



**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  
*Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium***

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.  
21p.: 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. 21f. 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. 21f. 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 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 <sub>2</sub>	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
nº	Número
nm	Nanómetro
%	Porcento
™	Trademark

## SUMÁRIO

<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	iii
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	iv
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	2
<b>1.1 <i>Enterococcus</i> spp.</b> .....	2
1.1.1 <i>Enterococcus faecalis</i> .....	3
1.1.2 <i>Enterococcus faecium</i> .....	4
1.2 <i>Enterococcus</i> spp. no meio ambiente .....	4
1.3 Resistência aos antimicrobianos.....	5
1.3.1 $\beta$ -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
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	14
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	15

# 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 micro-organismos 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 (PRIETRO *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; PRIETRO *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-PENÑA *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 intrinsicamente 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  $\beta$ -lactâmicos, glicopeptídeos, macrolídeos, tetraciclina, fluorquinolonas, aminoglicosídeos e oxazolidinonas (GUERRERO-RAMOS *et al.*, 2016; GOTKOWSKA-PLACHTA, 2021).

### 1.3.1 $\beta$ -lactâmicos

Os  $\beta$ -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  $\beta$ -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 (DUTKA-MALEN *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<sub>B</sub> (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 (*cfr-like*) e bombas de efluxo (*mef-like*), também são descritos nos *Enterococcus* (Tabela 1) (WEISBLUM, 1995; MILLER *et al.*, 2014).

### 1.3.4 Tetraciclínas

As tetraciclínas 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 tetraciclínas, esses antimicrobianos tiveram a sua utilização de forma indiscriminada na clínica médica e veterinária, e conseqüentemente, a resistência a esses antimicrobianos está se tornando cada vez mais comum (CHOI & WOO, 2015). Alguns genes de resistência às tetraciclínas (*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 pertencente a 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
<b>β-lactâmicos</b>	<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> )	
<b>Glicopeptídeos</b>	<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
<b>Macrolídeos</b>	<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	
<b>Tetraciclina</b>	<i>tetM, tetO, tetS</i>	Proteção Ribossomal	MILLER <i>et al.</i> , 2014;
	<i>tetK, tetL</i>	Bomba de efluxo	CHOPRA & ROBERTS, 2001
<b>Fluorquinolonas</b>	<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	
<b>Fenicóis</b>	<i>cfr-like</i>	Mutações no gene 23S rRNA	DESHPANDE <i>et al.</i> , 2018; WU <i>et al.</i> , 2019
<b>Amonoglicosídeos</b>	<i>aph-like</i>	Enzimático (fosfotransferase)	MILLER <i>et al.</i> , 2014;
	<i>aac-like</i>	Enzimático (acetiltransferase)	
	<i>ant-like</i>	Enzimático (nucleotidiltransferase)	
<b>Oxazolidinona</b>	<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).

## 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 tetraciclina (*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

- 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.
- 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.
- 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, pp. 266–278, 2012.
- 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.
- 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.
- COURVALIN, P. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. **Clin Infect Diseases**, v. 42, n. 1, p. S25–S34, 2006.
- 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.

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.

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.

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.

GAGETTI, P.; BONOFILIO, L.; GARCÍA GABARROT, G.; KAUFMAN, S.; MOLLERACH, M.; VIGLIAROLO, L.; VON SPECHT, M.; TORESANI, I.; LOPARDO, H. A. Resistance to  $\beta$ -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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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 ClinMicrobiol**. v. 49, n.5, p. 1866-1871, 2011.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

