E. faecium* emergiram como uns dos principais patógenos associados a infecções hospitalares, sendo considerado um grande problema de saúde pública em esfera global (GAO *et al.*, 2018). A sua elevada relevância na clínica médica está diretamente relacionada ao seu amplo perfil de resistência intrínseca e adquirida, podendo apresentar resistência a diferentes classes de antimicrobianos, tais como aos aminoglicosídeos, cefalosporinas e macrolídeos (MARKWART *et al.*, 2019). Nos anos 90, aproximadamente 90 % das infecções enterocócicas eram causadas por *E. faecalis*, enquanto apenas 5 % eram relacionadas aos *E. faecium* (MURRAY, 1990). Entretanto, nos últimos anos, o isolamento de *E. faecium* aumentou significativamente, sendo atualmente responsável por cerca de 35 % das infecções enterocócicas (HENDRICKX *et al.*, 2013; GOLOB *et al.*, 2019). Esse aumento, coincidentemente, foi relacionado com o surgimento de isolados que apresentavam resistência à ampicilina e à vancomicina, além de altos níveis de resistência aos aminoglicosídeos (HLAR) (ZHONG *et al.*, 2019).

O crescente isolamento de *E. faecium* em infecções hospitalares tem evidenciado uma evolução e uma rápida adaptação dessa espécie (LEE *et al.*, 2019). Diferentes estudos demonstraram que isolados de *E. faecium* que colonizam indivíduos hospitalizados diferem geneticamente de isolados que colonizam o sistema gastrointestinal de indivíduos saudáveis (NALLAPAREDDY *et al.*, 2003; LEAVIS *et al.*, 2007). Essas descobertas foram reportadas pelo pesquisador Willems no início do ano de 1999, onde foi evidenciado, pela primeira vez, as diferenças genéticas entre os isolados de *E. faecium* obtidos de diferentes fontes (WILLEMS, 1999; GALLOWAY-PEÑA *et al.*, 2012; LEBRETON *et al.*, 2013).

1.2 *Enterococcus* spp. no meio ambiente

Devido a sua ampla distribuição e abundância nas fezes de seres humanos e de animais, os *Enterococcus* estão sendo cada vez mais reportados no meio ambiente (GARCÍA-SOLACHE & RICE, 2019). Os ambientes aquáticos, destinados ou não para fins de recreação, podem conter micro-organismos patogênicos, incluindo bactérias oriundas de efluentes não tratados e águas de drenagem urbana contendo fezes de seres humanos e de animais, ocasionando infecções de pele, gastroenterites, doenças respiratórias e parasitárias (BOEHM & SASSOUBRE, 2014; GARCÍA-SOLACHE & RICE, 2019). Portanto, as águas

superficiais podem ser um importante veículo para a transmissão de doenças devido ao elevado número de micro-organismos presentes. Assim, o risco à saúde está relacionado ao tipo de patógeno presente e à concentração do mesmo (RODRIGUES & CUNHA, 2017). Alguns estudos demonstraram uma correlação entre o risco de doenças gastrointestinais, respiratórias e de pele com a elevada concentração de *Enterococcus* durante atividades recreativas (HALLER *et al.*, 2009).

Além disso, os *Enterococcus* têm sido reportados em amostras de solo e de sedimentos, demonstrando um grande potencial de disseminação destas espécies (ROTHENHEBER & JONES, 2018). Alguns fatores contribuem para a presença e dispersão dos *Enterococcus* no meio ambiente, tais como a capacidade de sobreviver em ambientes com elevado teor sal e altas temperaturas (RODRIGUES & CUNHA, 2017; GARCÍA-SOLACHE & RICE, 2019). Os *Enterococcus* também podem sobreviver em ambientes contendo compostos estressores, tais como desinfetantes (por exemplo, cloro e monocloramina) (HEALTH CANADA, 2019)

1.3 Resistência aos antimicrobianos

Os *Enterococcus* spp. são intrinsecamente resistentes a diferentes classes de antimicrobianos, além de muitas vezes abrigarem genes de resistência adquiridos, tornando, assim, infecções por essas bactérias mais difíceis de serem tratadas. Segundo Arias e Murray (2012), os *Enterococcus* spp., destacando *E. faecalis* e *E. faecium*, apresentam capacidade de desenvolver resistência a todos os antimicrobianos preconizados para o seu tratamento, e a aquisição de genes de resistência ocorre, principalmente, via plasmídeos conjugativos. Assim, a resistência aos antimicrobianos nessas bactérias não se limita apenas aos isolados clínicos, visto que eles possuem elevada capacidade de trocar informações genéticas com outras bactérias comensais ou presentes no ambiente, o que torna importante o conhecimento dos seus principais mecanismos de resistência intrínseca e adquirida as diferentes classes de antimicrobianos, como aos β -lactâmicos, glicopeptídeos, macrolídeos, tetraciclina, fluorquinolonas, aminoglicosídeos e oxazolidinonas (GUERRERO-RAMOS *et al.*, 2016; GOTKOWSKA-PLACHTA, 2021).

1.3.1 β -lactâmicos

Os β -lactâmicos são antimicrobianos bactericidas que atuam inibindo a síntese do peptídeoglicano, se ligando e inativando as proteínas ligadoras de penicilina (PBP) (SHEPARD & GILMORE, 2002). Os *Enterococcus* apresentam um baixo nível de resistência a algumas penicilinas e um maior nível de resistência para às cefalosporinas devido às proteínas ligadoras de penicilina de baixa afinidade (PBP4 em *E. faecalis* e PBP5 em *E. faecium*) (KRISTICH *et al.*, 2014; GAGETTI *et al.*, 2019). O alto nível de resistência à ampicilina (MIC > 128 $\mu\text{g/mL}$) foi inicialmente associado à hiperexpressão do gene *pbp5*, no entanto, estudos posteriores evidenciaram que muitos isolados clínicos não apresentaram diferenças na expressão deste gene, sendo atribuído esse alto nível de resistência às mutações ocorridas na formação da proteína PBP (RICE *et al.*, 2004; MILLER *et al.*, 2014).

Adicionalmente, a produção da β -lactamase codificada pelo gene *blaZ*, que é comumente reportado em isolados de *Staphylococcus aureus*, é um outro mecanismo de resistência observado em isolados de *Enterococcus* sp., entretanto, esse mecanismo é pouco reportado (ALIPOUR *et al.*, 2021). Apesar da resistência dos *Enterococcus* spp. às penicilinas, a ampicilina continua sendo o antimicrobiano de primeira escolha no tratamento de infecções causadas por *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina (Tabela 1) (GAGETTI *et al.*, 2019).

1.3.2 Glicopeptídeos

A vancomicina é um glicopeptídeo que apresenta efeito bactericida frente às bactérias Gram-positivas e não possui efeito sobre bactérias Gram-negativas (NAGARAJAN, 1991; RYBAK, 2006). O uso da vancomicina teve sua ascensão na década de 80, devido ao surgimento de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina e *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina (LEVINE, 2006). A vancomicina possui como mecanismo de ação a inibição da síntese da parede celular bacteriana (REYNOLDS, 1989). Esse antimicrobiano se liga fortemente a porção terminal D-Ala-D-Ala de um pentapeptídeo precursor do peptidoglicano, impedindo, assim, a etapa de transpeptidação (COUVARLIN, 2006).

Estudos sobre os mecanismos de resistência aos glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) descreveram diferentes genes de resistência, tais como *vanA*, *vanB*, *vanC*,

vanD, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* e *vanN* (Tabela 1) (CETINKAYA *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2019). Os genes *vanA*, *vanB* e *vanM* podem conferir altos níveis de resistência à vancomicina devido a modificação da porção D-Ala-D-Ala, a qual é alterada para D-Ala-D-Lac, reduzindo a afinidade de ligação à vancomicina em até 1000 vezes (LEE *et al.* 2019). Os outros genes (*vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanF*, *vanG*, *vanL* e *vanN*) conferem, na maioria das vezes, um baixo nível de resistência à vancomicina, por substituição da porção D-Ala-D-Ala por D-Ala-D-Ser (AHMED & BAPTISTE, 2018). A hiperexpressão do gene *vanA* tem sido correlacionada ao alto nível de resistência à vancomicina e à teicoplanina (DUTKAMALEN *et al.*, 1995).

1.3.3 Macrolídeos

Os macrolídeos são antimicrobianos amplamente utilizados no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas na clínica médica e veterinária (LUGOGO *et al.*, 2016). Esses antimicrobianos são heterosídeos que apresentam como mecanismo de ação a inibição da síntese proteica bacteriana, através da ligação à porção 23S rRNA da subunidade 50S do ribossomo. Os principais agentes desta classe são a eritromicina, a claritromicina e a azitromicina. Esses antimicrobianos constituem uma opção terapêutica para o tratamento das infecções enterocócicas, sendo a eritromicina o principal antimicrobiano utilizado para esse fim (PORTILLO *et al.*, 2000). O fenótipo de resistência conhecido como MLS_B (macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B) está amplamente distribuído nas espécies do gênero *Enterococcus* (MILLER *et al.*, 2016), o qual está intimamente relacionado com a presença dos genes *ermA*, *ermB* e *ermC*. Outros mecanismos, tais como modificações no 23S rRNA (*cfp-like*) e bombas de efluxo (*mef-like*), também são descritos nos *Enterococcus* (Tabela 1) (WEISBLUM, 1995; MILLER *et al.*, 2014).

1.3.4 Tetraciclina

As tetraciclina são antimicrobianos bacteriostáticos, apresentam baixa toxicidade, custo reduzido e amplo espectro de ação, podendo ter atividade frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (TIAN *et al.*, 2019). Esta classe apresenta como mecanismo de ação a inibição da síntese proteica bacteriana, impedindo a associação do aminoacil-tRNA com a subunidade 30S do ribossomo bacteriano (CHOPRA & ROBERTS, 2001). Devido ao

amplo espectro de ação das tetraciclinas, esses antimicrobianos tiveram a sua utilização de forma indiscriminada na clínica médica e veterinária, e consequentemente, a resistência a esses antimicrobianos está se tornando cada vez mais comum (CHOI & WOO, 2015). Alguns genes de resistência às tetraciclinas (*tet-like*) que codificam bombas de efluxos (*tetK*, *tetL*) e proteção ribossomoal (*tetM*, *tetO*, *tetS*), já foram descritos nos *Enterococcus* sp. (Tabela 1) (CHOPRA & ROBERTS, 2001; CHOI & WOO, 2015).

1.3.5 Fluorquinolonas

Desde 1980 as fluorquinolonas têm sido comumente utilizadas no tratamento de infecções bacterianas, especialmente para tratar infecções do trato urinário (ESFAHANI *et al.*, 2020). As fluorquinolonas são antimicrobianos que atuam inibindo a atividade da DNA girase e da topoisomerase, que são enzimas essenciais para a replicação do DNA (EL AMIN *et al.*, 1999). A resistência dos *Enterococcus* spp. às fluorquinolonas tem sido relacionada principalmente às mutações nos genes *gyrA* (subunidade da DNA girase) e/ou *parC* (subunidade da topoisomerase IV) (ESFAHANI *et al.*, 2020). Outros mecanismos de resistência às fluorquinolonas também já foram descritos em *Enterococcus* sp., tais como bombas de efluxo (*EmeA*) e proteção ribossomal (*Qnr-like*) (Tabela 1) (DE LASTOURS *et al.*, 2017; SHIADEH *et al.*, 2019). A emergência de isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* resistentes às fluorquinolonas tem sido reportada principalmente no âmbito hospitalar (ESFAHANI *et al.*, 2020). Recentemente, o alto nível de resistência à ciprofloxacina (HLCR) em isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* tem aumentado, o que é preocupante (KIM *et al.*, 2018). Apesar disso, as fluorquinolonas são antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções enterocócicas e podem ser utilizadas de modo sinérgico com a ampicilina para o tratamento de endocardites (ARIAS *et al.*, 2010).

1.3.6 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos possuem como mecanismo de ação a inibição da síntese proteica através da interação com a porção 16S rRNA da subunidade 30s dos ribossomos (ARYA, 2007). Os antimicrobianos pertencentes a essa classe apresentam efeitos bactericidas e são utilizados principalmente no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas (MURRAY, 1990). A utilização desta classe de antimicrobianos

no tratamento de infecções enterocócicas é limitada, uma vez que os *Enterococcus* spp. apresentam resistência intermediária aos aminoglicosídeos (CHOW, 2000). Os *Enterococcus* spp. são anaeróbicos facultativos e, por isso, limitam a ação de antimicrobianos que estejam relacionados às proteínas transportadoras de elétrons, resultando na diminuição do transporte e do nível intracelular do antimicrobiano (LEGGETT, 2017; DIAB *et al.*, 2019). Diante disso, a associação de um antimicrobiano que atua inibindo a parede celular e um aminoglicosídeo vem sendo utilizado para o tratamento de infecções enterocócicas (MILLER *et al.*, 2014; VAN HARTEN *et al.*, 2017).

Apesar dos *Enterococcus* spp. apresentarem resistência intermediária aos aminoglicosídeos, genes que codificam as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, tais como as *aph-like* (fosfotransferases), *aac-like* (acetiltransferases) e *ant-like* (nucleotidiltransferases) estão sendo cada vez mais reportados, os quais estão relacionados com o alto nível de resistência aos aminoglicosídeos (HLAR) (Tabela 1) (SHETE *et al.*, 2017). Dentre os genes que codificam as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos relacionados com o HLAR, o gene *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia* confere resistência a todos os aminoglicosídeos, exceto para a estreptomicina (CHOW, 2000). Adicionalmente, o gene *aph(3')-IIIa* confere resistência para a estreptomicina e a canamicina e são comumente reportados em *E. faecium* (SHETE *et al.*, 2017; DIAB *et al.*, 2019).

1.3.7 Oxazolidinonas

As oxazolidinonas são antimicrobianos bacteriostáticos e atuam na porção do 23 rRNA impedindo a ligação do tRNA aos ribossomos, dificultando, assim, o alongamento da cadeia polipeptídica e, conseqüentemente, a síntese proteica (SHINABARGER *et al.*, 1997). Dentre as oxazolidinonas, a linezolida é o antimicrobiano mais comumente utilizado para fins terapêuticos. Este antimicrobiano é totalmente sintético e vem sendo utilizado como uma opção terapêutica para o tratamento de infecções causadas por *Enterococcus* resistente à vancomicina (ERV) (DIEKEMA & JONES, 2001; MOELLERING, 2003; FLAMM *et al.*, 2016). A resistência dos *Enterococcus* sp. à linezolida pode ser mediada por mutações (G2576T, G2505A) no gene 23S rRNA ou mutações nos genes que codificam as proteínas ribossomais L3 e/ou L4 (BI *et al.*, 2018). Adicionalmente, novos genes mediados por plasmídeos, tais como *cfr*, *cfr(B)*, *cfr(C)*, *optrA* e *poxtA*, estão sendo descritos em espécies do gênero *Enterococcus* obtidas de diferentes fontes (Tabela 1) (EGAN *et al.*, 2020).

O gene *cfr* (*chloranphenicol-florfenicol resistance*) foi descrito pela primeira vez em isolados de *Staphylococcus sciuri* resistentes aos fenicóis (SCHWARZ *et al.*, 2010). Quando expresso, o gene *cfr* codifica uma metiltransferase, a qual promove uma metilação no gene 23 rRNA, inibindo, assim, as ligações e interações de vários antimicrobianos, tais como cloranfenicol, estreptogamina, lincosamida e linezolida (TOH *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2016). O gene *optrA* (*oxazolidinone phenicol transferable resistance*) foi descrito pela primeira vez em 2015 (WANG *et al.*, 2015) e confere resistência para a linezolida e a tedizolida, um novo antimicrobiano que pertence à classe das oxazolidinonas e que teve sua aprovação em 2014 pela Food and Drug Administration. A tedizolida vem sendo utilizada no tratamento de infecções bacterianas severas (LOCKE *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2019). O gene *poxA* codifica uma proteína semelhante a OptrA e confere resistência a diversos antimicrobianos através do mecanismo de proteção ribossômica (ANTONELLI *et al.*, 2018).

Tabela 1 - Principais genes e mecanismos de resistência aos antimicrobianos descritos em *Enterococcus* sp.

Classe	Genes	Mecanismos de resistência	Referência
β-lactâmicos	<i>blaZ</i>	Enzimático (penicilase rara)	MILLER <i>et al.</i> , 2014;
	<i>PBP4</i>	Proteína de ligação de penicilina de baixa afinidade (Especialmente <i>em E. faecalis</i>)	HOLLENBECK & RICE, 2012
	<i>PBP5</i>	Proteína de ligação de penicilina de baixa afinidade (Especialmente <i>em E. faecium</i>)	
Glicopeptídeos	<i>vanA, vanB, vanD, vanM</i>	Modificação no percussor D-ALA-Lac	MILLER <i>et al.</i> , 2014
	<i>vanC, vanE, vanG, vanL, vanN</i>	Modificação no percussor, D-ALA-D-Ser	AHMED & BAPTISTE, 2018
Macrolídeos	<i>erm-like</i>	Metilação nos ribossomos	MILLER <i>et al.</i> , 2014;
	<i>cfr-like</i>	Modificação no 23S rRNA	PORTILLO <i>et al.</i> , 2000
	<i>mef-like</i>	Bomba de efluxo	
Tetraciclínas	<i>tetM, tetO, tetS</i>	Proteção Ribossomal	MILLER <i>et al.</i> , 2014;
	<i>tetK, tetL</i>	Bomba de efluxo	CHOPRA & ROBERTS, 2001
Fluorquinolonas	<i>parC, parE</i>	Mutação no sítio de ação (topoisomerase IV)	MILLER <i>et al.</i> , 2014
	<i>gyrA, gyrB</i>	Mutação no sítio de ação (DNA girase)	
	<i>qnr-like</i>	Proteção do sítio de ação	
	<i>emeA</i>	Bomba de efluxo	
Fenicóis	<i>cfr-like</i>	Mutações no gene 23S rRNA	DESHPANDE <i>et al.</i> , 2018; WU <i>et al.</i> , 2019
Amonoglicosídeos	<i>aph-like</i>	Enzimático (fosfotransferase)	MILLER <i>et al.</i> , 2014;
	<i>aac-like</i>	Enzimático (acetiltransferase)	
	<i>ant-like</i>	Enzimático (nucleotidiltransferase)	
Oxazolidinona	<i>cfr-like</i>	Mutações no gene 23S rRNA	DESHPANDE <i>et al.</i> , 2018; WU <i>et al.</i> , 2019;
	<i>optrA, poxtA</i>	Codifica um transportador ABC	WANG <i>et al.</i> , 2015
	<i>L3, L4</i>	Mutações nas proteínas ribossômicas	

1.4 Mecanismos de virulência

Bactérias comensais podem atuar como patógenos oportunistas através da presença de diferentes fatores de virulência. Estes fatores podem estar relacionados com a capacidade de aderência às células do hospedeiro ou à capacidade de invasão aos tecidos (MILLER *et al* 2014). Os *Enterococcus* spp. não apresentam muitos determinantes de virulência como é observado em outras bactérias Gram-positivas. Entretanto, apresentam características importantes para o seu processo de patogenicidade. Dentre os principais fatores de virulência em *Enterococcus* spp., destacam-se as substâncias agregativas, a gelatinase, a citolisina e a glicosil-hidrolase (GARCÍA-SOLACHE & RICE, 2019).

As substâncias agregativas são caracterizadas como um grupo de proteínas de superfície da parede celular que são codificadas por genes plasmidiais, como por exemplo o *asal* (BIN-ASIF & ALI, 2019). Esses genes auxiliam no processo de conjugação e transferência de plasmídeos (KIRUTHIGA *et al.*, 2020). Além disso, o gene *asal* é um importante fator de virulência e também está relacionado com a formação de biofilme e agregação em células intestinais (ANDERSON *et al.*, 2016). A gelatinase, codificada pelo gene *gelE*, é uma protease que possui a capacidade de hidrolisar gelatina, colágeno, elastina, hemoglobina, glucagon e outros peptídeos para, assim, fornece nutrientes para a bactéria (ANDERSON *et al.*, 2016). Essa protease está intrinsecamente correlacionada aos mecanismos de patogenicidade destes micro-organismos, além de apresentarem efeito modulador, inibindo a resposta imune (GARCÍA-SOLACHE & RICE, 2019). A gelatinase está relacionada com as principais alterações patológicas no hospedeiro, como o rompimento da barreira da mucosa no processo de infecção intestinal (GOLÍŃSKA *et al.*, 2013).

A citolisina, codificada pelo gene *cyl*, é uma proteína capaz de promover a lise de células humanas e de animais, tais como macrófagos e neutrófilos, sendo um fator importante para a promoção da evasão do sistema imunológico (MILLER *et al.*, 2016). Os genes relacionados às citolisinas (*cylA*, *cylB*, *cylL*, *cylM* e *cylS*) são geralmente detectados em plasmídeos (VAN REENEN & DICKS, 2011). Esses genes podem ser letais para células eucariotas e procariotas, podendo ser encontrados em *Enterococcus*. isolados de animais e de alimentos (GILMORE *et al.*, 2013). A glicosil-hidrolase (Hyl) é uma proteína associada ao processo de invasão do tecido do hospedeiro e à colonização do trato gastrointestinal (MILLER *et al.*, 2016). Essa proteína é relacionada à degradação do ácido hialurônico que está presente em diversos sítios do corpo humano (BIN-ASIF & ALI, 2019).

Outros fatores de virulência, tais como as adesinas de colágeno (*Ace* e *Acm*), atuam nos primeiros estágios da infecção e são essenciais no reconhecimento do hospedeiro. Essas proteínas se ligam ao peptidoglicano facilitando a ligação à superfície e, conseqüentemente, o surgimento da infecção (ARIAS & MURRAY, 2012). A proteína *Ace* reconhece o colágeno na célula hospedeira, contribuindo com processo de infecção, uma vez que facilita o contato com as células alvos (GILMORE *et al.*, 2014). A proteína *Esp* é um fator de virulência que está envolvido na colonização e na formação de biofilme por linhagens de *E. faecium* e *E. faecalis*. Este é o gene de virulência mais difundido entre as linhagens de *E. faecium* pertencentes ao CC17 e associadas a infecções hospitalares (JOHANSON *et al.*, 2012; FERGUSON *et al.*, 2016).

2 JUSTIFICATIVA

Com a descoberta dos antimicrobianos houve uma revolução no tratamento de infecções por micro-organismos patogênicos. Entretanto, após esta descoberta, os cientistas perceberam que algumas espécies bacterianas não respondiam bem ao tratamento, levando, assim a uma resposta ineficiente. Desde as primeiras observações de bactérias resistentes, diversos estudos têm demonstrado a ocorrência de genes de resistência aos antimicrobianos em bactérias obtidas de diferentes fontes.

Por muito tempo se acreditou que os *Enterococcus* spp. não representavam risco à saúde humana por serem parte da sua microbiota residente. Entretanto, por motivos evolutivos e adaptativos, essas bactérias se consolidaram como um dos principais patógenos associados a infecções no âmbito hospitalar. A sua relação com o hospedeiro e o ambiente vem evoluindo, sendo possível a sua detecção em diversos ambientes.

Atualmente, o conceito *One Health* (saúde única) reforça a necessidade de integração entre a saúde humana, animal e do ambiente. Portanto, estudos conduzidos no sentido de conhecer o perfil fenotípico e genotípico de bactérias ambientais irá contribuir para o monitoramento desses patógenos e de seus genes de resistência aos antimicrobianos nessas três esferas. Assim, a inter-relação entre o meio ambiente com a saúde pública tem se tornado cada vez mais importante.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar molecularmente isolados ambientais de *E. faecalis* e *E. faecium* quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos, bem como a detecção de genes de resistência e de virulência clinicamente importantes.

3.2 Objetivos específicos

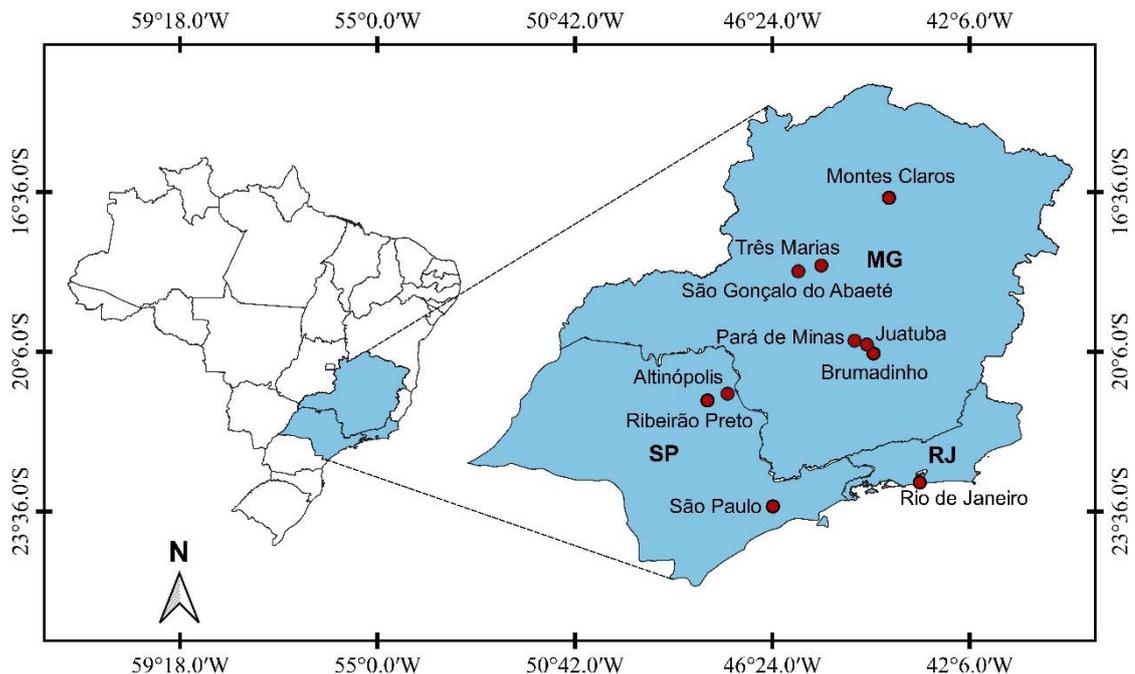
- Isolar *E. faecalis* e *E. faecium* de diferentes fontes de água e de amostras de solo.
- Determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.
- Pesquisar os genes adquiridos envolvidos na resistência aos antimicrobianos.
- Pesquisar os genes de virulência em todos os isolados ambientais obtidos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção das amostras ambientais

As amostras de solo e de água foram provenientes de praias, rios, zoológico, margens de córregos e rios, clube de recreação e do rompimento da barragem em Brumadinho-MG (RBB), ocorrido no ano de 2019. Esses pontos amostrais estavam situados em dez diferentes cidades (Altinópolis, Brumadinho, Juatuba, Montes Claros, Pará de Minas, Ribeirão Preto, Rio de Janeiro, São Gonçalo do Abaeté, São Paulo e Três Marias) localizadas em três estados pertencentes à região sudeste do Brasil (Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) (Figura 1). As amostras de água provenientes do estado de São Paulo foram cedidas pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, Ribeirão Preto).

Figura 1 - Localização das cidades em que foram coletadas as amostras de água e de solo.



4.2 Isolamento bacteriano

O isolamento bacteriano foi realizado a partir das amostras de solo e de água de acordo com a metodologia descrita por Mukherjee *et al.* (2011) e Zanetti *et al.* (2013), respectivamente. Para a obtenção dos isolados, 1 g de cada amostra de solo e 1 mL de cada

amostra de água foram transferidos para tubos de ensaio contendo 5 mL do caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid, Reino Unido) e incubados a 37 °C por até 24 horas. Adicionalmente, o ágar Kanamycin Aesculin Azide (KEA) foi preparado no laboratório. Para tanto, foi feita a pesagem da caseína (20 g), extrato de levedura (5 g), cloreto de sódio (5 g), citrato de sódio (1 g), esculina (1 g), citrato de ferro e amônio (0,5 g), azida de sódio (0,150 g) e ágar (12 g), sendo, posteriormente, diluídos em 1 L de água destilada. Em seguida, o ágar foi autoclavado e atingindo a temperatura de 55 ± 5 °C foi suplementado com o antimicrobiano canamicina (0,020 g). Após o crescimento dos isolados no caldo BHI, 200 µL foram semeados em placas contendo ágar KEA e incubadas a 37 °C por até 24 horas. Por fim, uma colônia característica das espécies do gênero *Enterococcus* (coloração marrom-preto) foi selecionada de cada amostra e estocada a -80 °C em caldo BHI acrescido de 15 % de glicerol.

4.3 Identificação molecular dos isolados bacterianos

O DNA genômico dos isolados obtidos foi extraído utilizando o *kit* QIAamp DNA Mini (QIAGEN, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. Os isolados obtidos foram identificados molecularmente através da amplificação do gene *tuf* (específico para o gênero *Enterococcus* spp.) e a nível de espécie com o gene *ddl* (específico para as espécies *E. faecalis* e *E. faecium*) (DUTKA-MALEN *et al.*, 1995). A confirmação das espécies foi realizada através do sequenciamento do gene 16S rRNA. Os *primers* utilizados e as condições estão descritos na Tabela 2. Para a realização das reações de PCR, foram utilizados 2 µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*) (25 µM), 3,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 5 µL do tampão PCR *buffer minus* Mg- 10X, 29,5 µL de água deionizada esterilizada, 1 µL de solução de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), contendo 10 mmol.L⁻¹, 5 µL (100 ng) de DNA genômico (100 ng) e 2 µL (1,25 U) da enzima Taq DNA Polimerase (JumpStart™ Taq DNA Polimerase, Sigma-Aldrich), tendo no final da reação um volume de 50 µL.

A eletroforese em gel de agarose 1 % foi realizada utilizando o tampão TAE 1X [Solução estoque 50X- Tris 2 mol.L⁻¹, ácido acético 1 mol. L⁻¹ e EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) 0,5 mol. L⁻¹ com pH final de 8.0]. Ao fim das corridas, as visualizações das bandas foram realizadas após a coloração com brometo de etídio (1 µg.mL⁻¹), utilizando o transluminador E-Gel Imager (LIFE Technologies, Israel). Para

comparação dos fragmentos e a determinação do tamanho das bandas de DNA amplificado, foi utilizando o marcador de peso molecular 100 pb *ladder plus* (Sinapse Inc., EUA). Os *amplicons* foram purificados utilizando o *kit* Illustra™ GFX™ PCR (GE HealthCare, Reino Unido) e sequenciados no Núcleo de Serviço em Biotecnologia (NBS) da Fundação do Hemocentro de Ribeirão Preto utilizando o sequenciador ABI 3500XL Genetic Analyser (Applied Biosystems, EUA). Os eletroferogramas obtidos foram visualizados utilizando o *software* ChromasPro versão 1.7.6. A identidade das sequências foi analisada no Genbank utilizando o BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tabela 2 - *Primers* utilizados na identificação dos isolados de *Enterococcus* sp.

Gene	Sequência (5'-3') ¹	Tamp (pb) ²	TA (°C) ²	Referência
<i>tuf</i>	F: TACTGACAAACCATTTCATGATG R: AACTTCGTCACCAACGCGAAC	102	55	KE <i>et al.</i> , 1999
<i>ddl</i> (<i>E. faecium</i>)	F: AAAAAACAATAGAAGAATTAT R: TGCTTTTTTGAATTCTTCTTA	215	55	DUTKA-MALEN <i>et al.</i> , 1995
<i>ddl</i> (<i>E. faecalis</i>)	F: ACTTATGTGACTACTAACTTAACC R: TAATGGTGAATCTTGGTTTGG	360	55	DUTKA-MALEN <i>et al.</i> , 1995
16S rRNA	F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG R: ACGGCTACCTTGTACGACTT	1499	57	WEISBURG <i>et al.</i> , 1991

¹ *Forward*, F; *Reverse*, R. ² Tamanho do *amplicon*, *Tamp*. ³ Temperatura de anelamento, TA.

4.4 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado pelo método de disco-difusão em ágar Mueller Hinton (MH) (Oxoid, Reino Unido), seguindo as recomendações do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018) e do Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCast, 2019). Para isso, as colônias bacterianas foram ressuspensas em solução salina esterilizada (NaCl 0,85 %) na turvação compatível com a escala 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL) e, posteriormente, semeadas em placas com auxílio de um *swab* estéril. Por fim, os discos de antimicrobianos foram adicionados nas placas. Os antimicrobianos utilizados foram: Ampicilina (10 µg); Vancomicina (30 µg); Teicoplanina (30 µg); Eritromicina (15 µg); Tetraciclina (30 µg); Doxiciclina (30 µg); Minociclina (30 µg); Ciprofloxacina (5 µg); Levofloxacina (5 µg); Norfloxacina (10 µg); Nitrofurantoina (300 µg); Rifamicina (5 µg); Fosfomicina (200 µg); Cloranfenicol (30 µg); Linezolida (30 µg). Os isolados foram classificados como *multidrug-resistant* (MDR) de acordo com Magiorakos *et al.* (2012).

4.5 Pesquisa dos genes de resistência aos antimicrobianos

Reações de PCR foram realizadas para pesquisar os genes envolvidos na resistência às tetraciclinas (*tetK*, *tetL*, *tetM* e *tetO*), aminoglicosídeos [*ant(4')-Ia*, *ant(6')-Ia* *aac(6')-Ie* *aph(2'')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* e *aph(2'')-Id*], eritromicina (*ermA*, *ermB* e *mefAE*), vancomicina (*vanA*, *vanB* e *vanC1* e *vanC2/3*) e oxazolidinona (*cfr* e *optrA*). As reações de PCR foram realizadas como descrito no item 4.3. Os *primers* e as condições utilizadas estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - *Primers* utilizados para a pesquisa dos genes resistência aos antimicrobianos

Gene	Sequência (5'-3') ¹	Tamp (pb) ²	TA (°C) ³	Referência
<i>vanA</i>	F: AAATGTGCGAAAAACCT R: TCCTGATGAATACGAAAGAT	732	54	DUTKA-MALEN <i>et al.</i> , 1995
<i>vanB</i>	F: ACCTACCCTGTCTTTGTGAA R: AATGTCTGCTGGAACGATA	300	54	ZANELLA <i>et al.</i> , 2003
<i>vanC-1</i>	F: GGTATCAAGGAAACCTC R: CTTCCGCCATCATAGCT	800	54	DUTKA-MALEN <i>et al.</i> , 1995
<i>vanC-2/3</i>	F: CTCCTACGATTCTCTTG R: CGAGCAAGACCTTTAAG	439	54	DUTKA-MALEN <i>et al.</i> , 1995
<i>Erma</i>	F: TCTAAAAAGCATGTAAGAA R: CTTGCATAGTTTATTAATATTAGT	645	47	SUTCLIFFE <i>et al.</i> , 1996
<i>ermB</i>	F: GAAAAGGTACTCAACATA R: AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	639	47	SUTCLIFFE <i>et al.</i> , 1996
<i>ermC</i>	F: TCAAAAACATAATATAGATAAA R: GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	642	47	SUTCLIFFE <i>et al.</i> , 1996
<i>mefAE</i>	F: AGTATCATTAACTACTAGTGC R: TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG	348	47	SUTCLIFFE <i>et al.</i> , 1996
<i>ant(4')-Ia</i>	F: GGAAGCAGAGTTCAGCCATG R: TGCTGCATATTCAAACAGC	266	55	KOBAYASHI <i>et al.</i> , 2001
<i>aac(6')-Ie</i> , <i>aph(2'')-Ia</i>	F: CCAAGAGCAATAAGGGCATA R: CACTATCATACCACTACCG	222	60	VAN DE KLUNDERT & Vliegenthart, 1993
<i>aph(3')-IIIa</i>	F: GCCGATGTGGATTGCGAAAA R: GCTTGATCCCCAGTAAGTCA	269	60	VAN DE KLUNDERT & Vliegenthart, 1993
<i>ant(6')-Ia</i>	F: ACTGGCTTAATCAATTTGGG R: GCCTTCCGCCACCTCACCG	597	60	SEPÚLVEDA <i>et al.</i> , 2007
<i>aph(2'')-Ib</i>	F: CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC R: GTTTGTAGCAATTCAGAAACACCCTT	867	55	VAKULENKO <i>et al.</i> , 2003
<i>aph(2'')-Ic</i>	F: CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC R: CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG	444	55	VAKULENKO <i>et al.</i> , 2003
<i>aph(2'')-Id</i>	F: GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC R: CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC	641	55	VAKULENKO <i>et al.</i> , 2003
<i>Cfr</i>	F: TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA R: ACCATATAATTGACCACAAGCAGC	746	48	LEE <i>et al.</i> , 2017
<i>optrA</i>	F: TACTTGATGAACCTACTAACCA R: CCTTGAACACTGATTCTCGG	422	55	BRENCIANI <i>et al.</i> , 2016

¹ Forward, F; Reverse, R. ² Tamanho do *amplicon*, *Tamp*. ³ Temperatura de anelamento, TA.

4.6 Pesquisa dos genes de virulência

Reações de PCR foram realizadas para pesquisar os determinantes de virulência (*asal*, *ace*, *cylA*, *gelE*, *esp* e *hyl*) em todos os isolados obtidos. As reações de PCR foram realizadas como descrito no item 4.3. Os *primers* e as condições utilizadas estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - *Primers* utilizados para detecção dos genes de virulência.

Gene	Sequência (5'-3') ¹	Tamp (pb) ²	TA (°C) ³	Referência
<i>ace</i>	F: AAGTAGAATTAGATCCACAC R: TCTATCACATTCGGTTGCG	320	50	MANNU <i>et al.</i> , 2003
<i>cylA</i>	F: TGGATGATAGTGATAGGAAGT R: TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	517	56	MANNU <i>et al.</i> , 2003
<i>asal</i>	F: CCAGTAATCAGTCCAGAAACAACC R: TAGCTTTTTTCATTCTTGTTGTTGTT	406	58	MANNU <i>et al.</i> , 2003
<i>gelE</i>	F: ACCCCGTATCATTGGTTT R: ACGCATTGCTTTTCCATC	419	54	EATON <i>et al.</i> , 2001
<i>esp</i>	F: TTGCTAATGCTAGTCCACGACC R: GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	933	65	EATON <i>et al.</i> , 2001
<i>hyl</i>	F: ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG R: GACTGACGTCCAAGTTTCCAA3	276	56	VANKERCKHOVEN <i>et al.</i> , 2004

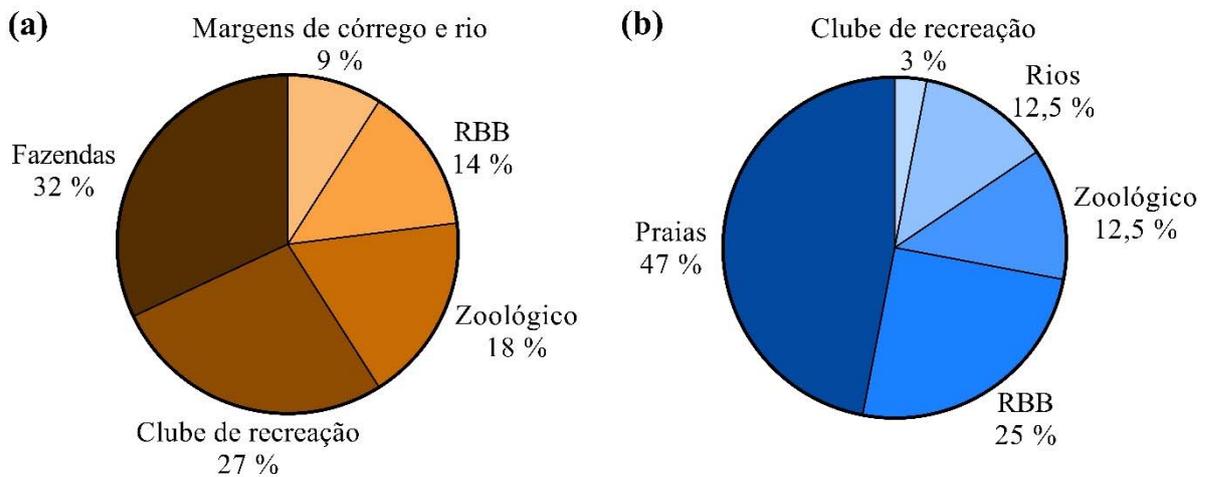
¹ Forward, F; Reverse, R. ² Tamanho do *amplicon*, *Tamp*.³ Temperatura de anelamento, TA.

5 RESULTADOS

5.1 Isolados de *Enterococcus* sp.

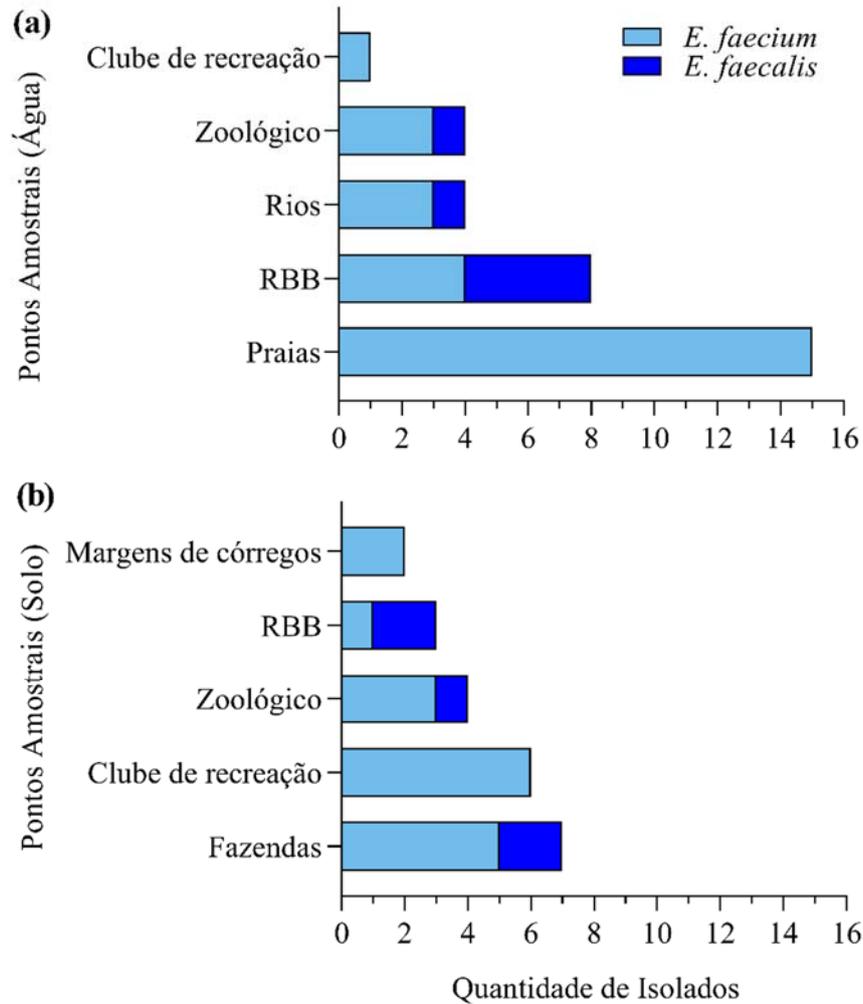
No presente estudo foram obtidos 54 isolados, sendo 43 classificados como pertencentes à espécie *E. faecium* e 11 como *E. faecalis*. Dentre os isolados de solo (n = 22), a maioria foi obtida de fazendas (n = 7, 32 %), clube de recreação (n = 6, 27 %), zoológico (n = 4, 18 %), RBB (n = 3, 14 %) e margens de córrego e rio (n = 2, 9 %) (Figura 2a). Em relação as amostras de água (n = 32), a maioria foi obtida de praias (n = 15, 47 %), seguido de RBB (n = 8, 25 %), zoológico (n = 4, 12,5 %), rios (n = 4, 12,5 %) e clube de recreação (n = 1, 3 %) (Figura 2b).

Figura 2 – Fonte de isolamento dos *Enterococcus* (a) Isolados obtidos de solo. (b) Isolados obtidos de água.



Dentre os 43 isolados de *E. faecium*, 26 foram isolados de amostras de água coletadas em praias (n=15), RBB (n=4), zoológico (n=3), rios (n=3) e clube de recreação (n=1), e 17 de solos obtidos de clube de recreação (n=6), fazendas (n=5), zoológico (n=3), margens de córregos e rios (n=2) e RBB (n=1), conforme apresentado na Figura 3. Em relação aos 11 isolados de *E. faecalis*, seis foram obtidos de amostras de água de RBB (n=4), zoológico (n=1) e rio (n=1), e cinco de amostras de solo de RBB (n=2), fazendas (n=2) e zoológico (n=1) (Figura 3).

Figura 3 - Quantidade de isolados de *Enterococcus* sp. por ponto amostral. (a) Isolados obtidos de água. (b) Isolados obtidos de solo.



As amostras ambientais foram provenientes dos estados de Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ) e São Paulo (SP). Assim, a maioria das amostras foram obtidas das cidades de Montes Claros - MG (n = 25), seguida do Rio de Janeiro - RJ (n = 15), Brumadinho - MG (n = 6), Juatuba - MG (n = 2), Altinópolis - SP (n = 1), Três Marias - MG (n = 1), Pará de Minas -MG (n = 1), São Gonçalo do Abaeté - MG (n = 1), São Paulo - SP (n = 1) e Ribeirão Preto - SP (n = 1) (Tabela 5).

Tabela 5 - Isolados de *Enterococcus* sp. obtidos de acordo com a fonte, cidade e estado.

Espécie	Isolado	Amostra	Fonte	Cidade	Estado
<i>E. faecium</i>	S699	Solo	Fazenda	Montes Claros	Minas Gerais
	S700	Solo	Fazenda	Montes Claros	Minas Gerais
	S701	Solo	Margem do córrego Melancia	Montes Claros	Minas Gerais
	S702	Solo	Parque Municipal	Montes Claros	Minas Gerais
	S703	Solo	Fazenda	Montes Claros	Minas Gerais
	S705	Solo	Fazenda	Montes Claros	Minas Gerais
	S707	Solo	Fazenda	Montes Claros	Minas Gerais
	S708	Solo	Clube de Recreação	Montes Claros	Minas Gerais
	S709	Solo	Clube de Recreação	Montes Claros	Minas Gerais
	S710	Solo	Clube de Recreação	Montes Claros	Minas Gerais
	S711	Solo	Clube de Recreação	Montes Claros	Minas Gerais
	S712	Solo	Clube de Recreação	Montes Claros	Minas Gerais
	S713	Solo	Clube de Recreação	Montes Claros	Minas Gerais
	S774	Solo	Zoológico	Montes Claros	Minas Gerais
	S776	Solo	Zoológico	Montes Claros	Minas Gerais
	S778	Solo	Zoológico	Montes Claros	Minas Gerais
	BR73	Solo	Margem do Rio Paraopeba	Brumadinho	Minas Gerais
	EW259	Água	Rio Vieiras	Montes Claros	Minas Gerais
	EW260	Água	Zoológico	Montes Claros	Minas Gerais
	EW263	Água	Clube de Recreação	Ribeirão Preto	São Paulo
	EW318	Água	Zoológico	Montes Claros	Minas Gerais
	EW321	Água	Zoológico	Montes Claros	Minas Gerais
	EW332	Água	Rio Tietê	São Paulo	São Paulo
	EW850	Água	Rio Sapucaí	Altinópolis	São Paulo
	BR14	Água	Rio São Francisco	Três Marias	Minas Gerais
	BR70	Água	Rio Paraopeba	Brumadinho	Minas Gerais
	BR140	Água	Rio Paraopeba	Pará de Minas	Minas Gerais
	BR151	Água	Rio Paraopeba	Juatuba	Minas Gerais
	BCH2	Água	Praia do Leblon	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro
	BCH7	Água	Praia do Leblon	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro
	BCH17	Água	Lagoa Rodrigo de Freitas	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro
	BCH20	Água	Lagoa Rodrigo de Freitas	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro
	BCH27	Água	Lagoa Rodrigo de Freitas	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro
	BCH31	Água	Lagoa Rodrigo de Freitas	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro
	BCH35	Água	Lagoa Rodrigo de Freitas	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro
	BCH44	Água	Praia de Copacabana	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro
BCH52	Água	Praia de Copacabana	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	
BCH60	Água	Praia de Ipanema	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	
BCH63	Água	Praia de Botafogo	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	
BCH66	Água	Praia de Botafogo	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	
BCH70	Água	Praia de Botafogo	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	
BCH73	Água	Praia de Botafogo	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	
BCH76	Água	Praia de Botafogo	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	
<i>E. faecalis</i>	S730	Solo	Zoológico	Montes Claros	Minas Gerais
	S758	Solo	Fazenda	Montes Claros	Minas Gerais
	S771	Solo	Fazenda	Montes Claros	Minas Gerais
	BR131	Solo	Margem do Rio Paraopeba	Brumadinho	Minas Gerais
	BR136	Solo	Margem do Rio Paraopeba	Brumadinho	Minas Gerais
	BR41	Água	Rio São Francisco	São Gonçalo do Abaeté	Minas Gerais
	BR157	Água	Rio Paraopeba	Juatuba	Minas Gerais
	BR168	Água	Rio Paraopeba	Brumadinho	Minas Gerais
	BR173	Água	Rio Paraopeba	Brumadinho	Minas Gerais
	EW261	Água	Rio Vieiras	Montes Claros	Minas Gerais
	EW319	Água	Zoológico	Montes Claros	Minas Gerais

5.2 Perfil de resistência aos antimicrobianos

Todos os isolados obtidos foram resistentes a pelo menos quatro antimicrobianos e todos eles foram resistentes às fluorquinolonas. Além disso, a grande maioria dos isolados foi resistente aos macrolídeos (87 %), seguido pelos nitrofuranos (46 %), rifamicina (35 %), oxazolidinonas (33 %), fosfomicina (33 %), tetraciclina (31 %), glicopeptídeos e fenicóis (13 %) (Tabela 6). Nenhum dos isolados estudados apresentou resistência aos β -lactâmicos (ampicilina) (Tabela 6).

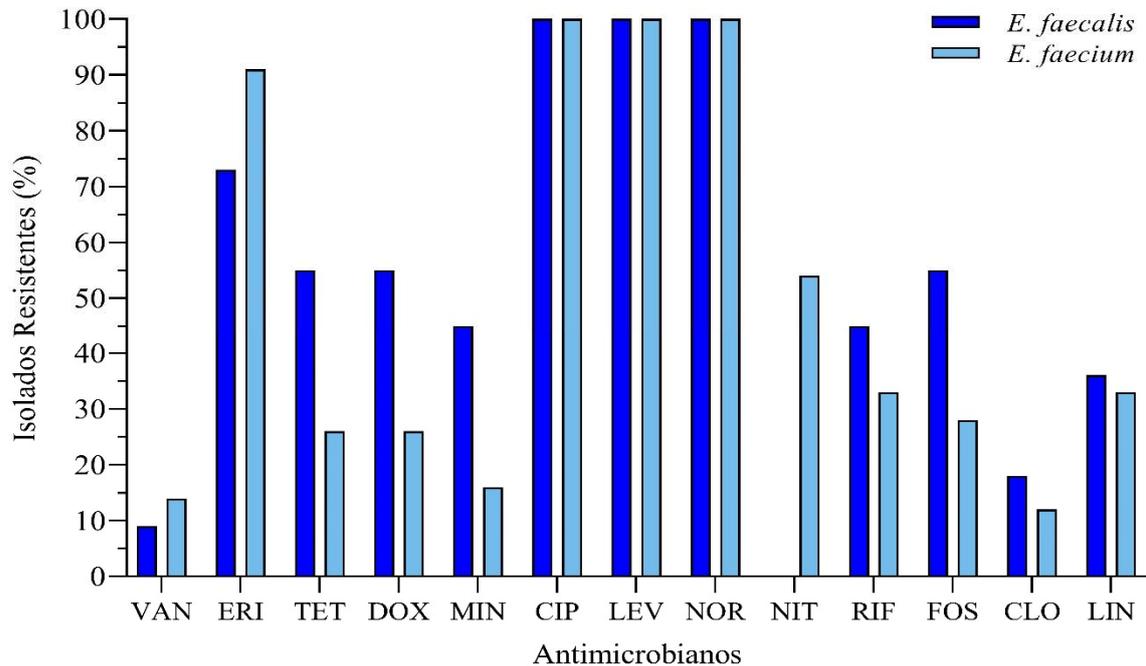
Tabela 6 – Perfil de resistência dos *Enterococcus* sp. às classes de antimicrobianos.

Classes	Total (n = 54)	<i>E. faecium</i> (n = 43)	<i>E. faecalis</i> (n = 11)
Fluorquinolonas	54 (100 %)	43 (100 %)	11 (100 %)
Macrolídeos	47 (87 %)	39 (91 %)	8 (73 %)
Nitrofuranos	25 (46 %)	25 (58 %)	0
Rifamicinas	19 (35 %)	14 (32,5 %)	5 (45,5 %)
Oxazolidinonas	18 (33 %)	14 (32,5 %)	4 (36,5 %)
Fosfomicinas	18 (33 %)	12 (28 %)	6 (54,5 %)
Tetraciclina	17 (31 %)	11 (25,5 %)	6 (54,5 %)
Glicopeptídeos	7 (13 %)	6 (14 %)	1 (9 %)
Fenicóis	7 (13 %)	5 (11,6 %)	2 (18 %)

Dentre os isolados de *E. faecium*, a grande maioria apresentou resistência à eritromicina (n = 39, 91 %), seguido de nitrofurantoína (n = 25, 58 %), rifamicina (n = 14, 32,5 %), linezolida (n = 14, 32,5 %), fosfomicina (n = 12, 28 %), tetraciclina (n = 11, 25,5 %), doxiciclina (n = 11, 25,5 %), minociclina (n = 7, 16 %), vancomicina (n = 6, 14 %) e cloranfenicol (n = 5, 12 %) (Figura 4). Nenhum isolado de *E. faecium* foi resistente à ampicilina e à teicoplanina (Figura 4).

Para os isolados de *E. faecalis*, a maioria foi resistente à eritromicina (n = 8, 73 %), apresentando também resistência à tetraciclina (n = 6; 54,5 %), doxiciclina (n = 6, 54,5 %), fosfomicina (n = 6, 54,5 %), minociclina (n = 5, 45,5 %), rifamicina (n = 5, 45,5 %), linezolida (n = 4, 36,5 %) e vancomicina (n = 1, 9 %) (Figura 4). Nenhum isolado de *E. faecalis* foi resistente à ampicilina, teicoplanina e nitrofurantoína (Figura 4). Dentre os isolados analisados, 49 (90,7 %) foram classificados como MDR (Tabela 7).

Figura 4 - Perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados de *Enterococcus* sp.



VAN, vancomicina; ERI, eritromicina; TET, tetraciclina; DOX, doxiciclina; MIN, minociclina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; NOR, norfloxacina; NIT, nitrofurantoína; RIF, rifamicina; FOS, fosfomicina; CLO, cloranfenicol; LIN, linezolida.

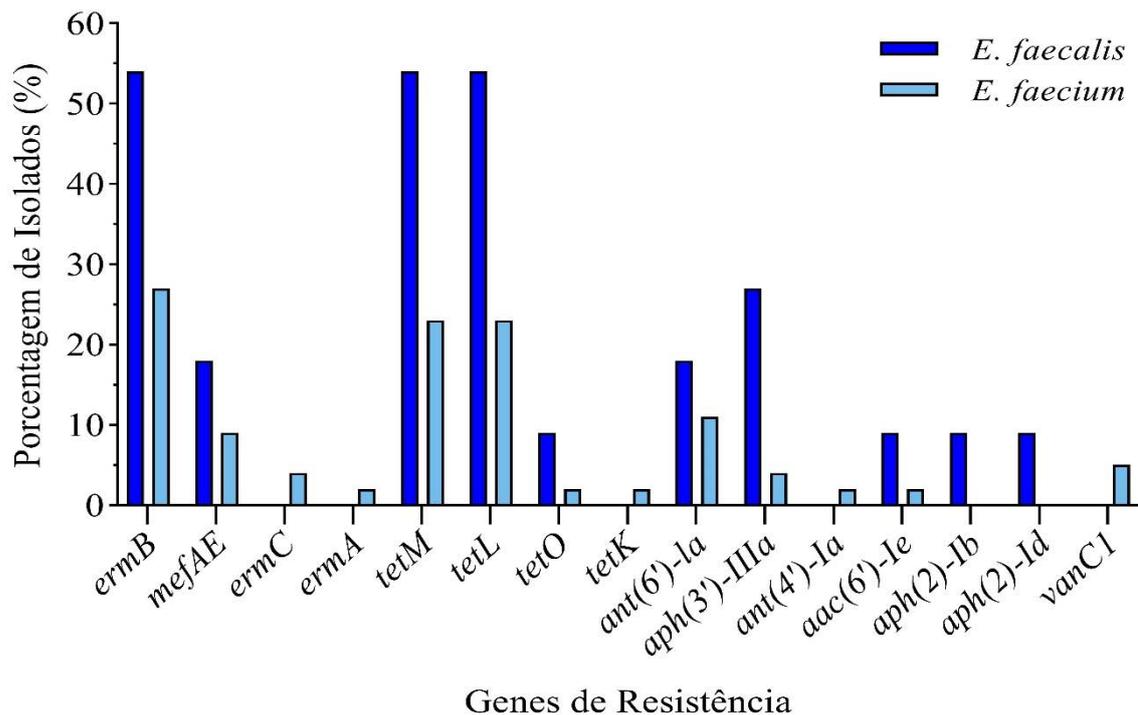
5.3 Detecção dos genes de resistência aos antimicrobianos

Dentre os genes de resistência pesquisados, o *ermB*, *tetM* e *tetL* foram os mais prevalentes, enquanto os genes *ermA*, *tetK* e *aph(2'')-Id* foram detectados em uma menor quantidade (Figura 5). Os isolados de *E. faecium* apresentaram genes de resistência aos macrolídeos [*ermB* (n = 12, 28 %), *mefAE* (n = 4, 9 %), *ermC* (n = 2, 5 %) e *ermA* (n = 1, 2 %)], tetraciclina [*tetM* (n = 10, 23 %), *tetL* (n = 10, 23 %), *tetO* (n = 1, 2 %) e *tetK* (n = 1, 2 %)], aminoglicosídeos [*ant(6')-Ia* (n = 5, 12 %), *aph(3')-IIIa* (n = 2, 5 %), *ant(4')-Ia* (n = 1, 2 %) e *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (n = 1, 2 %)] e glicopeptídeos [*vanCI* (n = 2, 5 %)] (Figura 5). Nenhum dos isolados de *E. faecium* apresentou os genes *vanA*, *vanB*, *vanC2/3*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* e *aph(2'')-Id*, *cfr* e *optrA* (Figura 5; Tabela 7).

Os isolados de *E. faecalis* apresentaram genes de resistência às tetraciclina [*tetM* (n = 6, 54 %), *tetL* (n = 6, 54 %) e *tetO* (n = 1, 9 %)], macrolídeos [*ermB* (n = 6, 54 %) e *mefAE* (n = 2, 18 %)] e aos aminoglicosídeos [*aph(3')-IIIa* (n = 3, 27 %), *ant(6')-Ia* (n = 2, 18 %), *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (n = 1, 9 %), *aph(2'')-Ib* (n = 1, 9 %) e *aph(2'')-Id* (n = 1, 9 %)] (Figura 5). Nenhum dos isolados de *E. faecalis* apresentou os genes *tetK*, *ermA*, *ermC*, *aph(2'')-Ic* e

aph(2'')-Id, *ant(4')-Ia*, *vanA*, *vanB*, *vanC1* e *vanc2/3* (Figura 5; Tabela 7). Adicionalmente, os genes *ermA*, *ermC*, *tetK*, *vanC1* e *ant(4')-Ia* foram detectados apenas em *E. faecium*, enquanto os *aph(2)-Ib* e *aph(2)-Id* foram detectados apenas em *E. faecalis* (Figura 5, Tabela 7). Os demais genes encontrados foram distribuídos nas duas espécies.

Figura 5 – Porcentagens dos genes de resistência aos antimicrobianos nos isolados de *Enterococcus* sp.



5.4 Detecção dos determinantes de virulência

Entre os genes de virulência pesquisados o *gelE* (n = 16, 30 %) e o *ace* (n = 11, 20 %) foram encontrados em maior proporção nos *Enterococcus* estudados. Nos isolados de *E. faecalis*, os genes *ace* (n = 9, 82 %) e *gelE* (n = 9, 82 %) foram os mais prevalentes, seguidos dos genes *esp* (n = 3, 27%) e *asa1* (n = 1, 9 %). Para a espécie de *E. faecium*, os genes *gelE* (n = 7, 16 %) e *esp* (n = 6, 14 %) foram os mais detectados (Figura 6). Nenhum dos isolados apresentou os genes *cylA* e *hyl* e nenhum isolado de *E. faecium* apresentou o gene *asa1*. Além disso, os isolados de *E. faecalis* apresentaram uma maior prevalência de genes de virulência quando comparados aos isolados *E. faecium* (Figura 6; Tabela 7). Dentre os 54 isolados de *Enterococcus* analisados, (n = 21, 39%) apresentaram pelo menos um gene

de virulência, enquanto alguns isolados (n = 12, 22%) apresentaram dois ou mais genes de virulência (Tabela 7).

Figura 6 - Detecção dos genes de virulência em isolados em isolados de *Enterococcus* sp.

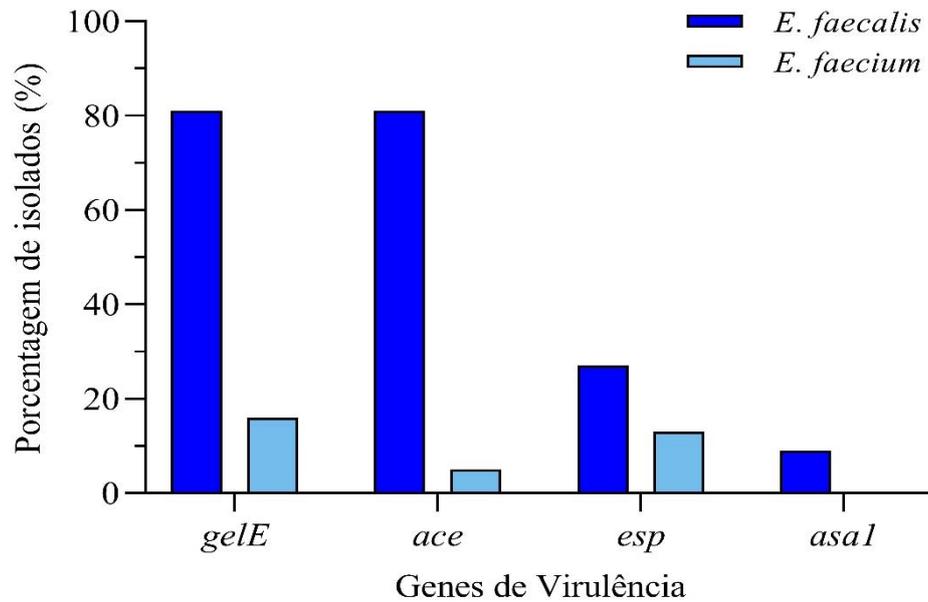


Tabela 7 - Isolados de *Enterococcus* sp. de acordo com o perfil de resistência aos antimicrobianos e genes encontrados.

Espécie	Isolado	Perfil de resistência aos antimicrobianos ¹	Class. ²	Gene de resistência aos antimicrobianos	Genes de virulência
<i>E. faecium</i>	S699	ERI, CIP, LEV, NOR, RIF	MDR	<i>vanC1, ant(6')-Ia, ermB</i>	<i>esp</i>
	S700	ERI, CIP, LEV, NOR, RIF	MDR	<i>ermB</i>	<i>esp</i>
	S701	VAN, ERI, CIP, LEV, NOR, RIF, CLO, LIN	MDR	-	-
	S702	ERI, CIP, LEV, NOR, NIT, RIF, LIN	MDR	-	-
	S703	VAN, ERI, TET, DOX, CIP, LEV, NOR, NIT, CLO, LIN	MDR	-	-
	S705	VAN, ERI, TET, DOX, MIN, CIP, LEV, NOR, NIT, RIF, FOS, CLO	MDR	<i>ermA, ermB, tetK, tetL, tetM, tetO, aph(3')-IIIa, ant(6')-Ia</i>	-
	S707	ERI, CIP, LEV, NOR, RIF	MDR	-	-
	S708	ERI, TET, DOX, CIP, LEV, NOR, LIN	MDR	<i>ermB, tetL, tetM</i>	<i>gelE</i>
	S709	ERI, CIP, LEV, NOR	-	<i>ermB, mefAE</i>	<i>esp</i>
	S710	ERI, TET, DOX, CIP, LEV, NOR, RIF, FOS	MDR	<i>ermB, ermC, tetL, tetM</i>	-
	S711	ERI, CIP, LEV, NOR, NIT, RIF, FOS, LIN	MDR	-	<i>gelE, ace</i>
	S712	ERI, CIP, LEV, NOR, RIF, LIN	MDR	-	<i>gelE</i>
	S713	ERI, TET, DOX, MIN, CIP, LEV, NOR, NIT, RIF	MDR	<i>ermB, tetL, tetM</i>	-
	S774	ERI, TET, DOX, MIN, CIP, LEV, NOR, NIT, LIN	MDR	<i>tetL, tetM,</i>	-
	S776	ERI, TET, DOX, MIN, CIP, LEV, NOR, NIT	MDR	<i>tetL, tetM</i>	-
	S778	CIP, LEV, NOR, NIT, RIF, LIN	MDR	-	-
	BR73	ERI, CIP, LEV, NOR, RIF	MDR	-	-
	EW259	CIP, NOR, RIF	-	-	<i>gelE</i>
	EW260	VAN, ERI, CIP, LEV, NOR, RIF	MDR	<i>ant(4')-Ia, ant(6')-Ia</i>	<i>gelE, esp</i>
	EW263	ERI, TET, DOX, MIN, CIP, LEV, NOR, FOS	MDR	<i>ermB, tetL, tetM, aac(6')-Ie aph(2'')-Ia, aph(3')-IIIa, ant(6')-Ia</i>	<i>gelE, ace, esp</i>
	EW318	ERI, CIP, LEV, NOR, NIT, RIF	MDR	-	-
	EW321	ERI, CIP, LEV, NOR, NIT, RIF, LIN	MDR	<i>ermB, mefAE</i>	-
	EW332	ERI, CIP, LEV, NOR, RIF	MDR	<i>ermB, ant(6')-Ia</i>	<i>esp</i>
	EW850	ERI, CIP, LEV, NOR, NIT, RIF	MDR	<i>ermB, mefAE</i>	-
	BR14	ERI, CIP, LEV, NOR, NIT, RIF	MDR	-	-
	BR70	TET, DOX, MIN, CIP, LEV, NOR, NIT, RIF, FOS, LIN	MDR	<i>tetL tetM,</i>	-
	BR140	VAN, CIP, LEV, NOR, NIT, RIF, FOS	MDR	<i>vanC1</i>	-
BR151	ERI, CIP, LEV, NOR, NIT, FOS, LIN	MDR	-	-	
BCH2	ERI, TET, DOX, MIN, CIP, LEV, NOR, NIT, RIF, FOS, CLO, LIN	MDR	<i>tetL, tetM,</i>	-	

	BCH7	ERI, CIP, LEV, NOR, NIT	MDR	<i>ermC</i>	-
	BCH17	ERI, CIP, LEV, NOR, NIT, RIF	MDR	-	-
	BCH20	ERI, CIP, LEV, NOR, NIT, RIF	MDR	-	-
	BCH27	ERI, CIP, LEV, NOR, NIT, RIF	MDR	-	<i>gelE</i>
	BCH31	VAN, ERI, CIP, LEV, NOR, NIT, RIF	MDR	-	-
	BCH35	ERI, CIP, LEV, NOR, NIT, RIF, FOS, LIN	MDR	-	-
	BCH44	ERI, CIP, LEV, NOR, NIT, RIF	MDR	-	-
	BCH52	ERI, CIP, LEV, NOR, NIT, RIF, FOS, CLO, LIN	MDR	<i>ermB</i>	-
	BCH60	ERI, CIP, LEV, NOR, NIT, RIF	MDR	-	-
	BCH63	ERI, TET, DOX, CIP, LEV, NOR, FOS	MDR	<i>tetL, tetM,</i>	-
	BCH66	ERI, CIP, LEV, NOR, NIT, RIF	MDR	-	-
	BCH70	ERI, CIP, LEV, NOR, RIF, FOS	MDR	-	-
	BCH73	ERI, CIP, LEV, NOR, RIF	MDR	-	-
	BCH76	ERI, CIP, LEV, NOR, NIT, RIF	MDR	<i>mefAE</i>	-
<i>E. faecalis</i>	S730	ERI, TET, DOX, CIP, LEV, NOR, RIF, FOS, LIN	MDR	<i>tetL, tetM</i>	<i>gelE, ace</i>
	S758	CIP, LEV, NOR, RIF	-	-	<i>gelE, ace</i>
	S771	TET, DOX, MIN, CIP, LEV, NOR, RIF, FOS, LIN	MDR	<i>tetL tetM,</i>	<i>gelE, ace</i>
	BR131	ERI, CIP, LEV, NOR, RIF, FOS	MDR	<i>ermB</i>	<i>gelE</i>
	BR136	CIP, LEV, NOR, FOS, LIN	MDR	-	<i>gelE, ace,</i>
	BR41	ERI, TET, DOX, MIN, CIP, LEV, NOR	MDR	<i>ermB, tetL, tetM, aph(3')-IIIa</i>	<i>gelE, ace, esp</i>
	BR157	ERI, TET, DOX, MIN, CIP, LEV, NOR, CLO	MDR	<i>tetL, tetM, aph(3')-IIIa, ant(6')-Ia</i>	-
	BR168	ERI, CIP, LEV, NOR, RIF, FOS	MDR	<i>ermB</i>	<i>gelE, ace</i>
	BR173	ERI, TET, DOX, MIN, CIP, LEV, NOR, RIF	MDR	<i>ermB, tetL, tetM,</i>	<i>ace, esp</i>
	EW261	VAN, ERI, TET, DOX, MIN, CIP, LEV, NOR, RIF, FOSF, CLO, LIN	MDR	<i>ermB, mefAE, tetL, tetM, tetO, aac(6')-Ie aph(2'')-Ia, aph(3')-IIIa, ant(6')-Ia, aph(2'')-Id</i>	<i>gelE, ace, esp, asaI</i>
	EW319	ERI, CIP, LEV, NOR	-	<i>ermB, mefAE, aph(2'')-Ib</i>	<i>gelE, ace</i>

¹ VAN, vancomicina; ERI, eritromicina; TET, tetraciclina; DOX, doxiciclina; MIN, minociclina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; NOR, norfloxacina; NIT, nitrofurantoína; RIF, rifamicina; FOS, fosfomicina; CLO, clorafenicol; LIN, linezolida.

² Class., classificação; MDR, *multidrug-resistant*.

6 DISCUSSÃO

A presença de *E. faecium* e de *E. faecalis* em amostras ambientais vem sendo reportada em diversos países, sendo predominante o isolamento de *E. faecalis* no âmbito hospitalar (DANIEL *et al.*, 2017). No presente estudo foi possível observar uma maior prevalência dos isolados de *E. faecium* em relação aos *E. faecalis* nas amostras analisadas. Este fenômeno pode estar atribuído a dois fatores principais: uma maior capacidade dos isolados de *E. faecium* de sobreviverem em condições desfavoráveis e a capacidade de abrigar diferentes genes que lhes conferem vantagens evolutivas e adaptativas (PRIETO *et al.*, 2016). Recentemente, outros estudos relataram uma maior prevalência de isolados de *E. faecium* em amostras ambientais, corroborando com os resultados deste estudo (VIGNAROLI *et al.*, 2018; THU *et al.*, 2019). Além disso, a presença de *Enterococcus* sp. em amostras ambientais é indicativa de contaminação de origem fecal (GOLOB *et al.*, 2019).

Os isolados obtidos apresentaram um amplo perfil de resistência aos antimicrobianos, sendo que a grande maioria foi classificada como MDR, ou seja, foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano pertencente a pelo menos três classes diferentes (MAGIORAKOS *et al.*, 2012). Esse resultado reforça que o meio ambiente está atuando como reservatório de bactérias MDR e genes de resistência aos antimicrobianos (RIPA *et al.*, 2020; HAMIWE *et al.*, 2019). Portanto, a disseminação de bactérias e de seus genes de resistência para os seres humanos e os animais pode ocorrer através de diferentes formas, incluindo o consumo e o contato com águas e com alimentos contaminados (BEGANOVIC *et al.*, 2018). Soma-se a isso o fato dos *Enterococcus* sp. serem importantes patógenos oportunistas, o que torna a presença dessas bactérias com perfil MDR em fontes ambientais como fato preocupante (IGBINOSA & BESHIRU, 2019).

Um alto índice de resistência às fluorquinolonas e à eritromicina foi observado nesse estudo, corroborando com outras pesquisas desenvolvidas no Brasil e no mundo, as quais reportaram um alto perfil de resistência a estas classes de antimicrobianos em isolados clínicos e ambientais. Sacramento *et al.* (2017) observaram que os isolados clínicos de *Enterococcus* sp. coletados em diversos hospitais do sudeste do Brasil foram resistentes à eritromicina e Santos *et al.* (2017) reportaram que *Enterococcus* sp. isolados de infecções em pacientes com câncer apresentavam alto percentual de resistência para eritromicina e ciprofloxacina. Em isolados de *E. faecium*, a resistência às fluorquinolonas vem sendo frequentemente reportada no âmbito hospitalar (SOARES *et al.*, 2019; ESPÍNDOLA *et al.*, 2021). Entretanto, em isolados ambientais, embora a resistência às fluorquinolonas e à

eritromicina também esteja sendo reportada, a mesma ocorre em menor proporção (MONTEIRO *et al.*, 2020; ARAÚJO *et al.*, 2021).

Entre os genes de resistência encontrados, o *ermB* foi o mais prevalente. Este gene vem sendo descrito como o gene de resistência adquirido mais difundido entre as espécies do gênero *Enterococcus* (ADESIDA *et al.*, 2017; SHRIDHAR & DHANASHREE, 2019). O gene *ermB* confere resistência à classe dos macrolídeos, e sua disseminação tem sido associada ao uso intensivo desses antimicrobianos pela medicina humana e veterinária. Dados da literatura científica demonstram que o uso dos macrolídeos aumentou 10% desde 2016 (KIM *et al.*, 2019). Além disso, em isolados clínicos de *Enterococcus* sp., o gene *ermB* é comumente reportado com outros genes de resistência clinicamente relevante, tais como *van-like* and *tet-like* (DZIRI *et al.* 2016). Para a classe das tetraciclina, o *tetM* foi o gene mais detectado. Esses resultados corroboram com os dados descritos por Ayeni *et al.* (2016) e Golob *et al.* (2019) que demonstraram uma maior prevalência de genes de resistência aos macrolídeos e às tetraciclina entre as espécies do gênero *Enterococcus*. Adicionalmente, os transposons da família Tn916/Tn1545, que abrigam o gene *tetM*, são frequentemente associados com a presença do gene *ermB* (CAUWERTS *et al.*, 2007; MOLECHAN *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2019).

Os *Enterococcus* spp. são intrinsecamente resistentes (baixas concentrações) aos aminoglicosídeos (SHETE *et al.*, 2017; SHARIFZADEH PEYVASTI *et al.*, 2020). Nesse estudo, os genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* e *aph(3')-IIIa* foram os genes de resistência aos aminoglicosídeos mais prevalentes. Esses genes têm sido relatados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, e podem ser transferíveis horizontalmente (MOUSSA *et al.*, 2019). Além disso, a presença de genes de resistência que inativam a gentamicina e a estreptomicina em isolados de *Enterococcus* dificulta o tratamento em associação com antimicrobianos que atuam inibindo a parede celular e, conseqüentemente, reduz fortemente o sucesso terapêutico (SHARIFZADEH PEYVASTI *et al.*, 2020). Estudos desenvolvidos no Brasil demonstraram uma maior disseminação desses genes de resistência aos aminoglicosídeos em isolados clínicos, porém existem poucos estudos em fontes ambientais avaliando a presença desses genes (SANTOS *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Alguns isolados ambientais de *Enterococcus* sp. apresentaram resistência à vancomicina, entretanto, apenas dois isolados foram positivos para o gene *vanCI*. Esse fato pode estar relacionado à presença de outros mecanismos não investigados neste estudo (AHMED & BAPTISTE, 2018). O gene *vanCI* foi descrito pela primeira vez no cromossomo

de *Enterococcus gallinarum* (AHMED & BAPTISTE, 2018), sendo utilizado como um gene específico para a identificação molecular desta espécie (LECLERCQ *et al.*, 1992; GARNICA *et al.*, 2013; MOURA *et al.*, 2013). Entretanto, alguns estudos têm demonstrado a presença do gene *vanC-like* em outras espécies do gênero *Enterococcus*, tais como *E. faecium* e *E. faecalis*. Patel *et al.* (1997) descreveram, pela primeira vez, a presença do gene *vanC* em isolados clínicos de *E. faecium* e *E. faecalis* e, posteriormente, o gene *vanCI* foi descrito em isolados de *E. faecalis* obtidos de suínos (SCHWAIGER *et al.*, 2012), frangos no Brasil (MOURA *et al.*, 2013) e em amostras de leite (GARNICA *et al.*, 2013). Em *E. faecium*, o primeiro isolado foi descrito em 2014 de uma amostra clínica em um hospital da China (SUN *et al.* 2014). Posteriormente, o gene *vanCI* foi relatado em isolados de *E. faecium* obtidos de um ambiente aquático (ROBERTS *et al.*, 2016). No entanto, até o presente momento, não há relato de isolados de *E. faecium* carregando o gene *vanCI* obtidos de solo.

A resistência à linezolida foi observada em 18 isolados, porém nenhum isolado foi positivo para os genes pesquisados (*optrA* e *cfr*). Esse resultado pode ser devido aos diferentes mecanismos de resistência descritos para essa classe, tais como mutações no gene 23S rRNA, proteínas ribossômicas (L3 e L4) ou a presença do gene *poxtA* (BI *et al.*, 2018; EGAN *et al.*, 2020). No Brasil, Almeida *et al.* (2014) demonstraram, pela primeira vez, isolados clínicos de *Enterococcus* sp. resistentes à vancomicina e à linezolida. Posterior, Almeida *et al.* (2020) reportaram pela primeira vez um isolado de *E. faecalis* obtido de suínos abrigando os genes *optrA* e *cfr*. Esses resultados reforçam a necessidade de estudos conduzidos em fontes ambientais para identificação desses genes de resistência.

As amostras obtidas de águas de praia apresentaram uma menor quantidade de genes de resistência aos antimicrobianos, quando comparadas às demais amostras. Estudos conduzidos por Young *et al.* (2019) demonstraram que o ambiente de águas superficiais pode causar a perda de plasmídeos e outros elementos genéticos móveis em *Enterococcus* sp., evidenciando que para mantê-los o gasto pode ser alto e a perda desses elementos é feita de modo a reduzir a carga metabólica bacteriana. Apesar disso, os isolados obtidos de praias apresentaram resistência a diferentes classes de antimicrobianos. Esses isolados foram obtidos de amostras coletadas no carnaval, um período de maior contaminação das águas devido ao alto número de pessoas nesses locais (MARTINS *et al.*, 2019). Alguns estudos têm reportado que a baixa qualidade das águas em que seres humanos e animais entram em contato é responsável pela maior parte das doenças endêmicas em diversos países (MACEDO *et al.*, 2011).

Dentre os isolados deste estudo, alguns foram obtidos a partir de amostras coletadas nas regiões atingidas pelo rompimento da barragem em Brumadinho-MG, e apresentaram um amplo perfil de resistência aos antimicrobianos, bem como a presença de diferentes genes de resistência aos antimicrobianos e genes de virulência. Furlan *et al.* (2020) relataram que amostras ambientais obtidas após este desastre apresentaram altas concentrações de metais, o que poderia fornecer um ambiente adequado para a transferência horizontal de genes. Além disso, foi observado uma maior diversidade e abundância de diferentes genes nos locais afetados pelo desastre, destacando que a contaminação pelos rejeitos deste desastre pode ter influenciado no aumento da diversidade e da abundância de diferentes genes de resistência aos antimicrobianos, tais como os genes para macrolídeos (*ermA*, *ermB*, *ermC* e *mefAE*) e para os glicopeptídeos (*vanC1* e *vanC2/3*).

Os fatores de virulência em *Enterococcus* spp. têm sido associados a plasmídeos conjugativos ou a regiões específicas do genoma conhecidas como ilhas de patogenicidade (SURYALETHA *et al.*, 2021). Neste estudo, foi observada uma maior prevalência de isolados de *E. faecalis* com múltiplos determinantes de virulência em comparação com os isolados de *E. faecium*. A maioria dos genes de virulência pesquisados foi encontrada em isolados de *Enterococcus* sp. MDR, como por exemplo no isolado EW261, que apresentou quatro dos seis genes de virulência pesquisados. Além disso, todos os isolados de *E. faecalis* apresentaram pelo menos dois genes de virulência, com exceção do isolado BR157. Esses resultados corroboram com estudos nacionais e internacionais que demonstraram uma maior prevalência de genes de virulência em isolados de *E. faecalis* (FERGUSON *et al.*, 2016; DANIEL *et al.*, 2017; MAASJOST *et al.*, 2019; ARAÚJO *et al.*, 2021).

O gene *gelE* foi o mais prevalente entre os isolados de *Enterococcus* sp. desse estudo. Em isolados de *E. faecalis*, o gene *gelE* tem sido associado principalmente à colonização e à formação de biofilmes (PILLAY *et al.*, 2018). O gene *asa1* tem sido reportado em amostras de águas doces superficiais, principalmente em rios, enquanto uma alta prevalência do gene *esp* tem sido relatada no âmbito hospitalar e na pecuária, corroborando com os nossos resultados (FERGUSON *et al.*, 2016; DANIEL *et al.*, 2017). Dentre os genes de virulência, o gene *esp* tem sido amplamente difundido em isolados de *Enterococcus* sp. (SHRIDHAR & DHANASHREE, 2019). Além disso, a baixa incidência de *asa1* e *cylA* entre os isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* pode indicar que esses genes de virulência não foram amplamente disseminados no ambiente. Por isso, torna-se necessário um maior número de estudos para se entender melhor sobre a disseminação desses genes.

A presença de *Enterococcus* sp. abrigando diferentes determinantes de virulência é preocupante, uma vez que o processo de patogenicidade está relacionado com a capacidade dos isolados virulentos crescerem em altas densidades no trato intestinal e se espalharem para outros locais do corpo (ARIAS & MURRAY, 2012; FERGUSON *et al.*, 2016). Assim, é importante destacar que a coexistência de diferentes determinantes de virulência pode auxiliar no surgimento de isolados resistentes a diferentes antimicrobianos. Estudos têm evidenciado que as altas frequências dos genes de virulência *gelE*, *asa1* e *ace* podem estar associadas à resistência para rifampicina, quinupristina/dalfopristina, doxiciclina, ciprofloxacina e eritromicina (JAHANSEPAS *et al.*, 2020).

Diante disso, a ocorrência de *Enterococcus* sp. MDR em diferentes fontes ambientais chama a atenção para a disseminação desta espécie no meio ambiente. Ademais, a presença de genes que conferem resistência aos antimicrobianos clinicamente importantes, tais como glicopeptídeos, aminoglicosídeos, macrolídeos e tetraciclina, reforça a importância do meio ambiente como reservatório e disseminador de genes de resistência aos antimicrobianos. Adicionalmente, os isolados MDR também carregavam genes de virulência, sendo um potencial risco para a saúde. Portanto, este estudo contribui para uma melhor compreensão sobre isolados bacterianos MDR carregando genes de resistência aos antimicrobianos e de virulência em fontes ambientais.

7 CONCLUSÕES

- Isolados de *E. faecalis* e *E. faecium*, sendo este último o mais prevalente, foram encontrados em diferentes fontes ambientais, e todos apresentaram resistência a pelo menos quatro antimicrobianos, sendo a grande maioria classificada como MDR.
- Genes que conferem resistência à classe dos macrolídeos (*ermB*) e às tetraciclinas (*tetM* e *tetL*) foram os mais prevalentes entre os isolados ambientais. Destaca-se, ainda, a ocorrência de um isolado de *E. faecium* obtido do solo abrigando o gene *vanC1*, sendo este o primeiro relato na literatura.
- Isolados de *E. faecalis* apresentaram um maior perfil de virulência quando comparados aos isolados de *E. faecium*, sendo os genes *gelE* e *ace* os mais detectados nesse estudo;
- *Enterococcus* sp. MDR em amostras de água e de solo obtidos do ambiente podem sinalizar uma possível disseminação dessas bactérias, reforçando a importância de estudos conduzidos em fontes ambientais.

8 REFERÊNCIAS

- ADESIDA, S. A.; EZENTA, C. C.; ADAGBADA, A. O.; ALADESOKAN, A. A.; COKER, A. O. Carriage of multidrug resistant *enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* among apparently healthy humans. **Afr J Infect Dis**, v. 11, n. 2, p. 83-89, 2017.
- AHMED, M. O.; BAPTISTE, K. E. Vancomycin-Resistant *Enterococci*: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. **Microb Drug Resist**, v. 24, n. 5, p. 590-606, 2018.
- ALIPOUR, M.; RAJABI, M.; KHALILI, R.; TORKAMANZADEH, P. Prevalence of antibiotic resistance genes among *Enterococcus* strains isolated from the clinical specimens. **Gene Rep**, v. 23, p. 101092, 2021.
- ALMEIDA, L. M.; DE ARAUJO, M. R. E.; IWASAKI, M. F.; SACRAMENTO, A. G.; ROCHA, D.; DA SILVA, L. P.; PAVEZ, M.; DE BRITO, A. C.; ITO, L. C. S.; GALES, A. C.; LINCOPAN, N.; SAMPAIO, J. L. M.; MAMIZUKA, E. M. Linezolid Resistance in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolates in a Brazilian Hospital. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 5, p. 2993–2994, 2014.
- ALMEIDA, L. M.; GACA, A.; BISPO, P. M.; LEBRETON, F.; SAAVEDRA, J. T.; SILVA, R. A.; BASÍLIO-JÚNIOR, I. D.; ZORZI, F. M.; FILSNER, P. H.; MORENO, A. M.; GILMORE, M. S. Coexistence of the Oxazolidinone Resistance-Associated Genes *cfp* and *optrA* in *Enterococcus faecalis* From a Healthy Piglet in Brazil. **Front Public Health**, v. 8, p. 518, 2020.
- ANDERSON, A. C.; JONAS, D.; HUBER, I.; KARYGIANNI, L.; WÖLBER, J.; HELLWIG, E.; ARWEILER, N.; VACH, K.; WITTMER, A.; AL-AHMAD, A. *Enterococcus faecalis* from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation. **Front Microbiol**, v. 6, p. 1534, 2016.
- ANDREWES, F.W.; HORDER, T.J. A study of the *streptococci* pathogenic for man. **The Lancet**, v. 168, n. 4333, p. 708–713, 1906.
- ANTONELLI, A.; D'ANDREA, M. M.; BRENCIANI, A.; GALEOTTI, C. L.; MORRONI, G.; POLLINI, S.; VARALDO, P. E.; ROSSOLINI, G. M. Characterization of *poxTA*, a novel phenicol–oxazolidinone–tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 7, p. 1763–1769, 2018.
- ARAÚJO, A. J. G.; GRASSOTTI, T. T.; FRAZZON, A. P. G. Characterization of *Enterococcus* spp. isolated from a fish farming environment in southern Brazil. **Braz J Biol**, v. 81, n. 4, p. 954-961, 2021.
- ARIAS, C.A.; CONTRERAS, G.A.; MURRAY, B.E. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. **Clin Microbiol and Infect**, v. 16, n. 6, p. 555–562, 2010.
- ARIAS, C.A.; MURRAY, B.E. “The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance,” **Nat Rev Microbiol**, vol. 10, no. 4, p. 266–278, 2012.

ARYA, D. P. (Org.). **Aminoglycoside Antibiotics: From Chemical Biology to Drug Discovery**. 1. ed. [S. l.]: Wiley, 2007.

AYENI, F. A.; ODUMOSU, B. T.; OLUSEYI, A. E.; RUPPITSCH, W. Identification and prevalence of tetracycline resistance in *enterococci* isolated from poultry in Ilishan, Ogun State, Nigeria. **J Pharm Bioallied Sci**, v. 8, n. 1, p. 69-73, 2016.

BEGANOVIC, M.; LUTHER, M. K.; RICE, L. B.; ARIAS, C. A.; RYBAK, M. J.; LAPLANTE, K. L. A Review of Combination Antimicrobial Therapy for *Enterococcus faecalis* Bloodstream Infections and Infective Endocarditis. **Clin Infect Dis**, v. 67, n. 2, p. 303-309, 2018.

BI, R.; QIN, T.; FAN, W.; MA, P.; GU, B. The emerging problem of linezolid-resistant *enterococci*. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 13, p. 11-19, 06 2018.

BIN-ASIF, H.; ALI, S.A. The Genus *Enterococcus* and Its Associated Virulent Factors. **Microorganisms**, p.66-67, 2019.

BOEHM, A. B.; SASSOUBRE, L. M. *Enterococci* as Indicators of Environmental Fecal Contamination. 2014 Feb 5. In: Gilmore, M.S.; Clewell DB, editors. **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014.

BRENCIANI, A.; MORRONI, G.; VINCENZI, C.; MANSO, E.; MINGOIA, M.; GIOVANETTI, E.; VARALDO, P. E. Detection in Italy of two clinical *Enterococcus faecium* isolates carrying both the oxazolidinone and phenicol resistance gene *optrA* and a silent multiresistance gene *cfr*. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 71, n. 4, p. 1118–1119, 2016.

CAUWERTS, K.; DECOSTERE, A.; DE GRAEF, E. M.; HAESEBROUCK, F. High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the *erm(B)* gene. **Avian Pathol**, v. 36, n. 5, p. 395-399, 2007.

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C. G. Vancomycin-resistant *enterococci*. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, n. 4, p. 686–707, 2000.

CHOI, J. M.; WOO, G. J. Transfer of Tetracycline Resistance Genes with Aggregation Substance in Food-Borne *Enterococcus faecalis*, **Curr Microbiol**, v. 70, p. 476–484, 2015.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiol Mol Biol Ver**, v. 65, n. 2, p. 232–260, 2001.

CHOW, J. W. Aminoglycoside Resistance in *Enterococci*. **Clin Infect Dis**, v. 31, n. 2, p. 586–589, 2000.

CLSI. 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Approved Standard - Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. M. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

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

DANIEL, D. S.; LEE, S. M.; GAN, H. M.; DYKES, G. A.; RAHMAN, S. Genetic diversity of *Enterococcus faecalis* isolated from environmental, animal and clinical sources in Malaysia. **J Infect Public Health**, v.10, n. 5, p. 617-623, 2017.

DE LASTOURS, V.; MAUGY, E.; MATHY, V.; CHAU, F.; ROSSI, B.; GUÉRIN, F.; CATTOIR, V.; F ANTIN, B.; CIPHARES STUDY GROUP. Ecological impact of ciprofloxacin on commensal *enterococci* in healthy volunteers. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, n. 6, p. 1574-1580, 2017.

DESHPANDE, L. M.; CASTANHEIRA, M.; FLAMM, R. K.; MENDES, R. E. Evolving oxazolidinone resistance mechanisms in a worldwide collection of *enterococcal* clinical isolates: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **J Antimicrob Chemother**, v. 73, n. 9, p. 2314-2322, 2018.

DIAB, M.; SALEM, D.; EL-SHENAWY, A. Detection of high-level aminoglycoside resistance genes among clinical isolates of *Enterococcus* species. **Egypt J Med Hum** v. 20, n. 1, p. 28, 2019.

DIEKEMA, D. J; JONES, R. N. Oxazolidinone antibiotics. **The Lancet**, v. 358, n. 9297, p. 1975–1982, 2001.

DUTKA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant *Enterococci* by PCR. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 5, p. 1434, 1995.

DZIRI, R.; LOZANO, C.; BEN SAID, L.; BELLAJ, R.; BOUDABOUS, A.; BEN SLAMA, K.; TORRES, C.; KLIBI, N. Multidrug-resistant *enterococci* in the hospital environment: detection of novel vancomycin-resistant *E. faecium* clone ST910. **J Infect Dev Countr**, v. 10, n. 08, p. 799–806, 31 2016.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential genetic exchange between food and medical isolates. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n. 4, p. 1628-1635, 2001.

EGAN, S. A.; SHORE, A. C.; O'CONNELL, B.; BRENNAN, G. I. COLEMAN, D. C. Linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from hospitalized patients in Ireland: high prevalence of the MDR genes *optrA* and *poxA* in isolates with diverse genetic backgrounds. **J Antimicrob Chemother**, v. 75, n. 7, p. 1704-1711, 2020.

EL AMIN, N. A.; JALAL, S.; WRETLIND, B. Alterations in *GyrA* and *ParC* associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 4, p. 947-949, 1999.

ESFAHANI, S.; AHMADRAJABI, R.; MOLLAEI, H.; SAFFARI, F. Co-Incidence of Type II Topoisomerase Mutations and Efflux Expression in High Fluoroquinolone Resistant. **Infect Drug Resist**, v. 13, p. 553-559, 2020.

ESPÍNDOLA, L. P.; DO NASCIMENTO, M.V. M.R.; DO SOUTO, R. M.; COLOMBO, A. P. V. Antimicrobial susceptibility and virulence of *Enterococcus* spp. isolated from periodontitis-associated subgingival biofilm. **J Periodontol**, p. JPER.20-0815, 2021.

FACKLAM, R. R.; CARVALHO, M. G. S.; TEIXEIRA, L. M. History, Taxonomy, Biochemical Characteristics and Antibiotic Susceptibility Testing of *Enterococci*. In: GILMORE, M. S. (Ed.). **The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance**. Washington: ASM Press, p. 1-54, 2002.

FERGUSON, D. M.; TALAVERA, G. N.; HERNÁNDEZ, L. A.; WEISBERG, S. B.; AMBROSE, R. F.; JAY, J. A. Virulence Genes among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Coastal Beaches and Human and Nonhuman Sources in Southern California and Puerto Rico. **J Pathog**, v. 2016, p. 1–7, 2016.

FERNÁNDEZ-HIDALGO, N.; ESCOLÀ-VERGÉ, L. *Enterococcus faecalis* Bacteremia: Consider an Echocardiography, But Consult an Infectious Diseases Specialist. **J Am Coll Cardiol**, v. 74, n. 2, p. 202-204, 2019.

FLAMM, R. K.; MENDES, R. E.; HOGAN, P. A.; STREIT, J. M.; ROSS, J. E.; JONES, R. N. Linezolid Surveillance Results for the United States (LEADER Surveillance Program 2014). **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, n. 4, p. 2273-2280, 2016.

FURLAN, J.P.R.; SANTOS, L.D.R.; MORETTO, J.A.S.; RAMOS, M.S.; GALLO, I.F.L.; ALVES, G.A.D.; PAULELLI, A.C.; ROCHA, C.C.S.; CESILA, C.A.; GALLIMBERTI, M.; DEVÓZ, P.P.; JÚNIOR, F.B.; STEHLING, E.G. Occurrence and abundance of clinically relevant antimicrobial resistance genes in environmental samples after the Brumadinho dam disaster, Brazil. **Sci Total Environ**, v. 726, p. 138100, 2020.

GAGETTI, P.; BONOFILIO, L.; GARCÍA GABARROT, G.; KAUFMAN, S.; MOLLERACH, M.; VIGLIAROLO, L.; VON SPECHT, M.; TORESANI, I.; LOPARDO, H. A. Resistance to β -lactams in *enterococci*. **Rev Argent Microbiol**, v. 51, n. 2, p. 179-183, 2019.

GALLOWAY-PEÑA, J.; ROH, J. H.; LATORRE, M.; QIN, X.; MURRAY, B.E. Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium*. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30187, 2012.

GAO, W.; HOWDEN, B. P.; STINEAR, T. P. Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. **Curr Opin Microbiol**, v. 41, p. 76-82, 02 2018.

GARCÍA-SOLACHE, M.; RICE, L. B. The *Enterococcus*: A Model of Adaptability to Its Environment. **Clin Microbiol Rev**, v. 32, n. 2, 2019.

GARNICA, M. L.; VALDEZATE, S.; GONZALO, C.; SAEZ-NIETO, J. A. Presence of the *vanCI* gene in a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from ewe bulk tank milk. **J Med Microbiol**, v. 62, n. Pt 3, p. 494-495, 2013.

GILMORE, M. S.; CLEWELL, D. B.; IKE, Y.; SHANKAR, N. **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**. In, 2014.

GILMORE, M. S.; LEBRETON, F.; VAN SCHAIK, W. Genomic transition of *enterococci* from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. **Curr Opin Microbiol**, v. 16, n. 1, p. 10-16, 2013.

GOLIŃSKA, E.; TOMUSIAK, A.; GOSIEWSKI, T.; WIĘCEK, G.; MACHUL, A.; MIKOŁAJCZYK, D.; BULANDA, M.; HECZKO, P. B.; STRUS, M. Virulence factors of *Enterococcus* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. **J Gastroenterol**. v.19, n.23, p 3562-3572, 2013.

GOLOB, M.; PATE, M.; KUŠAR, D.; DERMOTA, U.; AVBERŠEK, J.; PAPIĆ, B.; ZDOVC, I. Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from Humans and Retail Red Meat. **Biomed Res Int**, v. 2019, p. 2815279, 2019.

GOTKOWSKA-PLACHTA, A. The Prevalence of Virulent and Multidrug-Resistant Enterococci in River Water and in Treated and Untreated Municipal and Hospital Wastewater. **Int J Environ Res Public Health**, v. 18, n. 2, 01 2021.

GUERRERO-RAMOS, E.; CORDERO, J.; MOLINA-GONZÁLEZ, D.; POETA, P.; IGREJAS, G.; ALONSO-CALLEJA, C.; CAPITA R. Antimicrobial resistance and virulence genes in *enterococci* from wild game meat in Spain. **Food Microbiol**, v. 53, p. 156–164, 2016.

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

HAMIWE, T.; KOCK, M. M.; MAGWIRA, C. A.; ANTIABONG, J. F. Occurrence of *enterococci* harbouring clinically important antibiotic resistance genes in the aquatic environment in Gauteng, South Africa. **Environ Pollut**, v. 245, p. 1041-1049, 2019.

HEALTH CANADA (2019). Guidance on the use of *Enterococci* bacteria as indicators in Canadian drinking water supplies – **Guidance Document for Public Consultation**. Consultation period ends January 25, 2019. Disponível em: <https://www.canada.ca/en/health-canada/programs/consultation-enterococci-drinking-water/document.html>. Acesso em: 22. abr. 2021.

HENDRICKX, A. P.; VAN SCHAIK, W.; WILLEMS, R. J. The cell wall architecture of *Enterococcus faecium*: from resistance to pathogenesis. **Future Microbiol**, v. 8, n. 8, p. 993-1010, 2013.

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

IGBINOSA, E. O.; BESHIRU, A. Antimicrobial Resistance, Virulence Determinants, and Biofilm Formation of *Enterococcus* Species From Ready-to-Eat Seafood. **Front Microbiol**, v. 10, p. 728, 2019.

JAHANSEPAS, A.; SHARIFI, Y.; AGHAZADEH, M.; AHANGARZADEH REZAEI, M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated

from clinical samples and traditional cheese types in the Northwest of Iran: antimicrobial susceptibility and virulence traits. **Arch Microbiol**, v. 202, n. 4, p. 765-772, 2020.

JOHANSON, J. J.; FERIANCIKOVA, L.; XU, S. Influence of enterococcal surface protein (*esp*) on the transport of *Enterococcus faecium* within saturated quartz sands. **Environ Sci Technol**, v. 46, n. 3, p. 1511–1518, 2012.

KALINA A. P. The position of *enterococci* in the system of microorganisms. **Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol**, v. 47, n. 6, p. 20–21, jun. 1970.

KE, D.; FRANÇOIS, J.P.; FRANCIS, M.; CHRISTIAN, M.; PAUL, H.R.; MARC, O.; MICHEL, G.B. Development of a PCR assay for rapid detection of *Enterococci*. **J Clin Microbiol**. v. 37, n. 11, p. 3497–3503, 1999.

KIM, Y. B.; SEO, H. J.; SEO, K. W.; JEON, H. Y.; KIM, D. K.; KIM, S. W.; LIM, S. K.; LEE, Y. J. Characteristics of High-Level Ciprofloxacin-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from Retail Chicken Meat in Korea. **J Food Prot**, v. 81, n. 8, p. 1357-1363, 2018.

KIM, Y. B.; SEO, K. W.; JEON, H. Y.; LIM, S. K.; SUNG, H. W.; LEE, Y. J. Molecular characterization of erythromycin and tetracycline-resistant *Enterococcus faecalis* isolated from retail chicken meats. **Poult Sci**, v. 98, n. 2, p. 977-983, 2019.

KIRUTHIGA, A.; PADMAVATHY, K.; SHABANA, P.; NAVEENKUMAR, V.; GNANADESIKAN, S.; MALAIYAN, J. Improved detection of *esp*, *hyl*, *asal*, *gelE*, *cylA* virulence genes among clinical isolates of *Enterococci*. **BMC Res Notes**, v. 13, n. 1, p. 170, 2020.

KOBAYASHI, N.; ALAM, M.; NISHIMOTO, Y.; URASAWA, S.; UEHARA, N.; WATANABE, N. 2001. Distribution of aminoglycoside resistance genes in recent clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus avium*. **Epidemiol. Infect.** v. 126, n. 2, p. 197–204, 2001.

KRISTICH, C. J.; RICE, L. B.; ARIAS, C. A. *Enterococcal* infection—Treatment and antibiotic resistance. In M. S. Gilmore, D. B. Clewell, Y. Ike, & N. Shankar (Orgs.), **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

KUCH, A.; WILLEMS, R. J.; WERNER, G.; COQUE, T. M.; HAMMERUM, A. M.; SUNDSFJORD, A.; KLARE, I.; RUIZ-GARBAJOSA, P.; SIMONSEN, G. S.; VAN LUIT-ASBROEK, M.; HRYNIEWICZ, W.; SADOWY, E. Insight into antimicrobial susceptibility and population structure of contemporary human *Enterococcus faecalis* isolates from Europe. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 3, p. 551-558, 2012.

LEAVIS, H. L.; WILLEMS, R. J.; VAN WAMEL, W. J.; SCHUREN, F. H.; CASPERS, M. P.; BONTEN, M. J. 2007. Insertion sequence-driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faecium*. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 1, p. e7, 2007.

LEBRETON, F.; VAN SCHAIK, W.; MCGUIRE, A. M.; GODFREY, P.; GRIGGS, A.; MAZUMDAR, V.; CORANDER, J.; CHENG, L.; SAIF, S.; YOUNG, S.; ZENG, Q.; WORTMAN, J.; BIRREN, B.; WILLEMS, R. J.; EARL, A. M.; GILMORE, M. S. Emergence of epidemic multidrug resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains **MBio**, v. 4, n. 4, p. e00534-13, 2013

LEBRETON, F.; WILLEMS, R. J. L.; GILMORE, M. S. *Enterococci*: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection: *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. Boston: Massachusetts **Eye And Ear Infirmary**, 2014.

LECLERCQ, R.; DUTKA-MALEN, S.; DUVAL, J.; COURVALIN, P. Vancomycin resistance gene *vanC* is specific to *Enterococcus gallinarum*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, n. 9, p. 2005-2008, 1992.

LEE, S.M.; HUH, H.J.; SONG, D.J.; SHIM, H.J.; PARK, K.S.; KANG, C.I.; KI, C. S.; LEE, N. Y. Resistance mechanisms of linezolid-non susceptible *Enterococci* in Korea: low rate of 23S rRNA mutations in *Enterococcus faecium* . **J Med Microbiol** v. 66, n. 12, p. 1730–1735, 2017.

LEE, T.; PANG, S.; ABRAHAM, S.; COOMBS, G. W. Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: The past, the present and the future. **J Glob Antimicrob Resist.** v. 16, p. 36–47, 2019.

LEGGETT, J. E. Aminoglycosides. **Infectious Diseases** (Fourth Edition), v.2, pp. 1233-1238, 2017.

LEVINE, D. P. Vancomycin: A History. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 1, p. S5–S12, 2006.

LOCKE, J. B.; ZURENKO, G. E.; SHAW, K. J.; BARTIZAL, K. Tedizolid for the management of human infections: in vitro characteristics. **Clin Infect Dis**, v. 58, p. S35-42, 2014.

LUGOGO, N.; QUE, L. G.; GILSTRAP, D. L.; KRAFT, M. A. Murray and Nadel's Textbook of **Respiratory Medicine**. [S. l.]: Elsevier, p. 731-750, 2016.

MAASJOST, J.; LÜSCHOW, D.; KLEINE, A.; HAFEZ, H.M.; MÜHLDORFER, K. Presence of Virulence Genes in *Enterococcus* Species Isolated from Meat Turkeys in Germany Does Not Correlate with Chicken Embryo Lethality. **Bio Med Research International**, v. 2019, p. 1–10, 2019.

MACCALLUM, W.G.; HASTINGS, T. W. A case of acute endocarditis caused by *micrococcus zymogenes* (nov. spec.), with a description of the microorganism. **J Exp Med**, v. 4, n. 5-6, p. 521-34, 1899.

MACEDO, A. S.; FREITAS, A. R.; ABREU, C.; MACHADO, E.; PEIXE, L.; SOUSA, J. C.; NOVAIS, C. Characterization of antibiotic resistant *enterococci* isolated from untreated waters for human consumption in Portugal. **Int J Food Microbiol**, v. 145, n. 1, p. 315-319, 2011.

- MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J.F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D.L.; RICE, L.B.; STELLING, J.; STRUELENS, M.J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J.T.; MONNET, D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect.** v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012
- MANNU, L.; PABA, A.; DAGA, E.; COMUNIAN, R.; ZANETTI, S.; DUPRÈ, I.; SECHI, L. A. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **Int J Food Microbiol**, v. 88, n. 2-3, p. 291-304, 2003.
- MARKWART, R.; WILLRICH, N.; HALLER, S.; NOLL, I.; KOPPE, U.; WERNER, G.; ECKMANN, T.; REUSS, A. The rise in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Germany: data from the German Antimicrobial Resistance Surveillance (ARS). **Antimicrob Resist Infect Control**, v. 8, p. 147, 2019.
- MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F.; PIGNATARI, A. C.; SUKIENNIK, T.; BEHAR, P. R.; MEDEIROS, E. A.; RIBEIRO, J.; GIRÃO, E.; CORREA, L.; GUERRA, C.; BRITES, C.; PEREIRA, C. A.; CARNEIRO, I.; REIS, M.; SOUZA, M.; TRANCHESI, R.; BARATA, C.; EDMOND, M. B.; BRAZILIAN SCOPE STUDY GROUP. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **J Clin Microbiol.** v. 49, n.5, p. 1866-1871, 2011.
- MARTINS, A.; SILVA, R.A.; FERREIRA, L.O.; LICATE, M. M.; DELAFIORI, C. R.; PÔRTO, S.F. Resistência a antimicrobianos de enterobactérias isoladas de águas destinadas ao abastecimento público na região centro-oeste do estado de São Paulo, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 10, n. 0, 2019.
- MILLER, W. R.; MUNITA, J.M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Enterococci*. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 12, n. 10, p. 1221–1236, 2014.
- MILLER, W. R.; MURRAY, B. E.; RICE, L. B.; ARIAS, C. A. Vancomycin-Resistant *Enterococci*: Therapeutic Challenges in the 21st Century. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 2, p. 415-439, 2016.
- MOELLERING, R.C. Linezolid: The First Oxazolidinone Antimicrobial. **Annals of Internal Medicine**, v. 139, n. 10, p. 864, 2003.
- MOLECHAN, C., AMOAKO, D.G., ABIA, A.L.K., SOMBORO, A.M., BESTER, L.A. AND ESSACK, S.Y. Molecular epidemiology of antibiotic-resistant *Enterococcus* spp. From the farm-to-fork continuum in intensive poultry production in KwaZulu-Natal, South Africa. **Sci Total Environ** v. 692, p. 868–878, 2019.
- MONTEIRO, S.; SANTOS, R. Incidence of *enterococci* resistant to clinically relevant antibiotics in environmental waters and in reclaimed waters used for irrigation. **J Water Health**, v.18, n. 6, p. 911-924, 2020.
- MOURA, T. M.; CASSENEGO, A. P.; CAMPOS, F. S.; RIBEIRO, A. M.; FRANCO, A. C.; D'AZEVEDO, P. A.; FRAZZON, J.; FRAZZON, A. P. Detection of *vanCl* gene transcription

in vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 4, p. 453-456, 2013.

MOUSSA, A. A.; MD NORDIN, A. F.; HAMAT, R. A.; JASNI, A. S. High level aminoglycoside resistance and distribution of the resistance genes. **Infect Drug Resist**, v. 12, p. 3269-3274, 2019.

MUKHERJEE, K.; TRIBEDI, P.; CHOWDHURY, A.; RAY, T.; JOARDAR, A.; GIRI, S.; SIL, AK. Isolation of a *Pseudomonas aeruginosa* strain from soil that can degrade polyurethane diol. **Biodegradation**, v. 22, n. 2, p. 377-388, 2011

MURRAY, B. E. Life and times of the *Enterococcus*. **Clin Microbiol Rev**, v.3, p.46-65, 1990.

NAGARAJAN, R. Antibacterial activities and modes of action of vancomycin and related glycopeptides. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 35, n. 4, p. 605-609,1991.

NAHA, A.; KUMAR MIRYALA, S.; DEBROY, R.; RAMAIAH, S.; ANBARASU, A. Elucidating the multi-drug resistance mechanism of *Enterococcus faecalis* V583: A gene interaction network analysis. **Gene**, v. 748, p. 144704, 2020.

NALLAPAREDDY, S. R.; WEINSTOCK, G. M.; MURRAY, B. E. Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by *acm*, a new member of the MSCRAMM family. **Mol Microbiol**, v. 47, n. 6, p. 1733-1747, 2003.

OLIVEIRA, E. S.; FREITAS, A. R.; PEIXE, L.; NOVAIS, C.; MELO, M. C. Silent clonal spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* ST6 and ST525 colonizing patients at hospital admission in Natal, Brazil. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 41, n. 4, p. 485-487, 04 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente**, 2017.

ORLA-JENSEN S. The lactic acid bacteria. Memoirs of the Academy of the Royal Society of Denmark. **Section of Sciences Series**, v. 197, p.85:81, 1919.

PATEL, R.; UHL, J. R.; KOHNER, P.; HOPKINS, M. K.; COCKERILL, F. R. Multiplex PCR detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes in *enterococci*. **J Clin Microbiol**, 35, n. 3, p. 703-707, Mar 1997.

PILLAY, S.; ZISHIRI, O. T.; ADELEKE, M. A. Prevalence of virulence genes in *Enterococcus* species isolated from companion animals and livestock. **Onderstepoort J Vet Res**, v. 85, n. 1, p. e1-e8, 2018.

PORTILLO, A.; RUIZ-LARREA, F.; ZARAZAGA, M.; ALONSO, A.; MARTINEZ, J. L.; TORRES, C. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 4, p. 967-971, 2000.

PRIETO, A. G. M.; VAN SCHAİK, W.; ROGERS, M. R.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; CORANDER, J.; WILLEMS, R. J. Global Emergence and Dissemination of *Enterococci* as Nosocomial Pathogens: Attack of the Clones? **Front Microbiol**, v. 7, p. 788, 2016.

REYNOLDS, P. E. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 8, n. 11, p. 943-950, 1989.

RICE, L. B.; BELLAIS, S.; CARIAS, L. L.; HUTTON-THOMAS, R.; BONOMO, R. A.; CASPERS, P.; PAGE, M. G.; GUTMANN, L. Impact of specific *pbp5* mutations on expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 8, p. 3028-3032, 2004.

RIPA, L.; FEßLER, A. T.; HANKE, D.; SANZ, S. Detection of *poxTA*- and *optrA*-carrying *E. faecium* isolates in air samples of a Spanish swine farm. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 22, p. 28-31, 2020.

ROBERTS, M.C.; NO, D.B.; MARZLUFF, J.M.; DELAP, J.H.; TURNER, R. Vancomycin resistant *Enterococcus* spp. from crows and their environment in metropolitan Washington State, USA: Is there a correlation between VRE positive crows and the environment? **Vet Microbiol** v. 194, p. 48–54, 2016.

RODRIGUES, C.; CUNHA, M.Â. Assessment of the microbiological quality of recreational waters: indicators and methods. **Euro-Mediterr J Environ Integr**, v. 2, n. 1, p. 25, 2017.

ROTHENHEBER, D.; JONES, S. *Enterococcal* Concentrations in a Coastal Ecosystem Are a Function of Fecal Source Input, Environmental Conditions, and Environmental Sources. **Appl Environ Microbiol**, v. 84, n. 17, p. 09, 2018.

RYBAK, M. J. The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of vancomycin. **Clin Infect Dis**, v. 42, n. 1, p. S35-39, 2006.

SACRAMENTO, A. G.; ZANELLA, R. C.; ESPOSITO, F.; COSTA, E. A. S.; DE ALMEIDA, L. M.; PIRES, C.; DE BRITO, A. C.; MAMIZUKA, E. M.; CERDEIRA, L. T.; LINCOPAN, N. SACRAMENTO, A. G.; ZANELLA, R. C.; ESPOSITO, F.; COSTA, E. A. S. *et al.* Changed epidemiology during intra and interhospital spread of high-risk clones of *vanA*-containing *Enterococcus* in Brazilian hospitals. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 88, n. 4, p. 348-351, 2017.

SANTOS, B. A.; OLIVEIRA, J. S.; CARDOSO, N. T.; BARBOSA, A. V.; SUPERTI, S. V.; TEIXEIRA, L. M.; NEVES, F. P. G. Major globally disseminated clonal complexes of antimicrobial resistant *enterococci* associated with infections in cancer patients in Brazil. **Infect Genet Evol**, 55, p. 56-62, 2017.

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. **I Journ of Systematic and Evolut Microbiol**. v. 34, n. 1, p. 31–34, 1984.

SCHWAIGER, K.; BAUER, J.; HÖRMANSDORFER, S.; MÖLLE, G.; PREIKSCHAT, P.; KÄMPF, P.; BAUER-UNKAUF, I.; BISCHOFF, M.; HÖLZEL, C. Presence of the resistance

genes *vanCI* and *pbp5* in phenotypically vancomycin and ampicillin susceptible *Enterococcus faecalis*. **Microb Drug Resist**, v.18, n. 4, p. 434-439, 2012.

SCHWARZ, S.; WERCKENTHIN, C.; KEHRENBERG, C. Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 9, p. 2530-2533, 2010.

SEPÚLVEDA, M.; BELLO, H.; DOMÍNGUEZ, M.; MELLA, S.; ZEMELMAN, R.; GONZÁLEZ G. Molecular identification of aminoglycoside-modifying enzymes among strains of *Enterococcus* spp. isolated in hospitals of the VIII Region of Chile. **Rev Med Chil**, v. 135, p. 566-572, 2007.

SHARIFZADEH PEYVASTI, V.; MOHABATI MOBAREZ, A.; SHAHCHERAGHI, F.; KHORAMABADI, N.; RAZAZ RAHMATI, N.; HOSSEINI DOUST, R. High-level aminoglycoside resistance and distribution of aminoglycoside resistance genes among *Enterococcus* spp. clinical isolates in Tehran, Iran. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 20, p. 318-323, 2020.

SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Antibiotic-resistant *enterococci*: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes Infect**, v. 4, n. 2, p. 215-24, 2002.

SHETE, V.; GROVER, N.; KUMAR, M. Analysis of Aminoglycoside Modifying Enzyme Genes Responsible for High-Level Aminoglycoside Resistance among *Enterococcal* Isolates. **J Pathog**, v. 2017, p. 3256952, 2017.

SHIADEH, S. M. J.; HASHEMI, A.; FALLAH, F.; LAK, P.; AZIMI, L.; RASHIDAN, M. First detection of *efrAB*, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis* in Tehran, Iran. **Acta Microbiol Immunol Hung**, v. 66, n. 1, p. 57-68, 2019.

SHINABARGER, D. L.; MAROTTI, K. R.; MURRAY, R. W.; LIN, A. H.; MELCHIOR, E. P.; SWANEY, S. M.; DUNYAK, D. S.; DEMYAN, W. F.; BUYSSE, J. M. Mechanism of action of oxazolidinones: effects of linezolid and eperezolid on translation reactions. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 10, p. 2132-2136, 1997.

SHRIDHAR, S.; DHANASHREE, B. Antibiotic Susceptibility Pattern and Biofilm Formation in Clinical Isolates of *Enterococcus* spp. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, v. 2019, p. 7854968, 2019.

SOARES, R.O.; CUNHA, G.R.; PEREZ, V.P.; SIQUEIRA, J.L.; SAMBRANO, G.E.; PAIM, T.G.; CALJON, G.; CAIERÃO, J.; COS P, D'AZEVEDO P.A. High diversity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated in Southern Brazil. **PeerJ Preprints**, 27817v1. 2019.

SUN, M.; WANG, Y.; CHEN, Z.; ZHU, X.; TIAN, L.; SUN, Z. The first report of the *vanCI* gene in *Enterococcus faecium* isolated from a human clinical specimen. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v. 109, p. 712–715, 2014.

SURYALETHA, K.; CHANDRIKA, S. K.; THOMAS, S. Comprehensive genomics depict accessory genes encoding pathogenicity and biofilm determinants in *Enterococcus faecalis*. **Future Microbiol**, v. 16, n. 3, p. 175–184, 2021.

SUTCLIFFE, J.; GREBE, T.; TAIT-KAMRADT, A.; WONDRACK, L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 40, n. 11, p. 2562-2566, 1996.

THIERCELIN, M. E.; JOUHAUD, L. Sur un *diplocoque* saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène. **CR Soc. Biol**, v. 1899; p. 269–271, 1899.

THU, W. P.; SINWAT, N.; BITRUS, A. A.; ANGKITTITRAKUL. Prevalence, antimicrobial resistance, virulence gene, and class 1 integrons of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from pigs, pork and humans in Thai-Laos border provinces. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 18, p. 130-138, 2019.

TIAN, Y.; YU, H.; WANG, Z. Distribution of acquired antibiotic resistance genes among *Enterococcus* spp. isolated from a hospital in Baotou, China. **BMC Res Notes**, v. 12, n. 1, p. 27, Jan 2019.

TOH, S. M.; XIONG, L.; ARIAS, C. A.; VILLEGAS, M. V.; LOLANS, K.; QUINN, J.; MANKIN, A. S. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. **Mol Microbiol**, v. 64, n. 6, p. 1506-1514, 2007.

VAKULENKO, S.B.; DONABEDIAN, S.M.; VORKRESENS- KIY, A.M.; ZERVOS, M.J.; LERNER, M.A.; CHOW, J.W. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in *Enterococci*, **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, p. 1423-1426, 2003.

VAN DE KLUNDERT, J.A.; Vliegenthart, J.S. PCR detection of genes coding for aminoglycoside modifying enzymes. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors. Diagnostic molecular epidemiology. **Washington: American Society for Microbiology**, p. 547-52, 1993.

VAN HARTEN, R. M.; WILLEMS, R. J. L.; MARTIN, N. I.; HENDRICKX, A. P. A. Multidrug-Resistant *Enterococcal* Infections: New Compounds, Novel Antimicrobial Therapies? **Trends Microbiol**, v. 25, n. 6, p. 467-479, 2017.

VAN REENEN, C.A.; DICKS, L.M. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? **Arch Microbiol**, v. 193, p. 157-168, 2011.

VANKERCKHOVEN, V.; VAN AUTGAERDEN, T.; VAEL, C.; LAMMENS, C.; CHAPELLE, S.; ROSSI, R.; JABES, D.; GOOSSENS, H. Development of a multiplex PCR for the detection of *asaI*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in *Enterococci* and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium* **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 4473-4479, 2004.

VIGNAROLI, C.; PASQUAROLI, S.; CITTERIO, B.; DI CESARE, A.; MANGIATERRA, G.; FATTORINI, D.; BIAVASCO, F. Antibiotic and heavy metal resistance in *enterococci* from coastal marine sediment. **Environ Pollut**, v. 237, p. 406-413, 2018.

WANG, Y.; LV, Y.; CAI, J.; SCHWARZ, S.; CUI, L.; HU, Z.; ZHANG, R.; LI, J.; ZHAO, Q.; HE, T.; WANG, D.; WANG, Z.; SHEN, Y.; LI, Y.; FEßLER, A. T.; WU, C.; YU, H.;

DENG, X.; XIA, X.; SHEN, J. A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. **J Antimicrob Chemother**, v. 70, n. 8, p. 2182-2190, 2015.

WEISBLUM, B. Erythromycin resistance by ribosome modification. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 39, n. 3, p. 577–585, 1 mar. 1995.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 697-703, 1991.

WILLEMS, R. J.; TOP, J.; VAN DEN BRAAK, N.; VAN BELKUM, A.; MEVIUS, D. J.; HENDRIKS, G.; VAN SANTEN-VERHEUVEL, M.; VAN EMBDEN, J. D. Molecular diversity and evolutionary relationships of Tn1546-like elements in *enterococci* from humans and animals. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 43, p. 483–491, 1999.

WU, Y.; FAN, R.; WANG, Y.; LEI, L.; FEßLER, A. T.; WANG, Z.; WU, C.; SCHWARZ, S. Analysis of combined resistance to oxazolidinones and phenicols among bacteria from dogs fed with raw meat/vegetables and the respective food items. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 15500, 2019.

YOUNG, S.; ROHR, J. R.; HARWOOD, V. J. Vancomycin resistance plasmids affect persistence of *Enterococcus faecium* in water. **Water Res**, v. 166, p. 115069, 2019.

ZAHEER, R.; COOK, S. R.; BARBIERI, R.; GOJI, N.; CAMERON, A.; PETKAU, A.; POLO, R. O.; TYMENSEN, L.; STAMM, C.; SONG, J.; HANNON, S.; JONES, T.; CHURCH, D.; BOOKER, C. W.; AMOAKO, K.; VAN DOMSELAAR, G.; READ, R.R.; MCALLISTER, T.A. Surveillance of *Enterococcus* spp. reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One-Health continuum. **Sci Rep**, v. 10, n. 1, p. 3937, 2020.

ZANELLA, R. C.; BRANDILEONE, M. C.; BOKERMANN, S.; ALMEIDA, S. C.; VALDETARO, F.; VITÓRIO, F.; MOREIRA, M.E F; VILLINS, M.; SALOMÃO, R. PIGNATARI, A. C. Phenotypic and Genotypic Characterization of *vanA* *Enterococcus* Isolated During the First Nosocomial Outbreak in Brazil. **Microb Drug Resist**, v. 9, p. 283–291, 2003.

ZANETTI, M.O.; MARTINS, V.V.; PITONDO-SILVA, A.; STEHLING, E.G. Antimicrobial resistance, plasmids and class 1 and 2 integrons occurring in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Brazilian aquatic environments. **Water Sci Technol**, v. 67, n. 5, p. 1144-1149, 2013.

ZHANG, Y.; DONG, G.; LI, J.; CHEN, L.; LIU, H.; BI, W.; LU, H.; ZHOU, T. A high incidence and coexistence of multiresistance genes *cfi* and *optrA* among linezolid-resistant *enterococci* isolated from a teaching hospital in Wenzhou, China. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 37, n. 8, p. 1441-1448, 2018.

ZHAO, Q.; WANG, Y.; WANG, S.; WANG, Z.; DU, X. D.; JIANG, H.; XIA, X.; SHEN, Z.; DING, S.; WU, C.; ZHOU, B.; WU, Y.; SHEN, J. Prevalence and Abundance of Florfenicol

and Linezolid Resistance Genes in Soils Adjacent to Swine Feedlots. **Sci Rep**, v. 6, p. 32192, 2016.

ZHONG, Z.; KWOK, L. Y.; HOU, Q.; SUN, Y.; LI, W.; ZHANG, H.; SUN, Z. Comparative genomic analysis revealed great plasticity and environmental adaptation of the genomes of *Enterococcus faecium*. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 602, 2019.

ZHOU, W.; GAO, S.; XU, H.; ZHANG, Z.; CHEN, F.; SHEN, H.; ZHANG, C. Distribution of the *optA* gene in *Enterococcus* isolates at a tertiary care hospital in China. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 17, p. 180-186, 2019.

