

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA INTERUNIDADES DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOINFORMÁTICA

Thuanny Martins Santana Silva

ANÁLISE GENÔMICA DE ISOLADOS DE *Enterococcus faecalis*
PROVENIENTES DE ANIMAIS SILVESTRES DO PARQUE NACIONAL DO
CATIMBAU

BELO HORIZONTE – MG

2025

Thuanny Martins Santana Silva

**ANÁLISE GENÔMICA DE ISOLADOS DE *Enterococcus faecalis*
PROVENIENTES DE ANIMAIS SILVESTRES DO PARQUE NACIONAL DO
CATIMBAU**

Dissertação apresentada ao Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioinformática.

ORIENTADORA: Prof.^a Flávia Figueira Aburjaile

BELO HORIZONTE – MG

2025

043

Silva, Thuanny Martins Santana.

Análise genômica de isolados de *Enterococcus faecalis* provenientes de animais silvestres do Parque Nacional do Catimbau [manuscrito] / Thuanny Martins Santana Silva. – 2025.

111 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof.^a Flávia Figueira Aburjaile.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática.

1. Bioinformática. 2. Monitoramento Epidemiológico. 3. Virulência. 4. Genes MDR. 5. Resistência Microbiana a Medicamentos. 6. Saúde Pública. I. Aburjaile, Flávia Figueira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 573:004



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thuanny Martins Santana Silva

"Análise Genômica de Isolados de *Enterococcus Faecalis* Provenientes de Animais Silvestres do Parque Nacional do Catimbau"

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa Flavia Figueira Aburjaile - Orientadora
UFMG

Prof. Wanderson Marques da Silva
CONICET/UBA

Prof. José Miguel Ortega
UFMG

Belo Horizonte, 31 de julho de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Wanderson Marques Da Silva, Usuário Externo**, em 31/07/2025, às 17:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jose Miguel Ortega, Servidor(a)**, em 01/08/2025, às 10:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flávia Figueira Aburjaile, Professora do Magistério Superior**, em 04/08/2025, às 11:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4417157** e o código CRC **6B24BF15**.

Referência: Processo nº 23072.246053/2025-93

SEI nº 4417157

Dedico este trabalho à minha família, minha
alegria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre me abençoar e sempre me manter de pé, firme, mesmo quando as circunstâncias tentaram me desanimar.

Agradeço aos meus pais, Bosco e Rosemary, por me amarem incondicionalmente, por nunca duvidarem da minha capacidade e sempre me apoiarem.

Agradeço à minha irmã, Daviany, minha dose de alegria diária. Amo você mais que tudo!

Agradeço à minha orientadora, Prof.^a Flávia Figueira Aburjaile, pela orientação, paciência e acolhimento durante minha passagem pelo LBI.

Agradeço aos meus colegas de laboratório por toda a ajuda e contribuições para a realização deste trabalho.

Agradeço ao corpo docente pelas aulas e pela transmissão de conhecimento.

Agradeço à UFMG, pelo ensino de qualidade.

“Raízes profundas não são atingidas pela geada.” (J. R. R. Tolkien)

RESUMO

Ambientes naturais, especialmente aqueles com pouco ou moderado impacto por atividades antropogênicas, têm despertado interesse como possíveis reservatórios de microrganismos potencialmente patogênicos. No contexto da resistência antimicrobiana, compreender o papel desses ecossistemas na manutenção e disseminação de genes de resistência e fatores de virulência é fundamental para a saúde pública. Este estudo teve como objetivo realizar a caracterização genômica de três linhagens de *Enterococcus faecalis* isoladas de animais silvestres do Parque Nacional do Catimbau, em Pernambuco, Brasil. As amostras, coletadas por *swabs* retais e otológicos, foram confirmadas como multirresistentes por antibiograma, apresentando resistência a mais de quatro classes distintas de antibióticos. O sequenciamento genômico e a análise de identidade média de nucleotídeos (ANI > 95%) confirmaram a espécie. A análise filogenômica revelou que os isolados deste estudo se agruparam com amostras oriundas de humanos e bovinos, e os demais agrupamentos não indicaram correlação direta de acordo com o hospedeiro e/ou região geográfica. Foram identificados 22 genes de virulência relacionados à adesão, formação de biofilme, imunomodulação e exotoxinas, evidenciando o potencial patogênico das amostras. Cinco genes de resistência (*dfrE*, *emeA*, *ireK*, *lsaA*, *efrA*), presentes em todas as amostras estão associados a mecanismos como bombas de efluxo, proteção e escape de alvos antimicrobianos. Esses genes conferem resistência a diversas classes, como lincosamidas, macrolídeos, fluoroquinolonas e cefalosporinas, corroborando o perfil fenotípico multirresistente. Este estudo é um dos pioneiros que apresenta dados genômicos e fenotípicos relevantes sobre resistência e virulência em *E. faecalis* isolados de animais silvestres em uma região de impacto ambiental moderado. Isso reforça a importância do monitoramento genômico de bactérias multirresistentes na fauna silvestre, que pode servir como um potencial reservatório de bactérias patogênicas com impacto à saúde pública humana e animal.

Palavras-chave: vigilância epidemiológica, genes de virulência, genes de resistência, resistência antimicrobiana, saúde pública.

ABSTRACT

Natural environments, especially those minimally or moderately affected by anthropogenic activities, have attracted interest as potential reservoirs of potentially pathogenic microorganisms. In the context of antimicrobial resistance, understanding the role of these ecosystems in the maintenance and dissemination of resistance genes and virulence factors is fundamental for public health. This study aimed to perform the genomic characterization of three *Enterococcus faecalis* strains isolated from wild animals in the Catimbau National Park, Pernambuco, Brazil. The samples, collected via rectal and otic swabs, were confirmed as multidrug-resistant by antibiogram, showing resistance to more than four distinct classes of antibiotics. Genomic sequencing and average nucleotide identity analysis (ANI > 95%) confirmed the species. Phylogenomic analysis revealed that the isolates from this study clustered with samples derived from humans and cattle, while other clusters showed no direct correlation according to host and/or geographic region. Twenty-two virulence genes related to adhesion, biofilm formation, immunomodulation and exotoxins were identified, evidencing the pathogenic potential of the samples. Five resistance genes (*dfrE*, *emeA*, *ireK*, *lsaA*, *efrA*), present in all samples, are associated with mechanisms such as efflux pumps, protection and antimicrobial target evasion. These genes confer resistance to various classes, including lincosamides, macrolides, fluoroquinolones and cephalosporins, corroborating the multidrug-resistant phenotypic profile. This study is among the pioneering ones presenting relevant genomic and phenotypic data on resistance and virulence in *E. faecalis* isolates from wild animals in a region of moderate environmental impact. It reinforces the importance of genomic monitoring of multidrug-resistant bacteria in wildlife, which may serve as a potential reservoir of pathogenic bacteria with impact on human and animal public health.

Keywords: epidemiological surveillance, virulence genes, resistance genes, antimicrobial resistance, public health.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análise de completude genômica dos isolados.	40
Figura 2. <i>Heatmap</i> da Análise de Identidade Média de Nucleotídeos (ANI) entre 267 genomas de <i>Enterococcus faecalis</i>	41
Figura 3. Árvore filogenômica baseada na concatenação de genes ortólogos de 267 genomas de <i>E. faecalis</i> e uma amostra de <i>E. coli</i> como <i>outgroup</i> . Os nomes dos isolados estão coloridos conforme o hospedeiro e o país de origem.	42
Figura 4. Legenda das cores utilizadas na árvore filogenômica. A) Cores representando os diferentes hospedeiros dos quais as amostras de <i>E. faecalis</i> foram isoladas. B) Cores representando os países de origem das amostras. Amostras com informações ausentes sobre hospedeiro ou país (Desconhecido) permaneceram sem coloração.	43
Figura 5. Classificação dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos em genes do panresistoma de <i>Enterococcus faecalis</i> com base na presença em genomas centrais, acessórios ou exclusivos, considerando 267 genomas analisados.	45
Figura 6. Distribuição dos genes de resistência a diferentes classes de antibióticos entre os resistomas central, acessório e exclusivo a partir da análise dos 267 genomas de <i>Enterococcus faecalis</i>	46
Figura 7. Classificação dos genes de resistência antimicrobiana de acordo com o mecanismo de resistência envolvido e o tipo de distribuição no resistoma: central, acessório ou exclusivo.	47
Figura 8. Classificação dos genes de resistência antimicrobiana detectados nas amostras segundo a classe de antibiótico e o tipo de distribuição no resistoma: central, acessório ou exclusivo.	48
Figura 9. Identidade dos genes de resistência detectados nas cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> . Os valores correspondem à porcentagem de identidade dos genes identificados com base nas análises de similaridade.	48
Figura 10. Classificação dos genes de virulência com base nos mecanismos de ação e sua distribuição nos grupos central, acessório e exclusivo, obtida a partir da análise de 267 genomas de <i>Enterococcus faecalis</i>	50
Figura 11. Classificação dos genes de virulência com base nos mecanismos de ação e sua distribuição nos grupos central, acessório e exclusivo, identificados a partir da análise dos três genomas de <i>Enterococcus faecalis</i> deste estudo.	51

Figura 12. <i>Heatmap</i> da identidade dos genes de virulência detectados nas três cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> analisadas. Os valores correspondem à porcentagem de identidade dos genes identificados com base nas análises de similaridade.	52
Figura 13. Recorte da árvore filogenômica baseada na análise de similaridade genômica entre sete amostras de <i>Enterococcus faecalis</i> , destacando aquelas relacionadas às amostras S61_2, S77_1 e S77_2.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de coleta dos isolados das amostras deste trabalho	34
Tabela 2 - Resultado do antibiograma dos isolados	34
Tabela 3 - Estatísticas dos genomas após a montagem	38
Tabela 4 - Métricas de qualidade e características dos genomas das amostras	39
Tabela 5 - Frequência absoluta e relativa dos genomas por espécies	44
Tabela A.1 - Metadados dos 264 genomas <i>Enterococcus faecalis</i>	90
Tabela B.1 - Frequência absoluta e relativa dos 65 genes de resistência identificados nas 267 amostras avaliadas com critério de mínimo de 70% de identidade.....	105
Tabela C.1 - Frequência absoluta e relativa dos 48 genes de virulência identificados nas 267 amostras avaliadas com critério de mínimo de 70% de identidade.....	108
Tabela D.1 - Presença ou ausência de genes de virulência baseada no limite mínimo de 70% de identidade.....	110
Tabela Anx.A.1 - Testes bioquímicos e morfológicos das amostras.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/A	Ambiental/Alimento
ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
AMC	Amoxicilina com clavulanato
ANI	<i>Average Nucleotide Identity</i> (Identidade Média de Nucleotídeos)
ARGs	<i>Antibiotic Resistance Genes</i>
AS	<i>Aggregation Substance</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
BEA	<i>Bile Esculin Agar</i> (Ágar Bile-Esculina)
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Infusão de Cérebro e Coração – meio de cultivo)
BUSCO	<i>Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs</i>
CARD	<i>Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i>
CFO	Cefoxitina
CFZ	Cefazolina
CIM	micração Inibitória Mínima
CLI	Clindamicina
CO ₂	Dióxido de carbono
CRO	Ceftriaxona
DOX	Doxiciclina
eDNA	<i>Extracellular DNA</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
EPA	<i>Enterococcal Polysaccharide Antigen</i>
ERI	Eritromicina
ESKAPEE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp., Escherichia coli</i>
FLF	Florfenicol
GC	Guanina Citosina
GTP	Guanosina Trifosfato

IMP	Imipenem
LNZ	Linezolida
MAFFT	<i>Multiple Alignment using Fast Fourier Transform</i>
Mbp	Megapares de base
MDR	<i>Multidrug-Resistant</i>
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i> (Superfamília dos Maiores Facilitadores)
MLS-B	Macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B
MSA	<i>Multiple Sequence Alignment</i> (Alinhamento de Sequências Múltiplas)
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIT	Nitrofurantoína
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORFs	<i>Open Reading Frames</i>
pb	Pares de base
PBP	<i>Penicillin-Binding Proteins</i>
PE	Pernambuco
PICGN	Glomerulonefrite crescêntica pauci-imune
ppm	Partes por milhão
QUAST	<i>Quality Assessment Tool for Genome Assemblies</i>
RefSeq	<i>Reference Sequence</i>
rRNA	<i>ribosomal Ribonucleic Acid</i>
SUT	Sulfametoxazol/trimetoprima
TCS	<i>Tetra Correlation Search</i>
TOB	Tobramicina
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i> (Caldo Triptona de Soja)
VFDB	<i>Virulence Factors of Pathogenic Bacteria Database</i>
VRE	<i>Vancomycin-Resistant Enterococci</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 <i>Enterococcus</i> spp.	20
2.1 <i>Enterococcus faecalis</i>	21
2.2.1 Mecanismos de resistência	22
2.2.2 Mecanismos de virulência	27
2.2.3 Estudos de Genômica em <i>Enterococcus faecalis</i>	30
3 JUSTIFICATIVA.....	32
4 OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo geral.....	33
4.2 Objetivos específicos	33
5 METODOLOGIA	34
5.1. Isolamento bacteriano e testes bioquímicos para identificação e resistência.....	34
5.2 Sequenciamento genômico, montagem e avaliação da qualidade	35
5.3 Depósito dos dados genômicos	35
5.4 Análises genômicas, uso de bancos de dados e anotação genômica	35
5.5 Análises filogenômicas	36
5.6 Análises do panresistoma e panviruloma	36
6 RESULTADOS	38
6.1 Montagem e anotação genômica dos isolados	38
6.1.1 Avaliação da qualidade da montagem.....	38
6.1.2 Estimativa de completude genômica	39
6.2 Identidade média de nucleotídeos (ANI)	40
6.3 Análise filogenômica	41
6.4 Análise do Panresistoma	44
6.4.1 Panresistoma em 267 genomas de <i>Enterococcus faecalis</i>	44
6.4.2 Panresistoma dos três genomas analisados.....	46
6.5 Análise do Panviruloma	49
6.5.1 Panviruloma em 267 genomas de <i>Enterococcus faecalis</i>	49
6.5.2 Panviruloma dos três genomas analisados.....	50
7 DISCUSSÃO.....	53
7.1 Avaliação da qualidade dos dados e da montagem genômica.....	53
7.2 Diversidade genética e evolução de <i>Enterococcus faecalis</i>	54
7.3 Análises filogenômicas	54
7.4 Discussão sobre o panresistoma.....	58
7.4.1 Mecanismos de resistência identificados.....	58
7.4.2 Classes de antimicrobianos associadas.....	59
7.4.3 Genes de resistência detectados.....	60
7.5 Discussão sobre o panviruloma	64
7.5.1 Mecanismos funcionais de virulência.....	64
7.5.2 Genes de virulência identificados nas três amostras.....	65
8 CONCLUSÃO	71
9 PERSPECTIVAS.....	72
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
APÊNDICE A	90
APÊNDICE B	105
APÊNDICE C	108
APÊNDICE D	110
ANEXO A	111

1 INTRODUÇÃO

O ecoturismo é um dos principais segmentos do turismo brasileiro, destacando-se pelo alto potencial de interação com a fauna em vida livre, em razão da extraordinária riqueza biológica do país (VIDAL *et al.*, 2022). Esse tipo de atividade pode trazer benefícios sociais, econômicos e ambientais. No entanto, a literatura ressalta a importância do monitoramento e do manejo adequados dessas interações, pois, quando realizadas sem planejamento ou controle, podem comprometer o ambiente, a segurança dos visitantes e a preservação das espécies nativas (DUFFUS; DEARDEN, 1993; ORAMS, 2002; SMITH *et al.*, 2008; ROMAGNOLI, 2010).

O Parque Nacional do Catimbau, instituído sob o Decreto de 13 de dezembro de 2002, está localizado no Vale do Catimbau que abrange as cidades de Buíque, Tupanatinga, Ibimirim e Sertânia, no estado de Pernambuco. Trata-se de uma Unidade de Conservação (UC) de relevante importância ambiental, caracterizada por sua beleza paisagística, formações e abrigos naturais, presença de vestígios arqueológicos e expressiva biodiversidade do bioma Caatinga. Estima-se que o parque abrigue cerca de 200 espécies catalogadas de animais silvestres, sendo um destino de interesse para o turismo pedagógico, ecológico e cultural (PERNAMBUCO, 2010).

Nas áreas do entorno do parque, há comunidades locais cuja principal fonte de renda é o turismo. Então, o parque recebe visitantes provenientes de diversas regiões do Brasil e do exterior. Segundo relatório do ICMBio, divulgado em 2023, foram registrados cerca de 8.508 visitantes monitorados no ano de 2022 (ICMBIO, 2023). É comum que alguns turistas levem os seus animais de estimação, o que pode representar um importante fator de desequilíbrio ambiental. A presença de animais de companhia em áreas próximas a Unidades de Conservação (UCs) pode representar um risco à saúde pública, uma vez que esses animais podem atuar como vetores de patógenos, como vírus e bactérias (PRAGER *et al.*, 2012; MAKOVSKA *et al.*, 2023).

Sob a perspectiva microbiológica, a interação natural entre microrganismos e o ecossistema pode favorecer a disseminação dessas espécies para pessoas, animais e o ambiente (MARQUES *et al.*, 2023), incluindo a bactéria *Enterococcus faecalis*. *E. faecalis* é um coco Gram-positivo, anaeróbio facultativo, disposto em pares ou cadeias, disseminado principalmente por conteúdo fecal, capaz de crescer em ambientes escassos de nutrientes, temperaturas variando entre 10 °C e 45 °C, sendo 35 °C a ideal (TAVARES, 2014; GUZMAN PRIETO *et al.*, 2016).

Enterococcus spp. são componentes da microbiota intestinal de animais e humanos e também são encontrados em plantas, solo, água e alimentos (MADELA *et al.*, 2017). Devido a

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). Ambientes aquáticos, sejam ou não utilizados para recreação, podem abrigar microrganismos patogênicos, incluindo bactérias provenientes de efluentes não tratados e de águas pluviais contaminadas por fezes humanas e animais. A exposição a esses ambientes está associada a infecções de pele, gastroenterites, doenças respiratórias e parasitárias (BOEHM; SASSOUBRE, 2014; GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019). Alguns estudos demonstraram uma correlação entre o risco de doenças gastrointestinais, respiratórias e de pele com a elevada concentração de *Enterococcus* durante atividades recreativas (SANTOS, 2021). 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).

A ampla dispersão dos *Enterococcus* no ambiente está relacionada à sua notável resistência a condições adversas, incluindo variações de pH, alta salinidade e temperaturas entre 5 °C e 65 °C, o que favorece sua adaptação a diversos nichos ecológicos (FISHER; PHILLIPS, 2009). Essas bactérias também apresentam elevada tolerância a compostos estressores como desinfetantes à base de cloro (por exemplo, hipoclorito de sódio), monocloramina e clorexidina. Vale ressaltar que a suscetibilidade à clorexidina varia entre isolados clínicos e da cadeia alimentar, sendo observada maior tolerância em cepas mais recentes (RODRIGUES; CUNHA, 2017; GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019; PEREIRA *et al.*, 2022). Especificamente, cepas de *E. faecalis* podem sobreviver a tratamentos com até 150 ppm de cloro por cinco minutos e resistem a temperaturas utilizadas em processos de higienização hospitalar (65–71 °C) (PEREIRA *et al.*, 2022).

Os *Enterococcus* spp. eram considerados comensais não patogênicos, ocasionalmente associados a infecções (IWERIEBOR *et al.*, 2015). Entretanto, tornaram-se agora uma das infecções nosocomiais mais comuns sendo considerada uma ameaça emergente para a saúde pública, uma vez que são organismos intrinsecamente resistentes a vários antimicrobianos (SUKMAWINATA *et al.*, 2020).

E. faecalis é um importante agente de infecções do trato urinário, endocardite, infecções em feridas, infecções dentárias e sepse em humanos; em pacientes hospitalizados é responsável por elevadas taxas de mortalidade (HAMMERUM *et al.*, 2010; MIGURA *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2016).

Em animais de produção, *Enterococcus faecalis* pode ser isolado de casos de mastite bovina, geralmente associado a infecções oportunistas. Em aves, pode ocasionar endocardite, peritonite e salpingite. Em animais de companhia pode causar infecções urinárias, sepse e

endocardite. Além disso, também já foi descrito como patógeno responsável por septicemia e enterite em peixes de criação (POMBA *et al.*, 2010; ELHADIDY; ELSAYYAD, 2012; OLSEN *et al.*, 2012; PÁDUA, 2013). Na literatura, já foi descrita a ocorrência de enterococos resistentes a antimicrobianos em leite e seus derivados, provenientes de vacas, búfalas e cabras (SOUZA *et al.*, 2023). Nas produções, as doenças infecciosas ocasionam importantes prejuízos econômicos (PÁDUA, 2013).

Apesar de não pertencer ao grupo ESKAPEE (acrônimo com a inicial dos nomes das principais bactérias multirresistentes a antimicrobianos (MDR) *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*) (OMS, 2014) e não estar na lista dos patógenos bacterianos prioritários da OMS atualizada em 2024 (OMS, 2024), *Enterococcus faecalis* possui resistência intrínseca a diversos antimicrobianos, a qual pode ser disseminada entre diferentes organismos, especialmente por meio de mecanismos de transferência horizontal de genes (ARIAS; MURRAY, 2013; DAZA *et al.*, 2022; MARQUES *et al.*, 2023; PASCHOALINI *et al.*, 2023; HOURIGAN *et al.*, 2024).

O estreitamento das interações entre humanos, animais de companhia e silvestres, aliado à urbanização de áreas periurbanas e rurais, à intensificação da produção animal e ao crescimento do turismo em regiões de reserva ambiental, provocou mudanças significativas na dinâmica homem-animal, resultando em um aumento da circulação de agentes bacterianos (OVERGAAUW *et al.*, 2020; DEIANA *et al.*, 2024). Animais silvestres, por apresentarem ampla mobilidade territorial, podem representar riscos pouco previsíveis a outras populações (FARIA, 2016).

Considerando esse contexto ecológico e epidemiológico, destaca-se o papel de *Enterococcus faecalis* como agente ubíquo com impacto na saúde pública. O uso regulamentado, mas recorrente, de antimicrobianos, associado à presença de resíduos no ambiente, pode favorecer a seleção e disseminação de bactérias resistentes. Animais com pouco ou nenhum contato com humanos, como os silvestres de vida livre, e até mesmo animais de companhia, já apresentam bactérias multirresistentes, o que evidencia a importância desse fenômeno em saúde pública (FARIA, 2016).

Nesse cenário, a vigilância epidemiológica configura-se como uma ferramenta estratégica para a antecipação e controle de riscos associados à resistência antimicrobiana. A coleta sistemática e a análise contínua de dados microbiológicos permitem não apenas identificar padrões emergentes de resistência, mas também direcionar ações preventivas em contextos diversos. Frente à complexa interação entre humanos, animais e ambientes — e às

transformações contínuas nos ecossistemas — mostra-se fundamental adotar abordagens integradas, alinhadas aos princípios da Saúde Pública. A inclusão da fauna silvestre nas ações de vigilância amplia o escopo do monitoramento, contribuindo para a compreensão da dinâmica de transmissão de genes de resistência e para a formulação de políticas públicas mais eficazes (BENAVIDES *et al.*, 2024; DELPY *et al.*, 2024; DOYLE *et al.*, 2025).

A investigação de microrganismos isolados da fauna silvestre é fundamental tanto para o avanço do conhecimento científico quanto para o fortalecimento de estratégias de vigilância epidemiológica. Esses estudos permitem identificar agentes com potencial patogênico, acompanhar a disseminação de genes de resistência em diferentes ecossistemas e compreender os mecanismos evolutivos envolvidos na seleção e propagação de bactérias resistentes. Considerando que animais silvestres podem atuar como reservatórios pouco previsíveis, sua análise representa um componente essencial na avaliação de riscos à saúde pública.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Enterococcus* spp.

Os *Enterococcus* spp. são agentes ubíquos, componentes da microbiota intestinal de animais e humanos e também estão presentes em plantas, solo, água e alimentos (TYNE *et al.*, 2013; MADELA *et al.*, 2017). O gênero *Enterococcus* pertence à ordem Lactobacillales, família Enterococcaceae, filo Firmicutes, o qual é caracterizado por apresentar uma morfologia em arranjo de cocos Gram-positivos, observado isolados em pares ou cadeias curtas. Os *Enterococcus* apresentam-se como bactérias anaeróbias facultativas, com teste de catalase negativo, produtores de ácido lático e toleram ambientes com elevada concentração de sais biliares (40%) e soluções salinas (6,5%), apresentando faixa ideal de crescimento em pH de 7,5, podendo crescer em uma ampla faixa de pH entre 4,5 a 9,0 (TAVARES, 2014; FREITAS *et al.*, 2023).

Enterococcus spp. são disseminados principalmente por meio de material fecal, mas também podem ser transmitidos por contato direto ou indireto com superfícies, alimentos e objetos contaminados. Apresentam capacidade de crescimento em uma ampla faixa de temperatura, variando de 10 °C a 45 °C, sendo 35 °C a temperatura ideal. Além disso, essas bactérias demonstram resistência variável a desinfetantes químicos, como o álcool e a clorexidina (LEBRETON *et al.*, 2014; GUZMAN PRIETO *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2019; GERALDES *et al.*, 2022). Os enterococos apresentam notável resistência ao estresse ambiental, a qual pode ser intensificada pela exposição prévia a condições subletais severas, permitindo sua sobrevivência a temperaturas de até 60 °C, à dessecação e à escassez de nutrientes no ambiente (LEBRETON *et al.*, 2017). Ademais, essas bactérias são capazes de hidrolisar a esculina mesmo na presença de 40% de sais biliares. Essa habilidade reflete sua adaptação ao ambiente intestinal e resistência fisiológica, uma vez que os sais biliares simulam as condições adversas do trato gastrointestinal (LEBRETON *et al.*, 2014; GERALDES *et al.*, 2022).

Como bactérias homofermentativas, os enterococos produzem ácido lático a partir da fermentação da glicose, sem a geração de gás. Além disso, desempenham um papel relevante nas propriedades organolépticas de alimentos fermentados, em razão de sua presença natural como contaminantes em produtos crus e lácteos, resistência às condições de processamento (termotolerância), baixa toxicidade e capacidade de acidificar o meio (LEBRETON *et al.*, 2014). Esses atributos são fundamentais para o uso bem-sucedido dos enterococos em processos de

fermentação de alimentos, atuando tanto como culturas iniciadoras quanto não iniciadoras, além de possibilitarem sua inclusão em formulações probióticas (KRAWCZYK *et al.*, 2021).

No trato gastrointestinal, essas bactérias estabelecem uma relação de comensalismo com o organismo, contribuindo para o equilíbrio entre os componentes da microbiota e a manutenção da homeostase. No entanto, em situações de desequilíbrio que permitam sua disseminação descontrolada, *E. faecalis* pode atuar como um patógeno oportunista, desencadeando ou favorecendo respostas inflamatórias inadequadas (GAGNIÈRE *et al.*, 2016; ALHINAI *et al.*, 2019).

2.1 *Enterococcus faecalis*

Entre as espécies do gênero *Enterococcus*, *Enterococcus faecalis* destaca-se por sua relevância clínica e por apresentar características biológicas que a diferenciam das demais. Genomicamente, *E. faecalis* possui um genoma com tamanho médio de aproximadamente 3,0 a 3,2 Mbp e conteúdo GC de cerca de 37% (LEBRETON *et al.*, 2017).

Além disso, algumas cepas de *E. faecalis* são beta-hemolíticas devido à produção da toxina citolisina, um fator ausente em muitas outras espécies do gênero. Quanto aos fatores de virulência, *E. faecalis* demonstra uma prevalência significativamente maior de genes como *gelE* (gelatinase), *cylA* (citolisina), *asaI* (substância de agregação), *esp* (proteína de superfície) e *efaA* (antígeno associado à endocardite), o que contribui para sua capacidade de adesão, evasão do sistema imune e formação de biofilme (HANCOCK; GILMORE, 2002; CAMARGO *et al.*, 2016). Embora seja intrinsecamente resistente a cefalosporinas, *E. faecalis* geralmente permanece sensível à ampicilina (HOLLENBECK; RICE, 2012).

Para o cultivo laboratorial de *Enterococcus faecalis*, utilizam-se meios ricos como ágar sangue e ágar ou caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), que favorecem o crescimento e permitem a avaliação do padrão de hemólise. Em ágar sangue, a maioria das cepas é não-hemolítica (gama-hemólise), embora algumas apresentem β -hemólise devido à produção de citolisina, formando colônias arredondadas, esbranquiçadas a acinzentadas (FISHER; PHILLIPS, 2009). O ágar bile-esculina (BEA) é empregado para isolamento seletivo, pois *E. faecalis* hidrolisa a esculina na presença de sais biliares, provocando o escurecimento do meio e permitindo identificação presuntiva dos enterococos (FISHER; PHILLIPS, 2009). Outro meio seletivo clássico é o M-Enterococcus Agar, que contém sais biliares e azida de sódio, inibindo a maioria dos Gram-negativos e evidenciando colônias escuras de *E. faecalis* (FISHER; PHILLIPS, 2009). Em caldo, o BHI é considerado de eleição, fornecendo alta densidade celular em até 24 horas

de incubação a 37 °C, com ou sem aeramento; já o TSB (*Tryptic Soy Broth*) é preferido em estudos de formação de biofilme, especialmente quando suplementado com glicose, hemina e vitamina K (WECKWERTH *et al.*, 2013). Para confirmar a notável tolerância osmótica da espécie, utiliza-se BHI acrescido de 6,5 % de NaCl (cloreto de sódio), no qual *E. faecalis* cresce robustamente (WECKWERTH *et al.*, 2013). Em termos de biofilme, *E. faecalis* em BHI ou TSB suplementado com 1 % de glicose (ou sacarose), hemina e vitamina K forma biofilmes maduros em até 72h a 37 °C, apresentando alta viabilidade celular, produção abundante de exopolissacarídeos, aumento de eDNA e expressão de genes de virulência, o que contribui para sua persistência em ambientes clínicos e hospitalares (KIM *et al.*, 2020). Além disso, *E. faecalis* cresce tanto em atmosfera aeróbia quanto em condições microaerofílicas ou anaeróbias (5% CO₂), o que evidencia sua versatilidade em estudos *in vitro* e diagnósticos clínicos (FISHER; PHILLIPS, 2009; KIM *et al.*, 2020). Essas características reforçam a importância de *E. faecalis* como um agente oportunista relevante tanto em infecções comunitárias quanto nosocomiais, sendo essencial sua caracterização detalhada em estudos microbiológicos.

2.2.1 Mecanismos de resistência

2.2.1.1 Panorama da resistência em *E. faecalis*

Em *Enterococcus faecalis*, a quantidade de genes associados à resistência antimicrobiana (*Antibiotic Resistance Genes* – ARGs) por genoma pode variar consideravelmente, refletindo as diferentes pressões seletivas e origens ecológicas das cepas. Estudos com isolados clínicos revelam que esses genomas geralmente abrigam entre cinco e 20 ARGs, podendo atingir até 24 genes em cepas multirresistentes, especialmente aquelas expostas a ambientes hospitalares (HE *et al.*, 2018; ZAIDI *et al.*, 2023). Em contrapartida, levantamentos genômicos mais amplos, que englobam cepas provenientes de ambientes clínicos, de animais e do ambiente, relataram até 39 genes distintos de resistência, evidenciando o extenso repertório resistômico da espécie (FARMAN *et al.*, 2019; SHOBO *et al.*, 2023).

Além da variação no número de ARGs entre os genomas, a localização desses genes também reflete importantes aspectos evolutivos e epidemiológicos. Estima-se que entre 60 e 70% dos isolados de *E. faecalis* apresentam ARGs localizados em plasmídeos, o que reforça o papel central desses elementos móveis na aquisição e disseminação de genes de resistência entre cepas e ambientes distintos (MOTALLEBI *et al.*, 2022; HOURIGAN *et al.*, 2024).

A natureza dos mecanismos de resistência também é um fator relevante. Certos mecanismos, como bombas de efluxo do tipo ABC, geralmente estão no genoma central (*core*) da espécie, sugerindo a presença de múltiplos mecanismos de resistência intrínsecos, preservados evolutivamente na espécie (LI *et al.*, 2023). Já os genes adquiridos por transferência horizontal apresentam ampla variabilidade entre genomas, sendo essa diversidade uma das principais características da adaptação de *E. faecalis* a diferentes nichos e antimicrobianos (ZAIDI *et al.*, 2023; SHOBO *et al.*, 2023).

2.2.1.2 Bombas de efluxo

As bombas de efluxo em *Enterococcus faecalis* são responsáveis pela expulsão ativa de diversos compostos tóxicos, contribuindo para a resistência a múltiplos antimicrobianos. Dentre os transportadores mais bem caracterizados estão o EfrAB, membro da família *ATP-Binding Cassette* (ABC), e o EmeA, da *Major Facilitator Superfamily* (MFS). O EfrAB é um transportador heteromérico codificado pelos genes *efrA* e *efrB*, cujo produto confere resistência a fluoroquinolonas (como norfloxacin e ciprofloxacina), aminoglicosídeos e compostos catiônicos (e.g., acriflavina), utilizando energia de hidrólise de ATP para promover o efluxo (LEE *et al.*, 2003). Já o EmeA atua como um antiporte de prótons, mediando resistência a tetraciclina, cloranfenicol, bacitracina e agentes intercalantes de DNA (e.g., DAPI, acriflavina), sendo inibido por reserpina em ensaios funcionais (LEE *et al.*, 2003). Estudos anteriores descreveram o heterodímero EfrCD como um sistema de efluxo capaz de ejetar antraciclínicos (daunorrubicina, doxorubicina) e corantes fluorescentes (ethidium, Hoechst 33342), indicando a presença de múltiplas bombas ABC redundantes no genoma de *E. faecalis*. A existência desses sistemas redundantes sugere uma possível regulação coordenada por reguladores globais, que ajustariam simultaneamente a expressão de diferentes bombas em resposta à exposição a compostos tóxicos (HÜRLIMANN *et al.*, 2016).

Além disso, a regulação das bombas de efluxo em *Enterococcus faecalis* envolve, em grande parte, a indução da expressão gênica em resposta a concentrações subinibitórias de antibióticos e estresses ambientais. LEE *et al.* (2003) demonstraram que a expressão de *efrAB* aumenta significativamente quando cepas de *E. faecalis* são expostas a subinibidores de gentamicina, estreptomicina e cloranfenicol, indicando que fatores de transcrição locais respondem diretamente à presença de antimicrobianos para elevar o nível de efluxo.

Essa ativação adaptativa permite que *E. faecalis* expulse fluoroquinolonas, antraciclínicos e compostos catiônicos, contribuindo para sua resistência intrínseca e adquirida.

Em paralelo, inibidores de efluxo como EDTA (que reduz a expressão de EfrAB) e reserpina (que bloqueia o transporte de EmeA) foram testados exatamente para interferir nesses mecanismos regulatórios, evidenciando a importância de direcionar a regulação gênica das bombas como estratégia para restaurar a sensibilidade antimicrobiana em cepas multirresistentes (LEE *et al.*, 2003; HÜRLIMANN *et al.*, 2016).

2.2.1.3 Alterações na parede celular

Alterações na parede celular, que podem conferir resistência a antimicrobianos, envolvem principalmente modificações no peptidoglicano e na composição de teicoícos e polissacarídeos. A substituição do dipeptídeo final dos precursores de peptidoglicano, de D-Ala-D-Ala para D-Ala-D-Lac, conduzida pelo operon *vanA*, reduz drasticamente a afinidade pela vancomicina, sendo detectada em cepas de VRE (*Vancomycin-Resistant Enterococci*) por análise de PBP (*Penicillin-Binding Proteins*) adaptadas ao novo substrato (CAGLAYAN *et al.*, 2025). Em outros mecanismos, a substituição por D-Ala-D-Ser, característica de determinantes tipo *vanG*, também diminui a eficácia da vancomicina (COURVALIN, 2006).

Além das alterações no peptidoglicano, mutações nos genes do cluster *epa* acarretam alterações no polissacarídeo associado à parede (EPA), comprometendo sua integridade e influenciando a resistência a cefalosporinas em biofilmes, uma vez que a deficiência em *epaOX* ou *epaI* leva ao aumento da permeabilidade da parede e perda de resistência (HOFF *et al.*, 2017). Ademais, a ausência de d-alanilação em ácidos teicoícos, como observado em mutantes de *dltA*, resulta em maior sensibilidade a β -lactâmicos, indicando que a modificação dos teicoícos regula a interação da parede com esses antibióticos (KRISTIAN *et al.*, 2019).

Portanto, a resistência de *E. faecalis* é multifatorial, envolvendo tanto alterações diretas no sítio de ação de antibióticos glicopeptídicos quanto modificações estruturais nos componentes ancorados à parede, que atuam conjuntamente para reduzir a eficácia dos agentes terapêuticos (ZHAO *et al.*, 2024).

2.2.1.4 Formação de biofilme

Os biofilmes são comunidades complexas compostas por organismos celulares da mesma ou de diferentes espécies que estão ligados uns aos outros e a uma superfície abiótica ou biótica. Esse complexo multicelular é circundado por uma matriz extracelular constituída

principalmente por exopolissacarídeos (DONLAN; COSTERTON, 2002; BORGES *et al.*, 2018; EMERY *et al.*, 2023).

Superfícies inertes expostas à luz, dessecação, pressão osmótica e variações de pH e temperatura são consideradas ambientes com condições inapropriadas para a sobrevivência microbiana. Contudo, a formação de biofilme aumenta a resistência dos microrganismos à inativação física, à ação do sistema imunológico do hospedeiro e a moléculas tóxicas, como antimicrobianos e desinfetantes (OGLESBY-SHERROUSE *et al.*, 2014). A resistência dos microrganismos em biofilmes pode ser justificada pela localização das bactérias em camadas internas da estrutura, onde elas apresentam reduzidas taxas metabólicas. Além disso, a matriz extracelular diminui fisicamente a quantidade de antimicrobiano disponível (MEN *et al.*, 2016).

Além das superfícies inertes, os biofilmes também podem se formar sobre tecidos do hospedeiro, como pele, mucosas e feridas crônicas. Nesses casos, a aderência bacteriana às superfícies bióticas representa um fator crítico na persistência da infecção, dificultando a ação do sistema imunológico e comprometendo a eficácia dos tratamentos antimicrobianos (HALL *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2023).

2.2.1.5 Plasticidade Genômica

Enterococcus faecalis apresenta elevada plasticidade genômica, essencial para sua adaptabilidade e persistência em diversos ambientes, como o trato gastrointestinal de humanos e animais, ambientes hospitalares, alimentos e ecossistemas naturais, incluindo solos e ambientes aquáticos. A versatilidade genômica de *E. faecalis* é fortemente influenciada pela presença de elementos genéticos móveis — como plasmídeos, transposons e ilhas genômicas — que promovem a troca de material genético entre microrganismos, incluindo genes de resistência e de virulência (LEBRETON *et al.*, 2013; GILMORE *et al.*, 2013; RAVEN *et al.*, 2016; FARIA, 2016; LI *et al.*, 2022).

O genoma de *E. faecalis* apresenta regiões altamente variáveis entre cepas, refletindo um *pool* genético dinâmico e em constante evolução (PALMER *et al.*, 2010). Essa espécie possui um pangenoma aberto, com mais de 10.000 famílias gênicas, o que evidencia uma grande variabilidade genômica e alta capacidade de adquirir e perder genes por recombinação e transferência horizontal (HE *et al.*, 2018). Tais características resultam em diferenças significativas no tamanho genômico, número de ORFs e repertório de genes de resistência e virulência entre isolados provenientes de distintos nichos ecológicos. A presença recorrente de genes como *vanA*, *ermB* e *aac(6')-Ie-aph(2'')*, frequentemente localizados em plasmídeos

conjugativos, ilustra a flexibilidade do genoma dessa bactéria e sua capacidade de rápida adaptação a pressões seletivas ambientais e clínicas. Assim, a plasticidade genômica de *E. faecalis* contribui diretamente para seu sucesso epidemiológico, tanto em infecções humanas quanto em contextos não clínicos (ZALIPOUR *et al.*, 2019; MWIKUMA *et al.*, 2023).

2.2.1.6 Resistência intrínseca

Enterococcus faecalis apresenta resistência intrínseca a diversos antibióticos devido a fatores genéticos presentes em seu cromossomo, sem precisar de exposição prévia a esses fármacos. Um desses fatores é a produção da enzima PBP4 (*penicillin-binding protein 4*), que se localiza na parede celular e tem baixa afinidade pelos antibióticos β -lactâmicos (como penicilinas e cefalosporinas). Na prática, isso significa que esses antibióticos não conseguem se ligar adequadamente à PBP4 para bloquear a construção do peptidoglicano (componente essencial da parede bacteriana). Como resultado, as concentrações necessárias para inibir o crescimento da bactéria (CIM) acabam sendo mais altas do que em outras bactérias Gram-positivas (HOLLENBECK; RICE, 2012; SUKMAWINATA *et al.*, 2020). Além disso, estudos com deleções em genes de PBPs de classe A sugerem que, mesmo que o PBP4 seja a principal enzima associada a resistência a cefalosporinas, a cooperação com glicotransferases de classe A, especialmente a PBP4 codificada por *pbpF*, é indispensável para manutenção da síntese de peptidoglicano em presença de β -lactâmicos (ARBELOA *et al.*, 2004).

Outro mecanismo intrínseco envolve o gene *lsa*, que codifica uma proteína da família dos transportadores ABC relacionada à resistência natural, do tipo LSA, contra lincosamidas (clindamicina) e estreptograminas A (dalfopristina), visto que a deleção de *lsa* em cepas de *E. faecalis* resulta em redução de mais de 40 vezes nos valores de CIM para esses antibióticos (SINGH *et al.*, 2002). Além disso, a baixa permeabilidade da membrana impede a entrada eficaz de aminoglicosídeos, razão pela qual esses antibióticos não são bactericidas isoladamente, sendo necessários sinergismos com β -lactâmicos para alcançar concentrações intracelulares letais (HOLLENBECK; RICE, 2012). A capacidade de absorver folato exógeno também confere resistência intrínseca ao trimetoprim-sulfametoxazol, uma vez que a bactéria contorna o bloqueio da síntese de folato imposto pelo fármaco (HOLLENBECK; RICE, 2012).

Finalmente, sistemas constitutivos de bombas de efluxo, ainda que menos caracterizados, contribuem para a redução da concentração intracelular de múltiplos compostos tóxicos, como antimicrobianos e biocidas, reforçando a resistência intrínseca de *Enterococcus faecalis* (HOLLENBECK; RICE, 2012; SINGH *et al.*, 2002).

2.2.1.7 Resistência cruzada

Enterococcus faecalis apresenta ampla capacidade de desenvolver resistência cruzada, fenômeno em que um único mecanismo confere resistência a múltiplos antimicrobianos estruturalmente relacionados (MUNITA; ARIAS, 2016). Essa característica é particularmente preocupante em ambientes clínicos, pois reduz significativamente as opções terapêuticas disponíveis. A resistência de uma bactéria a determinado antimicrobiano pode também gerar resistência cruzada a fármacos da mesma classe, como observado com o grupo dos bacteriostáticos, que inclui sulfonamidas, tetraciclinas, aminoglicosídeos e macrolídeos (FARIA, 2016).

Um dos mecanismos mais relevantes é a atuação de bombas de efluxo, capazes de extrusar diferentes classes de antibióticos (POOLE, 2005; LI *et al.*, 2015), além de modificações em alvos enzimáticos, como nas proteínas de ligação à penicilina (PBPs) ou na subunidade ribossomal 23S rRNA, que podem resultar em resistência simultânea a múltiplos fármacos (MUNITA; ARIAS, 2016). A ocorrência de resistência cruzada é potencializada pela presença de genes localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, que favorecem a disseminação horizontal entre cepas e espécies bacterianas (FARIA, 2016; ZALIPOUR *et al.*, 2019).

Esses fatores tornam *E. faecalis* um patógeno de alto risco no contexto da resistência antimicrobiana, tanto em infecções humanas quanto em cadeias de transmissão ambiental e zoonótica.

2.2.2 Mecanismos de virulência

As espécies do gênero *Enterococcus*, de modo geral, apresentam um número reduzido de determinantes de virulência em comparação com outras bactérias Gram-positivas. No entanto, *Enterococcus faecalis* se destaca por um repertório funcionalmente diversificado de mecanismos que favorecem sua adaptação fisiológica, colonização e persistência em diferentes ambientes e hospedeiros. Entre os principais fatores de virulência estão as proteínas agregativas, a gelatinase (enzima extracelular), a citolisina e a glicosil-hidrolase, que contribuem para a adesão, invasão tecidual e evasão da resposta imune (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2021). Compreender os principais mecanismos de virulência expressos por *E. faecalis* é fundamental para elucidar como essa espécie se estabelece e causa

infecção nos mais diversos contextos. A seguir, serão apresentados os fatores de virulência mais relevantes descritos na literatura.

2.2.2.1 Adesinas e proteínas de superfície

As substâncias agregativas constituem um grupo de proteínas de superfície da parede celular codificadas por genes plasmidiais, como o *asal*, que desempenham papel fundamental nos processos de conjugação e transferência de plasmídeos (BIN-ASIF; ABID ALI, 2019; KIRUTHIGA *et al.*, 2020).

O gene *asal* codifica a substância de agregação (AS), uma adesina bacteriana que media o contato eficiente entre as células bacterianas e o hospedeiro, facilitando a conjugação e a troca de plasmídeos. Esse processo depende também da presença do plasmídeo *pADI*, que atua em conjunto com a AS. A expressão da substância agregadora, de natureza proteica, pode ser induzida na superfície celular pela presença de soro. Além da função na transferência gênica, a AS promove a adesão direta de *E. faecalis* a neutrófilos, de forma independente de opsoninas, por meio de receptores do sistema complemento, contribuindo para a resistência à fagocitose (KAYAOGLU; ORSTAVIK, 2004; VANEK, 1999). Além de suas funções adesivas e imunoevasivas, a expressão da substância de agregação (AS) também está associada à produção extracelular de superóxidos, que contribuem para o dano tecidual em infecções nas quais *E. faecalis* é o agente predominante (PARADELLA *et al.*, 2007).

Outros fatores de virulência, como as adesinas de colágeno Ace e Acm, desempenham um papel essencial nos estágios iniciais da infecção, atuando no reconhecimento do hospedeiro. Essas proteínas se ligam ao peptideoglicano da parede celular bacteriana, facilitando a adesão às superfícies e favorecendo o estabelecimento da infecção (ARIAS; MURRAY, 2012). A proteína Ace reconhece e se liga ao colágeno presente na matriz extracelular do hospedeiro, favorecendo a adesão bacteriana às células-alvo e, conseqüentemente, contribuindo para o estabelecimento da infecção (GILMORE *et al.*, 2014).

Outra enzima importante na patogenicidade de *E. faecalis* é a proteína glicosil-hidrolase (Hyl), que está associada aos processos de invasão tecidual e colonização, especialmente no trato gastrointestinal (MILLER *et al.*, 2016). Essa enzima atua na degradação do ácido hialurônico, um componente estrutural presente em diversos tecidos do organismo humano, facilitando a disseminação bacteriana (BIN-ASIF; ABID ALI, 2019).

2.2.2.2 Formação de biofilme

A formação de biofilme é considerada um dos principais fatores de virulência de *Enterococcus faecalis*. O biofilme contribui para a colonização de tecidos do hospedeiro e superfícies de materiais biomédicos, como cateteres e válvulas cardíacas, além de proporcionar proteção contra a resposta imune e aumentar a tolerância a agentes antimicrobianos. Essa maior resistência ocorre devido à limitação da penetração de fármacos na matriz, à presença de células metabolicamente inativas e à regulação diferencial de genes relacionados à resistência. Como consequência, o biofilme favorece a persistência da bactéria no organismo e está frequentemente associado a infecções crônicas e recorrentes (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019; KHALIL *et al.*, 2022; FAHIM *et al.*, 2025).

A proteína Esp (*Enterococcal surface protein*), por exemplo, codificada pelo gene *esp*, é um importante fator de virulência em *E. faecalis*, com papel reconhecido na adesão bacteriana e na formação de biofilme. Sua presença tem sido relatada principalmente em cepas isoladas de pacientes com bacteremia, sendo ausente em indivíduos saudáveis, o que sugere uma associação com o potencial patogênico da bactéria. A capacidade de formar biofilmes facilita a fixação da bactéria a diferentes superfícies e pode conferir maior tolerância a substâncias antimicrobianas (PARADELLA *et al.*, 2007; JOHANSON *et al.*, 2012; FERGUSON *et al.*, 2016).

2.2.2.3 Produção de enzimas

Dentre os fatores de virulência que favorecem a patogenicidade de *Enterococcus faecalis*, a produção de enzimas extracelulares, especialmente a gelatinase, é reconhecida por seu papel na degradação de tecidos e na modulação da resposta imune do hospedeiro. A gelatinase é uma metaloprotease extracelular codificada pelo gene *gelE*, que hidrolisa substratos como gelatina, colágeno, fibrinogênio, hemoglobina e componentes do complemento, facilitando a liberação de nutrientes, a translocação em tecidos e a formação de biofilmes. Estudos revelam que *gelE* está presente em cerca de 78% das cepas clínicas, e sua expressão, controlada pelo sistema de *quorum-sensing* *fsr*, é essencial para a ativação da autólise bacteriana e organização da matriz extracelular (WATERS *et al.*, 2003; LOPES *et al.*, 2006).

Além disso, análises comparativas mostraram que isolados com fenótipo gelatinolítico têm maior capacidade de colonização e disseminação, consolidando o papel da gelatinase como importante mecanismo de virulência (ALI *et al.*, 2017). Essa atividade favorece a adaptação metabólica da bactéria no microambiente da infecção, contribuindo para a persistência tecidual

e a progressão das infecções (ANDERSON *et al.*, 2016). Essa protease está diretamente associada aos mecanismos de patogenicidade desses microrganismos, uma vez que exerce efeito modulador ao inibir a resposta imune do hospedeiro (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019). Além disso, a gelatinase contribui para alterações patológicas relevantes, como o comprometimento da integridade da barreira mucosa, especialmente durante o processo de infecções desencadeadas por *E. faecalis* (GOLIŃSKA *et al.*, 2013).

2.2.2.4 Evasão do sistema imune

A evasão do sistema imunológico constitui um importante fator de virulência que assegura a persistência de *E. faecalis* no hospedeiro. Nesse contexto, destaca-se a citolisina, uma proteína codificada pelo gene *cyl*, capaz de promover a lise de células humanas e animais, como macrófagos e neutrófilos, representando um fator crucial para essa evasão (MILLER *et al.*, 2016). Os genes associados à produção de citolisina (*cylA*, *cylB*, *cylL*, *cylM* e *cylS*) são frequentemente localizados em plasmídeos, codificando toxinas que podem exercer efeito letal sobre células eucariotas e procariotas, sendo comumente identificados em isolados de *Enterococcus* spp. (VAN REENEN; DICKS, 2011).

2.2.3 Estudos de Genômica em *Enterococcus faecalis*

Estudos de genômica em *Enterococcus faecalis* têm fornecido importantes achados sobre sua diversidade, adaptação e epidemiologia. Em uma análise comparativa de 78 genomas isolados de diferentes nichos (fezes, sangue, urina, produtos lácteos e água), HE *et al.* (2018) identificaram um pangenoma composto por 10.573 famílias gênicas e demonstraram que o genoma de *E. faecalis* é altamente plástico, com diferenças significativas no tamanho genômico e no número de ORFs entre ambientes (por exemplo, genomas de água eram menores e com menos ORFs). Estudos de genômica comparativa também confirmam que o pangenoma da espécie é aberto, refletindo elevada plasticidade e variação de elementos de resistência e virulência dependendo do ambiente de isolamento (HE *et al.*, 2018). Em 2016, RAVEN *et al.* sequenciaram 168 isolados de *E. faecalis* associados a infecções hospitalares no Reino Unido e Irlanda, coletados entre 2001 e 2012, revelando três linhagens epidêmicas dominantes (L1, L2 e L3) e múltiplos eventos independentes de aquisição e perda de resistência à vancomicina ao longo desse período.

Em isolados clínicos iranianos, ZALIPOUR *et al.* (2019) identificaram a presença predominante dos genes *vanA* e *ermB*, sendo este último detectado em 96% dos isolados resistentes à eritromicina, juntamente com *aac(6')-Ie-aph(2'')* e *msrA*, evidenciando múltiplas estratégias de resistência antimicrobiana. Estudos recentes também relataram a ocorrência de plasmídeos pequenos, como pE165, portadores do gene *erm(T)*, capazes de ser transferidos horizontalmente entre *E. faecalis* e outras espécies Gram-positivas (LI *et al.*, 2022). Em isolados de aves na Zâmbia, observou-se prevalência de 68,9% de resistência à eritromicina em *E. faecalis*, com detecção frequente dos genes *ermB* e *ermA* (MWIKUMA *et al.*, 2023). Esses achados demonstram a ampla ocorrência de genes *erm* em linhagens clínicas e ambientais, em consonância com a alta incidência de resistência a macrolídeos em isolados humanos e de origem animal (WERNER *et al.*, 2008).

Os estudos revisados evidenciam que o sequenciamento do genoma completo tem se consolidado como uma ferramenta essencial para a análise da estrutura populacional, a detecção de genes de resistência e a investigação dos mecanismos de adaptação de *E. faecalis* em diferentes ambientes clínicos e naturais.

3 JUSTIFICATIVA

Infecções causadas por *Enterococcus faecalis* representam um desafio crescente para a Saúde Pública, especialmente em ambientes hospitalares, devido à combinação de resistência intrínseca a diversas classes de antimicrobianos, plasticidade genômica e elevada capacidade de adquirir genes de resistência por transferência horizontal (GILMORE *et al.*, 2013; LEBRETON *et al.*, 2017). Essa adaptabilidade genômica compromete a eficácia terapêutica, contribuindo para o aumento da morbidade e mortalidade, prolongamento de internações e elevação dos custos associados ao tratamento de infecções multirresistentes (ARIAS; MURRAY, 2012).

Embora tradicionalmente associado a infecções nosocomiais, *E. faecalis* é também encontrado em ecossistemas naturais e em uma ampla variedade de hospedeiros, atuando como um possível elo entre ambientes naturais e clínicos (WEIGAND *et al.*, 2014; FREITAS *et al.*, 2022). Essa presença em habitats pouco impactados pelo homem levanta preocupações quanto ao papel da fauna silvestre como reservatório silencioso de genes de resistência e virulência, os quais podem ser mobilizados para contextos clínicos por meio de eventos de transferência gênica (STANTON *et al.*, 2022).

Nesse cenário, a caracterização genômica de *E. faecalis* isolado de animais silvestres contribui significativamente para o entendimento dos determinantes genéticos envolvidos na resistência antimicrobiana e na virulência. A análise desses elementos genéticos possibilita a identificação de padrões moleculares de interesse epidemiológico, subsidiando ações de vigilância e controle de forma mais abrangente (HAMMERUM, 2012; OMS, 2021).

Além disso, análises genômicas comparativas ajudam a elucidar rotas de disseminação e adaptação evolutiva da espécie em diferentes nichos ecológicos, destacando a importância da vigilância integrada entre saúde humana, animal e ambiental.

Dessa forma, o presente estudo se justifica pela relevância científica e epidemiológica de investigar linhagens de *E. faecalis* oriundas da fauna silvestre, especialmente em uma região de impacto ambiental moderado, como o Parque Nacional do Vale do Catimbau. A geração e análise desses dados genômicos fornecem subsídios para a compreensão da dinâmica evolutiva da resistência antimicrobiana e do potencial patogênico de isolados não clínicos, contribuindo com estratégias de mitigação e políticas públicas de vigilância microbiológica.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar, por meio da genômica comparativa, três (n=3) linhagens de *Enterococcus faecalis* isolados de animais silvestres habitantes do Parque Nacional do Catimbau (PE).

4.2 Objetivos específicos

- Montar e anotar os genes dos isolados bacterianos;
- Caracterizar o perfil genômico quanto à similaridade nucleotídica;
- Realizar análise filogenética;
- Realizar análises comparativas para compreender a dispersão desta bactéria;
- Realizar predições de genes de resistência e de virulência.

5 METODOLOGIA

5.1. Isolamento bacteriano e testes bioquímicos para identificação e resistência

As três estirpes de *Enterococcus faecalis* utilizadas neste trabalho foram obtidas durante o trabalho de campo no Vale do Catimbau e foram isoladas via *swab* retal e otológico. A Tabela 1 mostra o nome dos isolados, o hospedeiro, a data de coleta, a fonte de isolamento e o meio de cultura utilizado para crescimento dos isolados bacterianos.

Tabela 1 - Dados de coleta dos isolados das amostras deste trabalho

Nome dos Isolados	Hospedeiro	Data de Coleta	Fonte de Isolamento	Meio de Cultura
S61_2	<i>Galea spixii</i>	14/09/2021	Otológico	MacConkey
S77_1	<i>Didelphis albiventris</i>	15/09/2021	Retal	XLD
S77_2	<i>Didelphis albiventris</i>	15/09/2021	Retal	MacConkey

Fonte: Adaptado pela autora a partir de dados fornecidos pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, comunicação pessoal, 2023.

Os isolados foram identificados utilizando-se métodos morfológicos e bioquímicos (MARKEY *et al.*, 2013). A Tabela Anx.A.1 do Anexo A mostra os resultados morfológicos e bioquímicos para cada um dos três isolados deste trabalho.

A Tabela 2 apresenta os resultados dos antibiogramas dos isolados obtidos, nos quais os resultados são identificados como R para Resistente, S para Sensível e I para Intermediário ou Sensível Aumentando Exposição.

Tabela 2 - Resultado do antibiograma dos três isolados

Isolado	Antibiótico												
	CLI	CFZ	SUT	FLF	NIT	TOB	ERI	AMC	CFO	CRO	DOX	IPM	LNZ
S61_2	R	R	S	I	R	R	R	R	R	I	R	S	R
S77_1	R	R	S	S	I	R	R	S	R	S	S	I	S
S77_2	R	R	R	S	S	R	I	S	R	S	S	I	S

Fonte: Adaptado pela autora a partir de dados fornecidos pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, comunicação pessoal, 2023.

Nota: Siglas dos antibióticos: CLI – Clindamicina (Lincosamida), CFZ – Cefazolina (Cefalosporina de 1.^a geração), SUT – Sulfazotrim (Sulfonamidas + Diaminopirimidina), FLF – Florfenicol (Fenicois), NIT – Nitrofurantoina (Nitrofurânicos), TOB – Tobramicina (aminoglicosídeo), ERI – Eritromicina (macrolídeo), AMC – Ácido clavulânico + Amoxicilina (classe β -lactâmica), CFO – Cefoxitina (cefalosporina de 2.^a geração), CRO – Ceftriaxona (cefalosporina de 3.^a geração), DOX – Doxíciclina (tetraciclina), IMP – Imipenem (carbapenem) e LNZ – Linezolida (oxazolidinonas).

5.2 Sequenciamento genômico, montagem e avaliação da qualidade

Após o isolamento, extração de DNA e demais procedimentos pertinentes, as cepas foram sequenciadas na plataforma Illumina HiSeq 2500, utilizando-se uma biblioteca preparada para sequenciamento *paired-end* (2×150 pb) (GUNDERSON *et al.*, 2005). A avaliação da qualidade dos dados brutos de sequenciamento foi realizada utilizando-se o FastQC v. 0.12.1 (ANDREWS, 2010). A montagem foi feita utilizando-se o software Unicycler v. 0.4.7 e, como um parâmetro de montagem, foi definido que o menor contig deveria ter no mínimo 200 pb, devido às determinações do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para depósito. A ferramenta QUAST v. 5.0.2 (GUREVICH *et al.*, 2013) foi utilizada para avaliar a qualidade da montagem, o CheckM2 v. 1.0.1 (CHKLOVSKI *et al.*, 2022) foi utilizado para identificar o valor de viés da montagem. Para identificar as espécies mais próximas das estirpes deste trabalho, foi utilizada a ferramenta online JSpeciesWS (RICHTER *et al.*, 2016) utilizando-se o método Tetra Correlation Search (TCS) e o BUSCO v. 5.4.7 (MANNI *et al.*, 2021) foi utilizada para avaliar a completude dos genomas montados.

5.3 Depósito dos dados genômicos

As três estirpes de *Enterococcus faecalis* oriundos do Vale do Catimbau foram submetidos no NCBI na data de 20 de setembro de 2024, com o código de *BioProject* PRJNA1159172, sendo a amostra S61_2 com o *BioSample* SAMN43567285, a amostra S77_1 com o *BioSample* SAMN43567286 e a amostra S77_2 com o *BioSample* SAMN43567287.

5.4 Análises genômicas, uso de bancos de dados e anotação genômica

Após a verificação primária da espécie e a análise da completude, foram obtidos 265 genomas completos do banco de dados do NCBI, no modelo *RefSeq*, em 7 de junho de 2024, para serem utilizados em análises comparativas posteriores. Dentre esses, 264 pertencem à

espécie *Enterococcus faecalis* e um foi selecionado como grupo externo, para fins de contraste filogenético. A linhagem K-12 da bactéria *Escherichia coli* foi escolhida como grupo externo devido a sua distância evolutiva. Os genomas de *E. faecalis* obtidos do NCBI que foram utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela A.1 do Apêndice A com informações de metadados contendo o nome do isolado, *BioSample*, *BioProject*, hospedeiro (quando aplicável e disponível), ano de coleta (quando disponível), ano de depósito, fonte de coleta (quando disponível), país de coleta (quando disponível), enfermidade do hospedeiro (quando aplicável e disponível).

Após, foi realizada a análise de identidade média de nucleotídeos (ANI) com a ferramenta pyANI v. 0.2.12, utilizando o método de alinhamento MUMmer e um critério de similaridade $\geq 96\%$ (PRITCHARD *et al.*, 2016). Foram incluídos apenas genomas de *E. faecalis*, sendo 264 obtidos do NCBI e três deste estudo. Essa etapa permitiu confirmar a identidade das estirpes e fornecer suporte para as análises comparativas subsequentes.

Todos os genomas (n=268) utilizados neste estudo foram anotados com a ferramenta PROKKA v. 1.14.6 (SEEMANN, 2014), garantindo a padronização por meio da aplicação de um único método de anotação.

5.5 Análises filogenômicas

O Orthofinder v. 2.5.5 foi utilizado para construir uma árvore filogenômica (EMMS; KELLY, 2019). O alinhamento foi realizado utilizando MAFFT (*Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*) e alinhamento intrínseco utilizando Alinhamento de Sequências Múltiplas (MSA). A avaliação da árvore filogenômica foi realizada utilizando-se todos os 268 genomas, sendo 265 obtidos do NCBI e três deste trabalho. A árvore foi visualizada e editada utilizando-se o iTOL v. 6 (LETUNIC; BORK, 2024). A linhagem *E. coli* K-12 serviu de contraste para a construção da árvore. A inferência filogenética foi realizada com 1000 réplicas de bootstrap, utilizando a ferramenta IQ-TREE v. 2.2.2.7 (WONG *et al.*, 2023).

5.6 Análises do panresistoma e panviruloma

Os genes de resistência e virulência foram identificados utilizando-se o PanViTa (RODRIGUES *et al.*, 2023), com um limite mínimo de identidade de 70%. A análise utilizou o banco de dados do *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD) para a identificação de genes de resistência (ALCOCK *et al.*, 2023) e os genes de virulência foram identificados

pelo banco de dados do *Virulence Factors of Pathogenic Bacteria* (VFDB) (LIU *et al.*, 2022). A visualização de dados e a plotagem de gráficos e *heatmaps* foram feitas no software R (R CORE TEAM, 2023), com interface no ambiente RStudio (v. 4.3.1) (RSTUDIO TEAM, 2023), utilizando pacotes como *tidyr*, *dplyr*, *ggplot2* e *pheatmap*.

6 RESULTADOS

Nesta seção, são apresentados os dados obtidos a partir das análises genômicas e filogenômicas das amostras estudadas. Inicialmente, são descritos os resultados relativos à qualidade e completude das montagens genômicas, seguidos pela identificação taxonômica das cepas. Em seguida, são detalhadas as análises de similaridade genômica (ANI) e a construção da árvore filogenômica, que permitiram compreender a relação evolutiva entre as estirpes investigadas. Por fim, são apresentadas as análises funcionais voltadas à detecção de genes relacionados à resistência a antimicrobianos e fatores de virulência, permitindo a caracterização dos perfis genéticos das amostras permitindo a identificação e análise dos determinantes genéticos envolvidos na resistência a antimicrobianos e na patogenicidade.

6.1 Montagem e anotação genômica dos isolados

6.1.1 Avaliação da qualidade da montagem

Após a montagem dos dados brutos, o QUAST, utilizado na avaliação da qualidade, forneceu dados importantes, conforme mostrado na Tabela 3. Os genomas analisados apresentam valores semelhantes ao genoma de referência *Enterococcus faecalis* EnGen0336 (NCBI:txid1169293), estando, assim, em conformidade com os dados descritos na literatura para a espécie. A cobertura de sequenciamento de cada genoma também está indicada na tabela.

Tabela 3 - Estatísticas dos genomas após a montagem

Dados	S61_2	S77_1	S77_2
Nº contigs	44	42	42
Tamanho total	2787764	2787934	2787664
N50	260248	260248	260248
N75	135316	135316	135316
L50	5	5	5
L75	9	9	9
Cobertura	218,12x	481,58x	375,46x

Fonte: Resultados do software Unicycler v. 0.4.7, adaptados pela autora.

A Tabela 4 apresenta as principais métricas de qualidade e características dos genomas, avaliadas pelo CheckM2, obtidos nas amostras analisadas. A completude dos genomas foi de

100%, com níveis mínimos de contaminação. A densidade gênica e o comprimento médio dos genes foram consistentes entre as amostras. As métricas de montagem, como N50, número total de contigs e tamanho do maior contig, apresentaram variações entre as amostras, com valores detalhados na tabela. O tamanho do genoma e o conteúdo de GC também se mantiveram estáveis entre as amostras.

Tabela 4 - Métricas de qualidade e características dos genomas das amostras

Métrica	S61_2	S77_1	S77_2
Completeness (%)	100	100	100
Contaminação (%)	2	2	2
Densidade Gênica	883	883	883
N50 dos Contigs (pb)	260.248	260.248	260.248
Comprimento Médio do Gene (pb)	313	312	312
Tamanho do Genoma (pb)	2.792.190	2.792.360	2.792.383
Conteúdo de GC (%)	38	38	38
Maior Contig (pb)	389.774	389.774	389.774

Fonte: Resultados do software CheckM2 v. v. 1.0.1, adaptado pela autora

6.1.2 Estimativa de completude genômica

A análise de completude genômica das três amostras de *Enterococcus faecalis* foi realizada utilizando o software BUSCO, com o conjunto de ortólogos conservados da ordem Lactobacillales (n=402). A análise mostrou a presença de 401 (99,8%) genes classificados como completos dentre os 402 genes pesquisados, sendo 399 (99,3%) em cópia única e dois (0,5%) duplicados. Um gene (0,2%) foi considerado ausente, e nenhum gene foi classificado como fragmentado, conforme ilustrado na Figura 1.

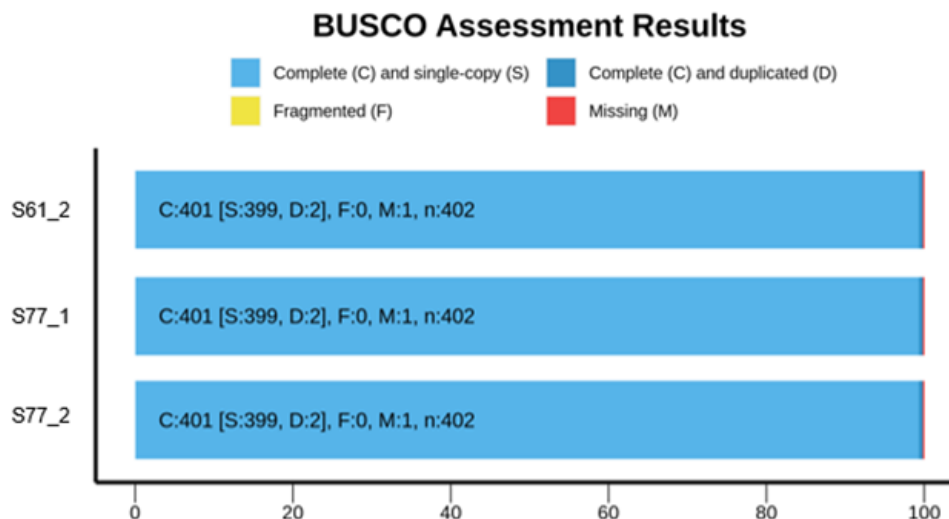


Figura 1. Análise de completude genômica dos isolados.

Fonte: Resultado gerado no software BUSCO v. 5.4.7.

6.2 Identidade média de nucleotídeos (ANI)

A Figura 2 apresenta a matriz de similaridade obtida a partir da análise de identidade média de nucleotídeos (ANI) entre os genomas analisados. Os valores percentuais representam a similaridade par a par entre as amostras, refletindo o grau de proximidade genômica entre elas. De acordo com a escala de cores utilizada no *heatmap*, tons mais intensos de vermelho indicam altos níveis de identidade nucleotídica, geralmente iguais ou superiores a 96%, sugerindo elevada similaridade genômica. Observa-se que as amostras deste estudo apresentam ANI $\geq 96\%$ entre si e em relação a diversos outros genomas da base analisada, o que reforça sua classificação dentro da espécie *Enterococcus faecalis*.

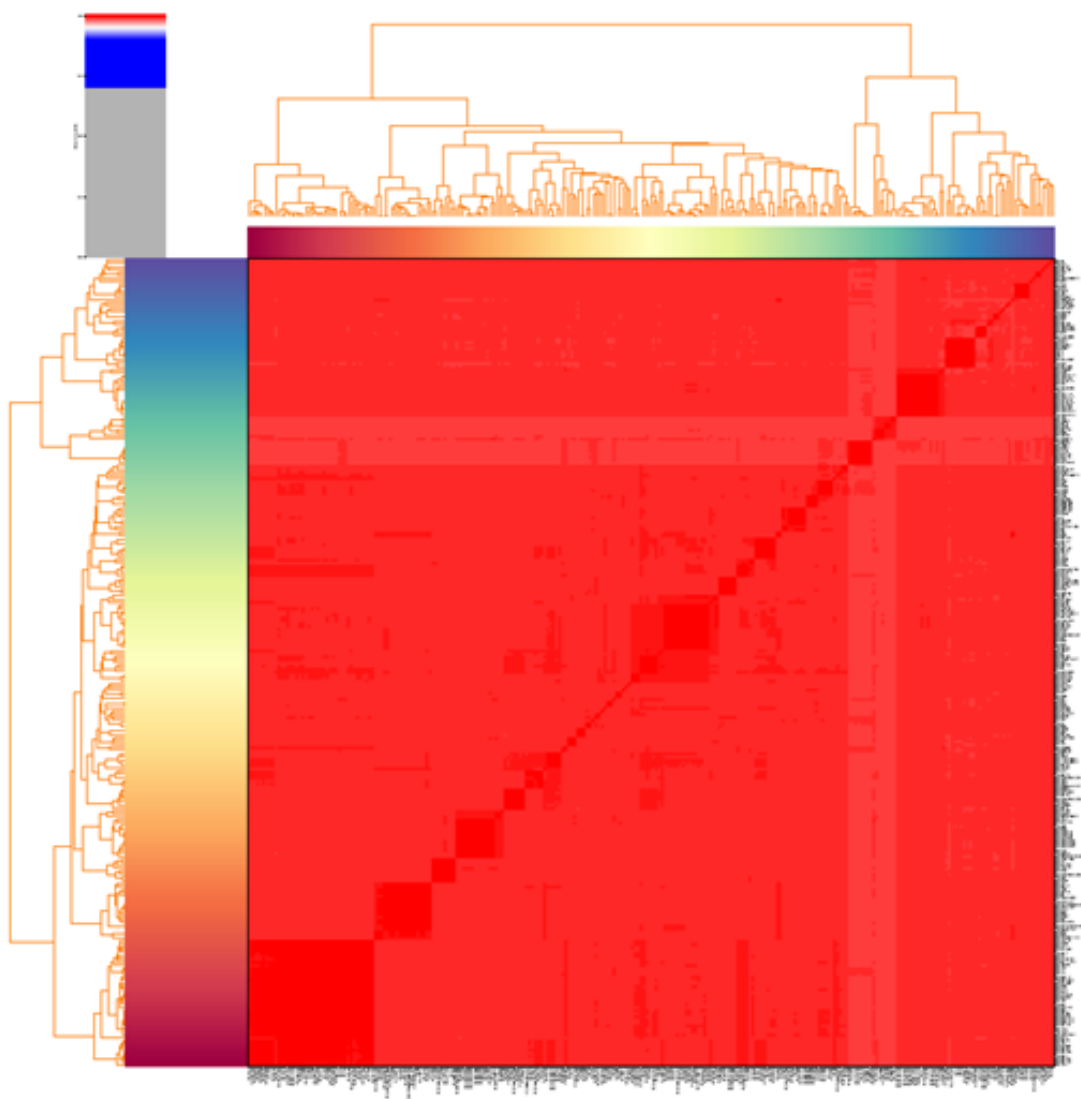


Figura 2. *Heatmap* da Análise de Identidade Média de Nucleotídeos (ANI) entre 267 genomas de *Enterococcus faecalis*.

Fonte: Resultado gerado no software pyANI v. 0.2.12.

6.3 Análise filogenômica

A visualização da árvore permitiu identificar agrupamentos de amostras com base na espécie hospedeira e na origem geográfica. Em diversos clados, observou-se a presença de amostras provenientes de um mesmo país ou isoladas de um mesmo hospedeiro. Em outros agrupamentos, houve mistura entre diferentes países e hospedeiros. Algumas amostras com origem ou hospedeiro não informado ou desconhecido permaneceram distribuídas entre diferentes ramos. Da mesma maneira, algumas amostras de origem ambiental ou de alimentos estão distribuídas entre diferentes ramos. A árvore filogenômica pode ser visualizada na Figura

3 e as legendas das cores utilizadas para hospedeiros e região geográfica podem ser visualizadas na Figura 4A e 4B.

De modo geral, os ramos mais externos da árvore apresentaram altos valores de suporte, com diversos nós exibindo *bootstrap* igual a 100. Já a maioria dos ramos mais internos apresentaram valores consideravelmente mais baixos, incluindo casos com suporte inferior a dez. Foi observada variação nos valores de *bootstrap* ao longo da árvore.

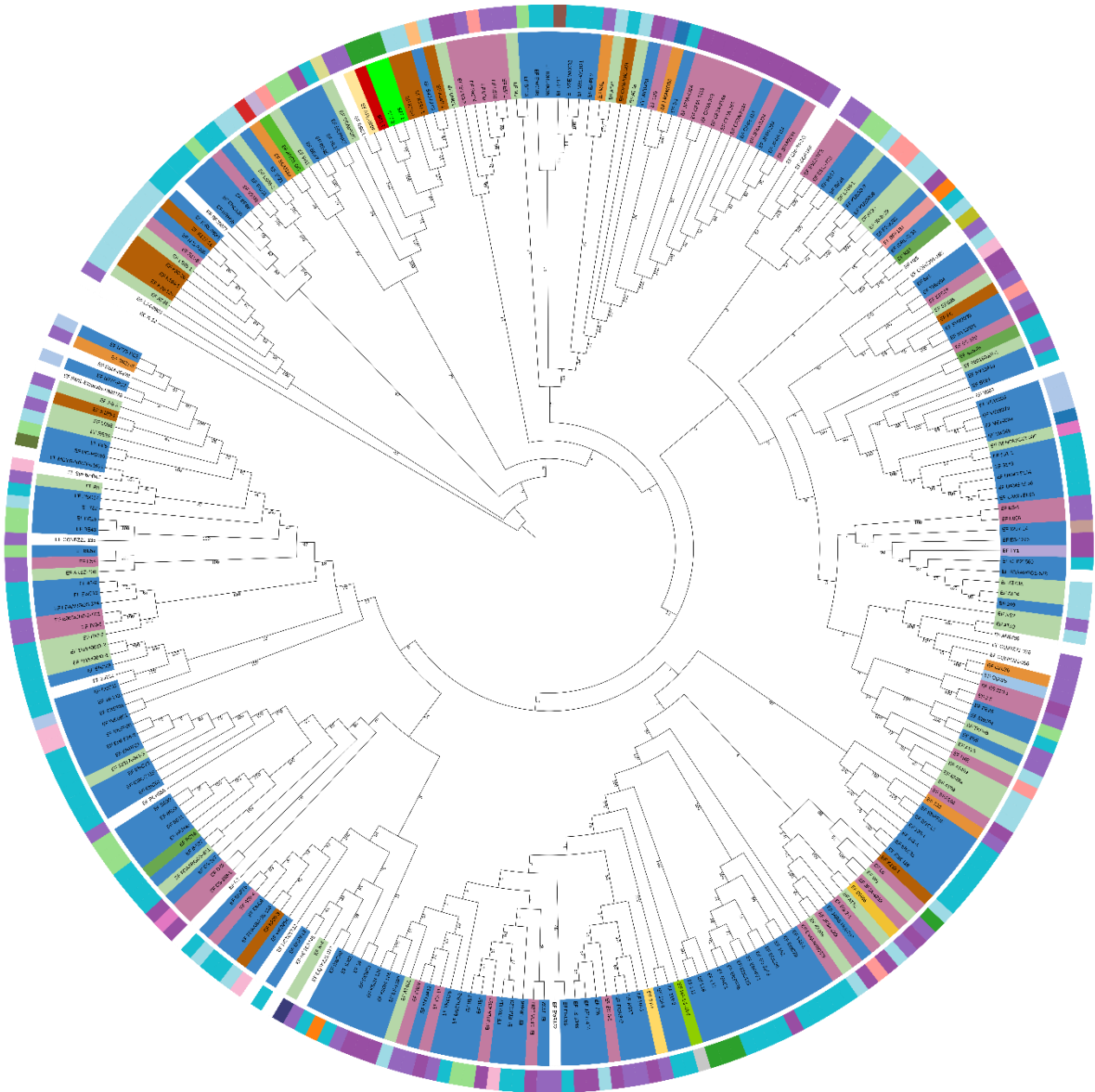


Figura 3. Árvore filogenômica baseada na concatenação de genes ortólogos de 267 genomas de *E. faecalis* e uma amostra de *E. coli* como *outgroup*. Os nomes dos isolados estão coloridos conforme o hospedeiro (ver Figura 4A) e o país de origem (ver Figura 4B).

Fonte: Elaborado pela autora a partir de árvore gerada no software OrthoFinder v. 2.5.5 e editada no iTOL v. 6 (2025).

Hospedeiros	A	País	B
Anas platyrhynchos domesticus		Alemanha	
Anser spp.		Bangladesh	
Bos taurus		Brasil	
Camelus bactrianus		Canadá	
Canis lupus familiaris		China	
Capra aegagrus hircus		Colômbia	
Desconhecido		Coreia do Sul	
Didelphis albiventris		Desconhecido	
Galea spixii		Dinamarca	
Gallus gallus domesticus		Espanha	
Homo sapiens		EUA	
Mus musculus		França	
NA		Índia	
Oreochromis niloticus		Itália	
Pleuronectoidei spp.		Japão	
Rhodnius prolixus		Nova Zelândia	
Sus scrofa domesticus		Polônia	
		Reino Unido	
		República Tcheca	
		Singapura	
		Suíça	
		Tailândia	
		Tunísia	

Figura 4. Legenda das cores utilizadas na árvore filogenômica (ver Figura 3). A) Cores representando os diferentes hospedeiros dos quais as amostras de *E. faecalis* foram isoladas. B) Cores representando os países de origem das amostras. Amostras com informações ausentes sobre hospedeiro ou país (Desconhecido) permaneceram sem coloração.

Nota: NA - Amostra proveniente de ambiente ou alimento.

Fonte: Elaborado pela autora a partir de árvore gerada no software OrthoFinder v. 2.5.5 e editada no iTOL v. 6 (2025).

A Tabela 5 apresenta a frequência absoluta e relativa dos genomas utilizados na análise filogenômica, classificados conforme o hospedeiro de origem. Foram identificadas 17 categorias distintas, sendo a maioria dos genomas provenientes de seres humanos (48,51%), seguida por suínos de produção (16,42%) e por amostras de origem ambiental ou alimentar (14,55%). As demais categorias, exceto a categoria “Desconhecidos” (8,58%), incluem isolados obtidos a partir de diferentes espécies animais, como bovinos, aves, roedores, marsupiais, entre outros, com frequência individual inferior a 5%.

Tabela 5 - Frequência absoluta e relativa dos genomas por espécies

Espécie	Frequência absoluta (n/17)	Frequência relativa (%)
<i>Anas platyrhynchos domesticus</i>	1	0,37
<i>Anser spp.</i>	1	0,37
<i>Bos taurus</i>	12	4,48
<i>Camelus bactrianus</i>	1	0,37
<i>Canis lupus familiaris</i>	1	0,37
<i>Capra aegagrus hircus</i>	1	0,37
Desconhecido	23	8,58
<i>Didelphis albiventris</i>	2	0,75
<i>Galea spixii</i>	1	0,37
<i>Gallus gallus domesticus</i>	6	2,24
<i>Homo sapiens</i>	130	48,51
<i>Mus musculus</i>	3	1,12
A/A	39	14,55
<i>Oreochromis niloticus</i>	1	0,37
<i>Pleuronectoidei spp.</i>	1	0,37
<i>Rhodnius prolixus</i>	1	0,37
<i>Sus scrofa domesticus</i>	44	16,42

Nota: A/A - Amostra proveniente de ambiente ou alimento.

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

6.4 Análise do Panresistoma

6.4.1 Panresistoma em 267 genomas de *Enterococcus faecalis*

6.4.1.1 Mecanismos de resistência identificados

Foram identificados seis diferentes mecanismos de resistência aos antimicrobianos nos 267 genomas de *Enterococcus faecalis* analisados, como ilustrado na Figura 5. A maior parte dos mecanismos está associada a genes acessórios e exclusivos. O mecanismo de inativação de

antibióticos foi o mais frequente, com 11 genes classificados como acessórios e cinco como exclusivos. O mecanismo de efluxo de antibióticos apresentou dois genes pertencentes ao genoma central, cinco acessórios e dois exclusivos. Os mecanismos de proteção do alvo do antibiótico e de alteração do alvo do antibiótico também mostraram diversidade, com predominância de genes acessórios. Os mecanismos de substituição do alvo do antibiótico e redução da permeabilidade ao antibiótico apresentaram menor variabilidade, com um gene central identificado em cada categoria e poucos genes acessórios e exclusivos.

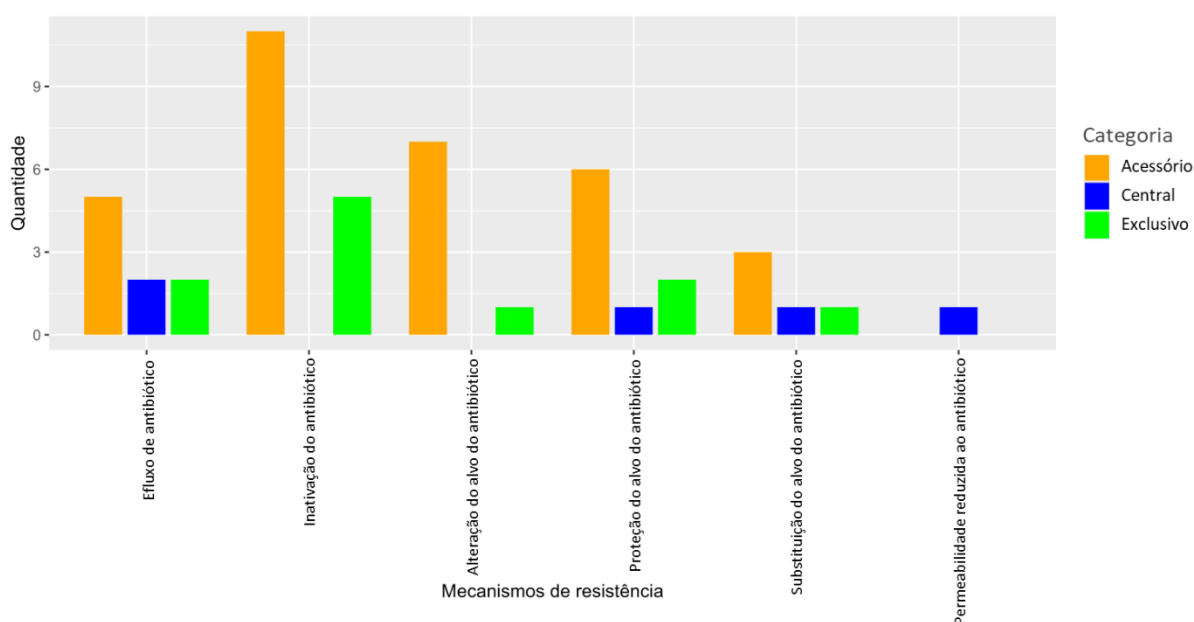


Figura 5. Classificação dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos em genes do panresistoma de *Enterococcus faecalis* com base na presença em genomas centrais, acessórios ou exclusivos, considerando 267 genomas analisados.

Fonte: Elaborado pela autora a partir de dados obtidos no PanViTa, utilizando o software RStudio v. 4.3.1 (2025).

6.4.1.2 Classes de antimicrobianos associadas

Na análise das classes de antimicrobianos, foram encontrados genes distribuídos entre os resistomas central, acessório e exclusivo, abrangendo diferentes classes, como mostrado na Figura 6. Dentre as classes com genes presentes no resistoma central, destacam-se: lincosamidas, macrolídeos, estreptograminas, fluoroquinolonas, desinfetantes e antissépticos, cefalosporinas, rifamicinas, diaminopirimidinas, pleuromutilinas e estreptograminas do tipo A e B. Além disso, observaram-se classes que apresentaram apenas genes do resistoma acessório e/ou exclusivo, como aminoglicosídeos, tetraciclina, peptídeos, fenicóis, glicopeptídeos, oxazolidinonas, fosfônicos, nucleosídeos e antibióticos da classe estreptogramina A. As classes

com maior diversidade de distribuição (com presença nas três categorias do resistoma) foram lincosamidas, macrolídeos, estreptograminas e diaminopirimidinas.

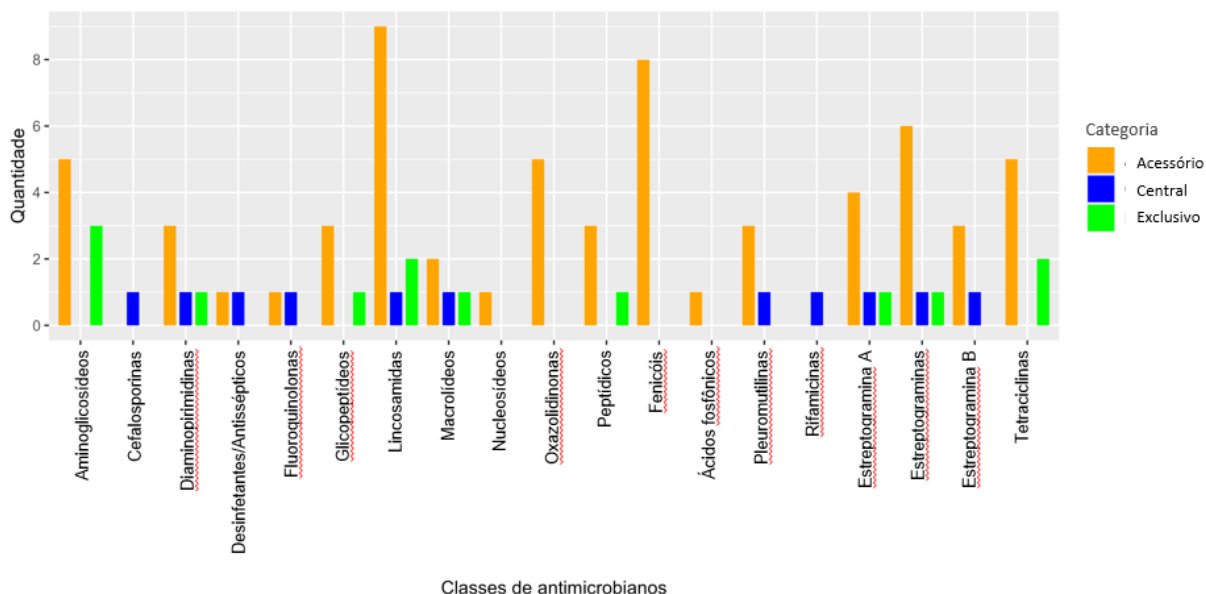


Figura 6. Distribuição dos genes de resistência a diferentes classes de antibióticos entre os resistomas central, acessório e exclusivo a partir da análise dos 267 genomas de *Enterococcus faecalis*.

Fonte: Elaborado pela autora a partir de dados obtidos no PanViTa, utilizando o software RStudio v. 4.3.1 (2025).

6.4.1.3 Genes de resistência identificados

Foram identificados 65 genes de resistência a antimicrobianos (ARGs) nos 267 genomas analisados de *Enterococcus faecalis*, com ampla variação no número de genes por amostra. A frequência relativa e absoluta dos ARGs detectados está apresentada na Tabela B.1, no Apêndice B. Essa tabela tem caráter exclusivamente descritivo e visa complementar a caracterização geral do conjunto de genomas analisado. Ressalta-se que os genes de resistência identificados nos 267 genomas utilizados nas análises comparativas não serão discutidos nesta dissertação.

6.4.2 Panresistoma dos três genomas analisados

6.4.2.1 Mecanismos de resistência observados

A análise dos mecanismos de resistência dos genes identificados nos três genomas indicou que todos pertencem ao resistoma central, estando presentes em todas as amostras. Não

foram observados mecanismos classificados como pertencentes ao resistoma acessório ou exclusivo. Os mecanismos de resistência encontrados foram: efluxo de antibiótico, redução da permeabilidade ao antibiótico, substituição do alvo do antibiótico e proteção do alvo do antibiótico, como pode ser observado na Figura 7.

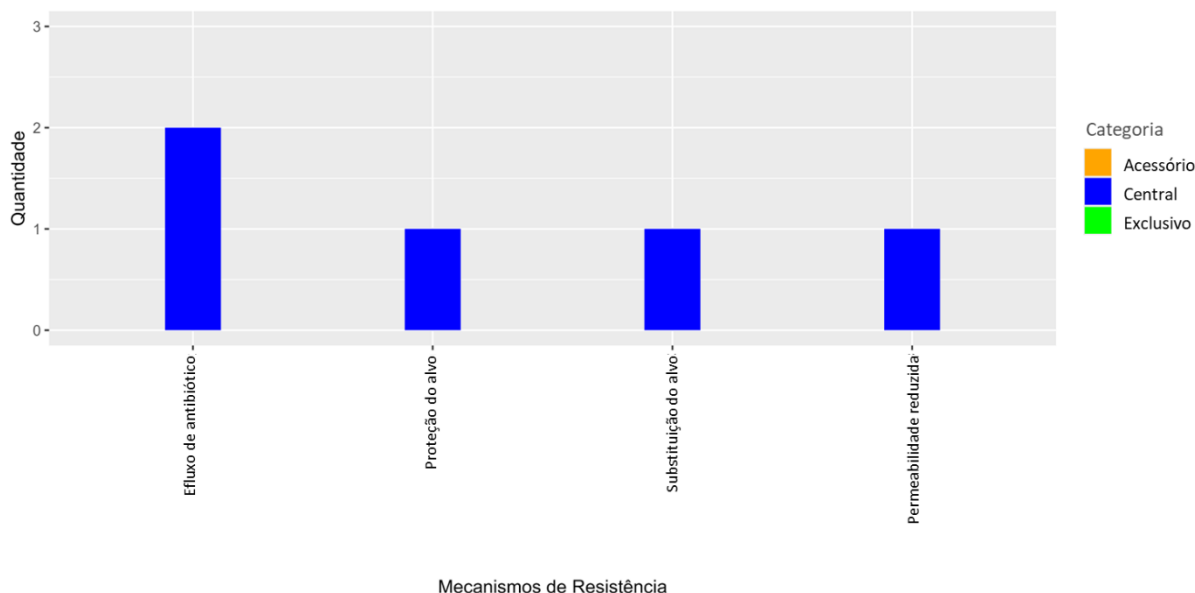


Figura 7. Classificação dos genes de resistência antimicrobiana de acordo com o mecanismo de resistência envolvido e o tipo de distribuição no resistoma: central, acessório ou exclusivo. Fonte: Elaborado pela autora a partir de dados obtidos no PanViTa, utilizando o software RStudio v. 4.3.1 (2025).

6.4.2.2 Classes de antimicrobianos detectadas

A categorização dos genes relacionados à resistência antimicrobiana de acordo com as classes de antibióticos às quais conferem resistência mostrou que todos os genes encontrados nas amostras pertencem ao grupo de genes do resistoma central, ou seja, foram compartilhados por todas as amostras analisadas. Nenhum gene foi identificado como pertencente ao resistoma acessório ou exclusivo. As classes de antimicrobianos associadas aos genes detectados incluem: lincosamidas, macrolídeos, estreptograminas, fluoroquinolonas, agentes desinfetantes e antissépticos, cefalosporinas, rifamicinas, diaminopirimidinas e pleuromutilinas, conforme ilustrado na Figura 8.

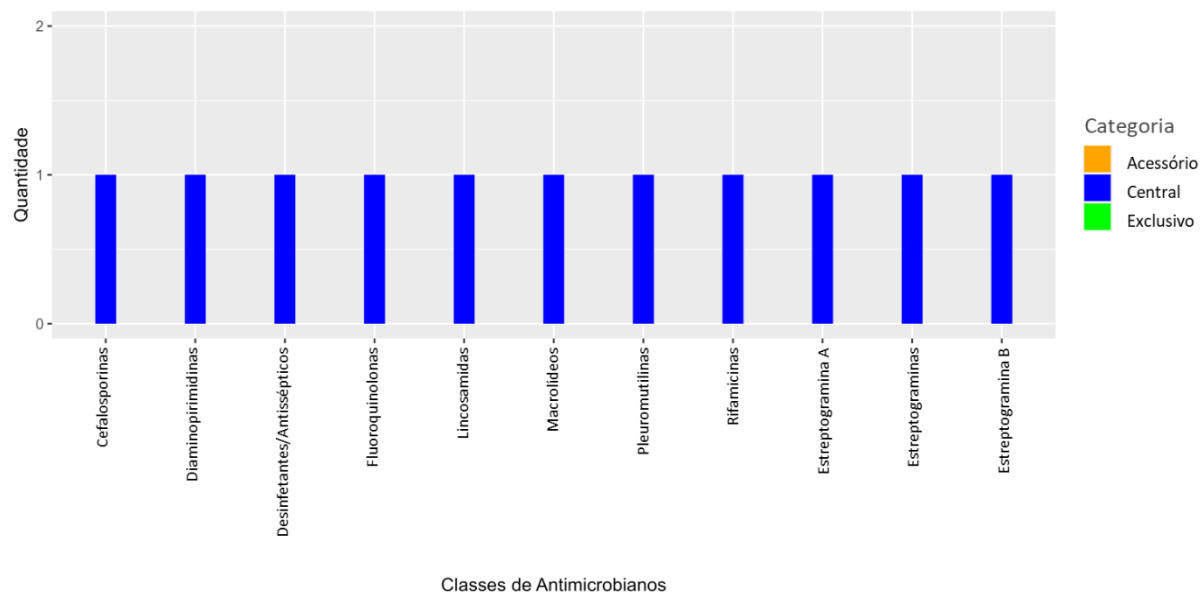


Figura 8. Classificação dos genes de resistência antimicrobiana detectados nas amostras segundo a classe de antibiótico e o tipo de distribuição no resistoma: central, acessório ou exclusivo.
Fonte: Elaborado pela autora a partir de dados obtidos no PanViTa, utilizando o software RStudio v. 4.3.1 (2025).

6.4.2.3 Genes de resistência identificados

No conjunto das três amostras de *Enterococcus faecalis* investigadas neste estudo, foram detectados cinco genes relacionados à resistência antimicrobiana, todos com altos percentuais de identidade: *dfrE*, *emeA*, *ireK*, *lsaA* e *efrA*. Os genes *dfrE*, *IreK*, *lsaA* e *efrA* apresentaram identidade superior a 98% em todas as amostras. O gene *emeA* apresentou a menor identidade relativa, com 93,9% em S77_1, S77_2 e S61_2, conforme apresentado na Figura 9.

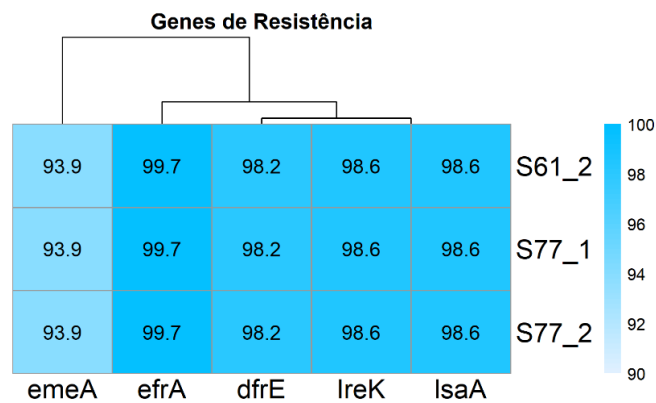


Figura 9. Identidade dos genes de resistência detectados nas cepas de *Enterococcus faecalis*. Os valores correspondem à porcentagem de identidade dos genes identificados com base nas análises de similaridade.
Fonte: Elaborado pela autora a partir de dados obtidos no PanViTa, utilizando o software RStudio v. 4.3.1 (2025).

6.5 Análise do Panviruloma

6.5.1 Panviruloma em 267 genomas de *Enterococcus faecalis*

6.5.1.1 Mecanismos de virulência identificados

A análise dos 267 genomas de *Enterococcus faecalis* possibilitou a identificação de genes de virulência distribuídos em seis mecanismos funcionais: exotoxinas, formação de biofilme, modulação imune, aderência, exoenzimas e sobrevivência ao estresse. Esses genes foram classificados nas categorias genômicas central, acessório e exclusivo, conforme apresentado na Figura 10.

O mecanismo de aderência apresentou o maior número de genes no grupo central (n=6), seguido por modulação imune (n=4), formação de biofilme (n=1) e sobrevivência ao estresse (n=1). Por outro lado, os mecanismos de exotoxinas e exoenzimas não apresentaram genes no grupo central, estando restritos à categoria acessório, com nove e quatro genes, respectivamente. O mecanismo de modulação imune destacou-se por apresentar o maior número total de genes (n=15), distribuídos entre as três categorias: quatro genes centrais, dez acessórios e um exclusivo — sendo o único mecanismo com gene exclusivo. Os demais mecanismos apresentaram distribuição limitada entre os grupos central e acessório, sem ocorrência de genes exclusivos.

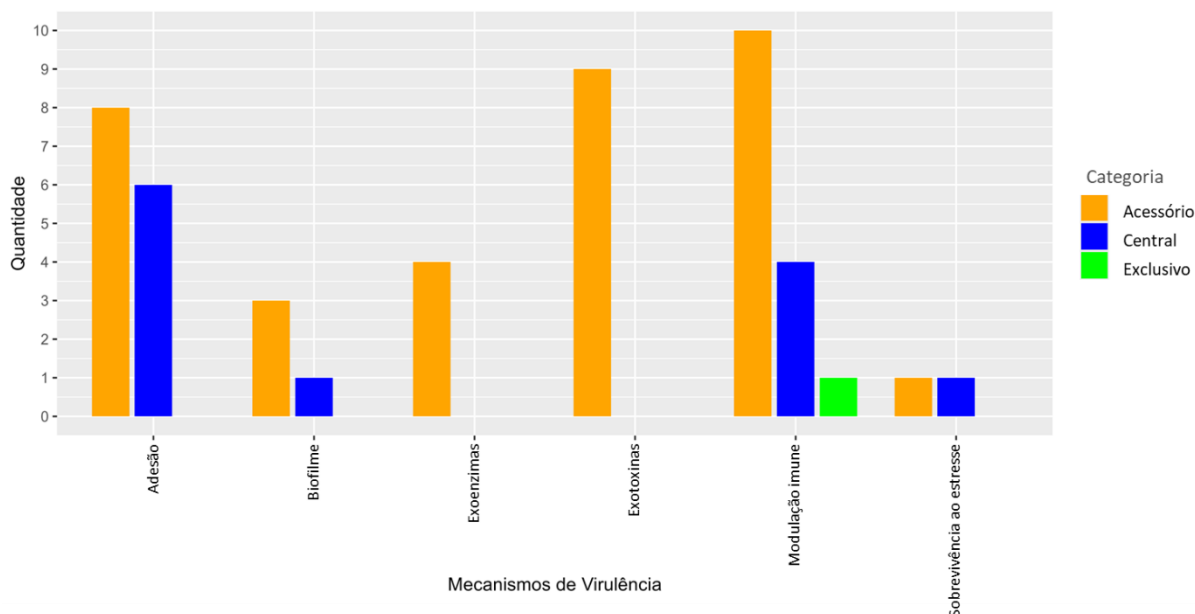


Figura 10. Classificação dos genes de virulência com base nos mecanismos de ação e sua distribuição nos grupos central, acessório e exclusivo, obtida a partir da análise de 267 genomas de *Enterococcus faecalis*.

Fonte: Elaborado pela autora a partir de dados obtidos no PanViTa, utilizando o software R v. 4.3.1 (2025).

6.5.1.2 Genes de virulência identificados

Foram identificados 48 genes de virulência nos 267 genomas analisados de *Enterococcus faecalis*, com ampla variação no número de genes por amostra. A frequência relativa e absoluta dos genes detectados está apresentada na Tabela C.1, no Apêndice C. Essa tabela tem caráter exclusivamente descritivo e visa complementar a caracterização geral do conjunto de genomas analisado. Ressalta-se que os genes de virulência identificados nos 267 genomas utilizados nas análises comparativas não serão discutidos nesta dissertação.

6.5.2 Panviruloma dos três genomas analisados

6.5.2.1 Mecanismos de virulência observados

Na análise dos três genomas de *Enterococcus faecalis* deste estudo, foram identificados genes pertencentes a seis mecanismos de virulência distintos, conforme representado na Figura 11. O mecanismo de aderência apresentou a maior quantidade de genes, com sete classificados como central e um como acessório. Os mecanismos de formação de biofilme, modulação imune e exoenzimas apresentaram quatro genes centrais cada. Também foram identificados genes

centrais relacionados à sobrevivência ao estresse (n=1) e exotoxinas (n=1). Nenhum gene foi classificado como exclusivo.

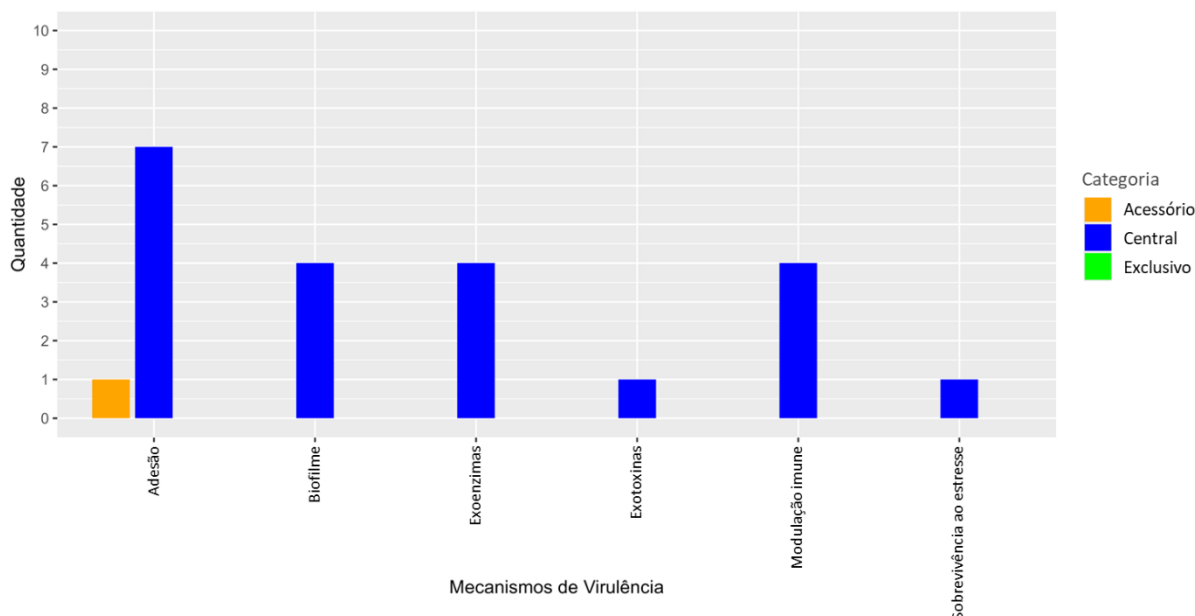


Figura 11. Classificação dos genes de virulência com base nos mecanismos de ação e sua distribuição nos grupos central, acessório e exclusivo, identificados a partir da análise dos três genomas de *Enterococcus faecalis* deste estudo.

Fonte: Elaborado pela autora a partir de dados obtidos no PanViTa, utilizando o software R v. 4.3.1 (2025).

6.5.2.2 Genes de virulência presentes nos isolados

Em relação aos genes de virulência, foram identificados 22 genes nas três amostras analisadas (S77_1, S77_2 e S61_2). De forma geral, os genes apresentaram altas porcentagens de identidade. Nas três amostras, os genes *efaA*, *cpsB/cdsA*, *cpsA/uppS*, *fsrA*, *fsrB*, *fsrC*, *gelE*, *sprE*, *srtC*, *ebpC*, *ebpB*, *ebpA*, *bopD*, *gndA*, EF3023, *lap*, EF0818 e *asaI* foram detectados com percentuais de identidade variando entre 70,0% e 100,0%.

Quatro genes apresentaram identidade inferior a 80%. O gene *lap* apresentou o percentual mais baixo de identidade, com 70%, seguido pelo gene *gndA*, com identidade de 72,5%. Os genes *tufA* e *hasC* mostraram identidades de 77,2% e 78,2%, respectivamente.

O gene *clpP* foi identificado com identidade de 81,6% em todas as amostras, seguido pelo gene *ace* com 88,4%.

Entre os genes com identidade superior a 90%, o gene *asaI* apresentou identidade de 95,5%, exceto em S77_2 que apresentou ausência desse gene. O gene EF3023 apresentou identidade de 96,3%, seguidos pelo genes *fsrB* com 98,3%, *sprE* com 98,6%, *ebpC* com 98,7%

e *ebpB* com 98,9%. Acima de 99% de identidade, estão os genes *ebpA* com 99,1%, EF0818 e *gelE* com 99,2% cada, *fsrC* com 99,3%, *srtC*, *fsrA*, *cpsB/cdsA* e *cpdsA/uppS* com 99,6% cada e, por fim, o gene *bopD* com 99,7% de identidade. O único gene que apresentou 100% de identidade foi o *efaA*.

Não foram observadas variações nos percentuais de identidade entre as três amostras, exceto para o gene *asa1*, ausente em S77_2. A Figura 12 apresenta o *heatmap* com os percentuais de identidade dos genes de virulência detectados em cada uma das três cepas analisadas neste trabalho.

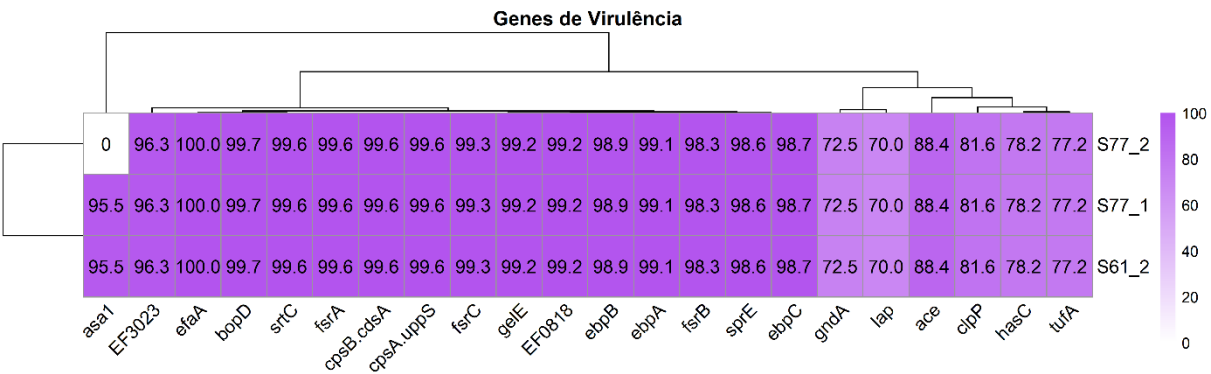


Figura 12. *Heatmap* da identidade dos genes de virulência detectados nas três cepas de *Enterococcus faecalis* analisadas. Os valores correspondem à porcentagem de identidade dos genes identificados com base nas análises de similaridade.
Fonte: Elaborado pela autora a partir de dados obtidos no PanViTa, utilizando o software RStudio v. 4.3.1
Fonte: Elaborado pela autora a partir de dados obtidos no PanViTa, utilizando o software R v. 4.3.1 (2025).

Os resultados apresentados fornecem uma visão abrangente das características genômicas das amostras analisadas e fundamentam a discussão que será realizada a seguir. Na próxima seção, os achados serão comparados com a literatura especializada para aprofundar seu significado biológico e epidemiológico.

7 DISCUSSÃO

Nesta seção, os resultados obtidos para os genomas de *Enterococcus faecalis* serão interpretados e confrontados com dados previamente publicados. Serão discutidos os mecanismos de resistência antimicrobiana e fatores de virulência identificados, bem como a diversidade genética observada entre as amostras. A compreensão dessas características genômicas é fundamental para ampliar o conhecimento sobre a adaptação e o potencial patogênico da espécie, com implicações para o controle de infecções e a resistência a antimicrobianos.

7.1 Avaliação da qualidade dos dados e da montagem genômica

Inicialmente, este trabalho contou com cinco genomas montados a partir do sequenciamento de diferentes isolados. No entanto, as métricas obtidas pelo software QUAST indicaram que três desses genomas apresentavam valores idênticos em todos os parâmetros avaliados — como número total de contigs, N50, L50, tamanho do maior contig, total de bases e conteúdo GC —, o que sugeriu fortemente que se tratavam de clones. Considerando a redundância dessas amostras, optou-se por excluir duas, a fim de manter apenas uma representante, resultando em três genomas distintos entre si em diferentes métricas para as etapas posteriores do estudo, sendo eles S61_2, S77_1 e S77_2.

A qualidade das montagens foi avaliada com base nas métricas fornecidas pelo CheckM2 e pelo QUAST. Todas as amostras apresentaram 100% de completude e 2% de viés, conforme relatado pelo CheckM2, utilizando modelos neurais específicos para previsão de completude e contaminação. Esses valores indicam montagens altamente completas e com baixíssimo nível de contaminação, conforme critérios de alta qualidade propostos por BOWERS *et al.* (2017) e CHKLOVSKI *et al.* (2022), que consideram valores de completude superiores a 90% e contaminação inferior a 5% como indicativos de genomas bem montados. Os valores de N50 obtidos foram de 260.248 pb, enquanto os valores de L50 foram de cinco, demonstrando que 50% do genoma está contido em apenas cinco contigs de tamanho igual ou superior a 260 kb. Além disso, o maior contig atingiu 389.774 pb. De acordo com GUREVICH *et al.* (2013), valores elevados de N50 e baixos valores de L50 indicam montagens menos fragmentadas e, portanto, de maior qualidade. Essas métricas, somadas à densidade gênica média de 88,3% e ao conteúdo GC de 38%, compatível com *Enterococcus faecalis*, indicam

que as montagens são consideradas de alta qualidade e adequadas para análises genômicas posteriores.

7.2 Diversidade genética e evolução de *Enterococcus faecalis*

A Identidade Média de Nucleotídeos (ANI) é uma métrica amplamente utilizada para avaliar a similaridade global entre pares de genomas, sendo considerada um critério robusto para a delimitação de espécies bacterianas. Segundo GORIS *et al.* (2007), valores de ANI acima de 95–96% sugerem que os genomas comparados pertencem à mesma espécie. O cálculo do ANI baseia-se na comparação de fragmentos genômicos da amostra de consulta com regiões homólogas do genoma de referência, resultando em uma média de identidade entre esses fragmentos (YOON *et al.*, 2017).

Na presente análise, os valores de ANI obtidos entre os genomas estudados demonstraram alta similaridade, com percentuais superiores ao limiar de espécie estabelecido, o que confirma que todas as amostras analisadas pertencem à espécie *Enterococcus faecalis*. Essa informação é visualmente reforçada pela coloração do *heatmap* (ver Figura 2), no qual a intensidade das cores reflete a alta identidade nucleotídica entre os genomas. Esses resultados corroboram a análise taxonômica realizada e reforçam a acurácia da montagem e da anotação genômica empregadas no estudo.

7.3 Análises filogenômicas

A Figura 3 (ver seção “Resultados”) representa a árvore filogenômica formada pelos 267 genomas de *E. faecalis* e um genoma de *E. coli* que foi utilizado como *outgroup*, totalizando 268 genomas (n=268). Os genomas analisados neste trabalho pertencem a um clado mais recente na linha evolutiva da espécie, sugerindo que os organismos se originaram de um ancestral comum recente (McLENNAN, 2010).

As três amostras deste estudo foram isoladas, em 2021, de animais silvestres de vida livre e sem presença de sinais clínicos. A amostra S61_2 foi isolada de *swab* otológico de um roedor macho da espécie *Galea spixii* (vulgo preá) e as amostras S77_1 e S77_2 foram isoladas de *swabs* retais de um marsupial fêmea da espécie *Didelphis albiventris* (vulgo cassaco ou gambá-de-orelha-branca).

Os três genomas analisados neste estudo (S61_2, S77_1 e S77_2) compartilham ancestrais comuns com outros quatro genomas: K72-1, K188-1, K191-1 e SVJ-EF01. Os sete

genomas foram agrupados em clados muito próximos. Os ramos estão coloridos de acordo com a origem das amostras. Os valores de *bootstrap* variam entre 42 e 100, indicando diferentes níveis de suporte estatístico para os agrupamentos filogenéticos observados, conforme ilustrado na Figura 13. Os valores de *bootstrap* indicam o suporte estatístico dos agrupamentos filogenéticos e, quanto mais próximo de 100, maior a confiabilidade nas relações inferidas (FELSENSTEIN, 1985).

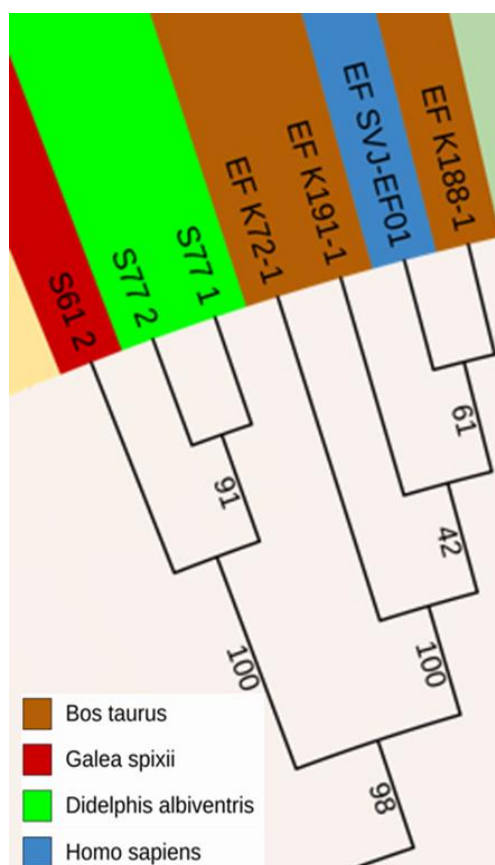


Figura 13. Recorte da árvore filogenômica baseada na análise de similaridade genômica entre sete amostras de *Enterococcus faecalis*, destacando aquelas relacionadas às amostras S61_2, S77_1 e S77_2.

Fonte: Elaborado pela autora a partir de árvore gerada no software OrthoFinder v. 2.5.5 e editada no iTOL v. 6 (2025).

As amostras K72-1 (SAMN23424515), K188-1 (SAMN23424514) e K191-1 (SAMN23424513) pertencem ao *BioProject* PRJNA783265, são de origem fecal (ceco) e foram coletadas, em 2021, de bovinos da espécie *Bos taurus*. Segundo o estudo correspondente, esses isolados foram obtidos de animais saudáveis em um grande abatedouro localizado na Suíça (NÜESCH-INDERBINEN, 2023). Em contraste, a amostra SVJ-EF01 (SAMN31723118), pertencente ao *BioProject* PRJNA901658, foi isolada, em 2022, na Índia, a partir da urina de uma paciente do sexo feminino imunocomprometida, diagnosticada com glomerulonefrite crescêntica pauci-imune (PICGN). Diferentemente dos isolados de origem animal obtidos de

indivíduos sem presença de sinais clínicos, este último representa um caso clínico de infecção humana.

As amostras S77_1 e S77_2 compartilham um ancestral comum, que possivelmente surgiu no mesmo evento de diferenciação que originou a linhagem S61_2. Essa hipótese é sustentada pelo fato de as três linhagens terem sido isoladas de animais silvestres que, presumivelmente, compartilham a mesma região geográfica. De maneira notável, as amostras SVJ-EF01 (de origem humana) e K188-1 (de origem bovina) também compartilham um ancestral imediato comum, o qual, por sua vez, está relacionado ao ancestral da linhagem K191-1. A proximidade filogenética entre SVJ-EF01 e K188-1, isoladas respectivamente de uma humana imunossuprimida na Índia e de um bovino saudável na Suíça, sugere a conservação de genes essenciais para a colonização e sobrevivência em diferentes hospedeiros, refletindo a elevada capacidade de *E. faecalis* de se adaptar a distintos nichos ecológicos e pressões ambientais (HAMMERUM, 2012).

Corroborando esses achados, estudos prévios indicam que linhagens de *E. faecalis* podem apresentar elevada similaridade genômica independentemente da origem geográfica ou do hospedeiro, evidenciando a disseminação de clones com capacidade de colonizar tanto humanos quanto animais (MUBARAK *et al.*, 2024). As amostras discutidas nesta análise provêm de diferentes continentes e refletem distintas condições de sobrevivência. Esses dados reforçam a relevância do estudo para a Saúde Pública, ao demonstrar que linhagens com ancestrais comuns recentes podem persistir sob variadas pressões ambientais e, conforme descrito na literatura, são capazes de causar enfermidades em humanos — especialmente imunocomprometidos — e em diferentes espécies animais (AWADH *et al.*, 2021; NATES *et al.*, 2024).

A composição da árvore filogenômica, de maneira geral, evidencia a diversidade ecológica dos genomas de *Enterococcus faecalis* utilizados na análise. Observa-se uma predominância de isolados de origem humana (48,5%), o que reflete a ampla disponibilidade de sequenciamentos clínicos e o papel recorrente da espécie como patógeno oportunista em ambientes hospitalares (LEBRETON *et al.*, 2013; ARIAS; MURRAY, 2012).

Em paralelo, há uma representação expressiva de cepas provenientes de animais de produção, especialmente suínos (16,4%) e bovinos (4,5%), o que reforça a relevância de *E. faecalis* no contexto agropecuário e o potencial de transferência de genes de resistência entre animais e humanos, algo preocupante para a Saúde Pública (HAMMERUM, 2012; KRISTICH *et al.*, 2014).

Além disso, uma parcela significativa dos isolados classificados como "A/A" (14,5%) corresponde a amostras oriundas de ambientes ou alimentos, ressaltando que *E. faecalis* pode atuar como um indicador da contaminação de cadeias alimentares e do meio ambiente, conforme discutido em estudos anteriores (FISHER; PHILLIPS, 2009; FREITAS *et al.*, 2011).

A presença de genomas provenientes de uma ampla variedade de hospedeiros — incluindo aves, roedores, marsupiais, peixes e até insetos — corrobora a alta capacidade de adaptação e colonização em diferentes nichos ecológicos (GILMORE *et al.*, 2013).

Por fim, a presença de genomas sem dados específicos de origem ("Desconhecido", 8,6%) limita inferências mais precisas e evidencia a necessidade de metadados bem documentados nos bancos genômicos públicos, fator essencial para garantir a robustez das análises filogenômicas e epidemiológicas (TEN HOOPEN *et al.*, 2017).

7.4 Discussão sobre o panresistoma

7.4.1 Mecanismos de resistência identificados

A análise do panresistoma dos 267 genomas de *Enterococcus faecalis* revelou seis mecanismos distintos de resistência, sendo a inativação enzimática o mais representativo (11 genes acessórios e cinco exclusivos), o que indica a importância de enzimas que modificam ou degradam o antibiótico, como β -lactamases e transferases, na resistência adquirida por essa espécie (WRIGHT, 2005). Em seguida, destaca-se a alteração do alvo do antibiótico (sete genes acessórios e um exclusivo), frequentemente associada a mutações em proteínas essenciais, como PBPs e subunidades ribossômicas, que reduzem a afinidade do fármaco e impedem sua ação (DAVIES; DAVIES, 2010). O mecanismo de efluxo também se mostrou relevante (dois genes centrais, cinco acessórios e dois exclusivos), apontando para a participação de transportadores ativos, como sistemas MFS (*Major Facilitator Superfamily*) e ABC (*ATP-Binding Cassette*), capazes de expelir diferentes classes de antimicrobianos e contribuir para um perfil de resistência ampliado (POOLE, 2005). Além disso, observaram-se mecanismos de substituição de alvo (um gene central, três acessórios e um exclusivo), nos quais proteínas alternativas assumem o papel daquelas inativadas pela ação antimicrobiana, e de proteção de alvo (um central, seis acessórios e dois exclusivos), que envolvem moléculas capazes de proteger as estruturas celulares alvo sem alterá-las diretamente (BLAIR *et al.*, 2015). Por fim, a presença conservada de um único gene central relacionado à redução da permeabilidade em todas as 267 amostras indica sua importância basal para a fisiologia de *E. faecalis*. Entretanto, considerando a diversidade e quantidade de outros genes associados a mecanismos mais específicos e ativos de resistência, como bombas de efluxo e modificações enzimáticas, esse mecanismo parece desempenhar um papel secundário na resistência antimicrobiana da espécie. Esses achados reforçam a plasticidade genômica de *E. faecalis* e sua capacidade adaptativa frente a diferentes pressões seletivas (HUYCKE *et al.*, 1998; ARIAS; MURRAY, 2012; HOLLENBACK; RICE, 2012).

Ao comparar os 267 genomas analisados com os três genomas específicos deste estudo (S61_2, S77_1 e S77_2), observa-se uma redução significativa na diversidade dos mecanismos de resistência. Nos genomas específicos, apenas quatro mecanismos foram identificados, todos pertencentes ao componente central (*core*): efluxo de antibióticos, redução da permeabilidade à membrana, substituição do alvo e proteção do alvo. Nenhum gene acessório ou exclusivo foi detectado nestes mecanismos, o que contrasta com o panorama observado no conjunto mais

amplo, em que predominam genes acessórios e exclusivos relacionados a mecanismos como inativação de antibióticos e alteração do alvo. Essa diferença pode refletir o contexto ecológico distinto desses isolados, que foram obtidos de animais silvestres de vida livre, com provável menor exposição prévia a antimicrobianos seletivos em comparação a cepas de origem clínica ou de produção animal (LEBRETON *et al.*, 2013; HOLLENBECK; RICE, 2012). Além disso, a predominância de genes central relacionados a resistência nesses genomas específicos sugere um perfil de resistência mais próximo ao basal, intrínseco à espécie, reforçando a hipótese de que a aquisição de genes acessórios e exclusivos, por meio de mobilomas, desempenha um papel determinante na adaptação de *E. faecalis* a ambientes com maior pressão antimicrobiana (PALMER *et al.*, 2010; GUZMAN PRIETO *et al.*, 2016; KRISTICH *et al.*, 2014).

7.4.2 Classes de antimicrobianos associadas

A análise das classes de antimicrobianos no panresistoma de 267 genomas de *Enterococcus faecalis* evidenciou perfis distintos de resistência, refletindo pressões seletivas variáveis. Foram identificadas 19 classes antimicrobianas, com destaque para lincosamidas, macrolídeos, estreptograminas, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina e glicopeptídeos. Notavelmente, aminoglicosídeos, tetraciclina e glicopeptídeos estavam presentes exclusivamente em genes acessórios ou exclusivos, sugerindo aquisição horizontal recente e disseminação limitada na população analisada (ROBERTS, 2008; RAMÍREZ; TOLMASKY, 2010). Entre os genes acessórios, destacaram-se os relacionados à resistência a lincosamidas ($n = 9$), fenicóis ($n = 8$) e aminoglicosídeos ($n = 5$), associados, respectivamente, às metilases de rRNA (*erm*), acetiltransferases de cloranfenicol (*cat*) e enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (ROBERTS, 2008; RAMÍREZ; TOLMASKY, 2010). A resistência a macrolídeos ($n = 2$ acessórios, 1 exclusivo) e estreptograminas (grupo A: $n = 4$ acessórios; grupo B: $n = 3$ acessórios) também foi relevante, vinculada a mecanismos de metilação ribossomal e hidrólise de anéis lactona (ROBERTS, 2008). Para tetraciclina ($n = 5$ acessórios, 2 exclusivos), observaram-se mecanismos de bombeamento e proteção ribossomal (CHOPRA; ROBERTS, 2001). Já a resistência a fluoroquinolonas ($n = 1$ acessório) tem sido associada, conforme estudos anteriores, a mutações nos genes *gyrA* e *parC*, que reduzem a afinidade pelos alvos enzimáticos das drogas (HOOPER, 2000).

Adicionalmente, detectou-se resistência a desinfetantes e antissépticos ($n = 1$ acessório), mediada por transportadores *qac*, e a classes menos prevalentes — cefalosporinas, rifamicinas, diaminopirimidinas e oxazolidinonas — em níveis baixos, possivelmente refletindo uso

terapêutico mais restrito ou pressões ecológicas específicas (ROBERTS, 2008; CHOPRA; ROBERTS, 2001). A identificação de um único gene central para algumas classes (lincosamidas, macrolídeos, estreptograminas, tetraciclina e rifamicinas) sugere um resistoma basal conservado, enquanto a diversidade de genes acessórios e exclusivos evidencia o papel da mobilidade genética na evolução da resistência em *E. faecalis*.

Por outro lado, os três genomas deste trabalho (S61_2, S77_1 e S77_2) apresentaram um perfil mais restrito, com genes de resistência concentrados em 11 classes de antimicrobianos, todos classificados como genes centrais, indicando conservação entre essas amostras. A ausência de genes acessórios ou exclusivos nesses genomas pode refletir uma menor exposição a pressões seletivas variadas, maior estabilidade genômica ou um perfil de resistência mais consolidado (CHOPRA; ROBERTS, 2001). Essa diferença ressalta a plasticidade genômica de *E. faecalis* e a capacidade de determinados clones acumularem determinantes de resistência por eventos recentes de transferência horizontal, enquanto outros mantêm perfis mais conservados e potencialmente mais antigos (HOOPER, 2000).

7.4.3 Genes de resistência detectados

7.4.3.1 Correlação entre genes de resistência e o perfil fenotípico (antibiograma)

A análise comparativa entre o perfil genotípico de resistência das três amostras analisadas neste trabalho e o perfil fenotípico (antibiograma - ver Tabela 2 na seção “Metodologia”) permitiu observar uma correlação significativa para diversos antibióticos testados. Dos cinco genes de resistência encontrados, quatro apresentaram potencial funcional confirmado (*dfrE*, *emeA*, *ireK* e *lsaA*). O gene *efrA*, pertencente a um sistema de efluxo do tipo ABC, foi detectado isoladamente, sem o gene complementar *efrB*. Como ambos são necessários para a formação de um transportador funcional, a presença isolada de *efrA* foi desconsiderada na análise funcional (LEE *et al.*, 2003; ROSA *et al.*, 2016).

O gene *dfrE*, codificador de uma variante da di-hidrofolato redutase relacionada à resistência à trimetoprima, componente da associação sulfametoxazol/trimetoprima (SUT), foi identificado em todas as amostras. No entanto, a resistência fenotípica ao SUT foi observada apenas em S77_2, sugerindo que o gene pode estar presente, porém inativo ou com expressão regulada negativamente, possivelmente devido a mecanismos de regulação transcricional ou ausência de elementos regulatórios compatíveis, conforme descrito por PAL *et al.* (2015).

A resistência a clindamicina (CLI) e eritromicina (ERI), lincosamidas e macrolídeos, respectivamente, foi compatível com a presença dos genes *lsaA* e *emeA*. O gene *lsaA* é conhecido por conferir resistência do tipo MLS-B (macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B), por meio de um mecanismo de proteção ribossomal (SINGH *et al.*, 2002), enquanto *emeA*, pertencente à superfamília MFS (*Major Facilitator Superfamily*), atua como bomba de efluxo de amplo espectro, contribuindo para a extrusão desses compostos (PAULSEN *et al.*, 2001). A coocorrência desses dois genes pode justificar o perfil fenotípico de resistência observado nas três amostras frente a clindamicina e ao perfil de resistência de S61_2 e S77_1 e o perfil intermediário de S77_2 frente a eritromicina.

O gene *ireK*, que codifica uma serina/treonina quinase envolvida na adaptação ao estresse da parede celular, foi identificado em todas as amostras analisadas. Essa proteína regula vias de sinalização associadas à integridade da parede celular e tem sido implicada na modulação da resistência a antibióticos β -lactâmicos, especialmente sob pressão seletiva (KRISTICH *et al.*, 2007; KRISTICH *et al.*, 2011). As amostras apresentaram resistência e perfis intermediários a múltiplos β -lactâmicos, incluindo cefalosporinas (CFZ, CFO, CRO), penicilinas com inibidor (AMC) e carbapenem (IPM), o que pode ser atribuído, ao menos em parte, à presença de *ireK*. Contudo, como esse gene atua de forma indireta, a resistência observada provavelmente resulta da interação com outros fatores complementares (KRISTICH *et al.*, 2007).

Para outros antibióticos como florfenicol (FLF), nitrofurantoína (NIT), tobramicina (TOB) e linezolida (LNZ), não foram identificados genes de resistência diretamente relacionados nas amostras. As resistências e os perfis intermediários observados para esses agentes podem estar relacionadas a mecanismos não investigados nesta análise, como mutações em genes cromossômicos, resistência intrínseca e formação de biofilme. A sensibilidade observada para alguns desses antibióticos pode refletir a ausência de genes de resistência conhecidos e anteriormente descritos em *E. faecalis*, como *optrA* e *aac(6')/aph(2'')*. No entanto, tais resultados devem ser interpretados com cautela, considerando a possibilidade de mecanismos alternativos não investigados nesta análise (MILLER *et al.*, 2014; DADASHI *et al.*, 2021).

Sendo originárias de animais silvestres, as amostras analisadas oferecem uma perspectiva importante sobre a dinâmica da resistência além dos ambientes clínicos. Estudos com diferentes espécies da fauna indicam que a detecção de genes de resistência em microrganismos provenientes desses animais muitas vezes reflete contaminação ambiental antropogênica, seja por contato indireto com resíduos humanos, oriundos de produções, ou

pontos de descarga de efluentes (ARNOLD *et al.*, 2016; LABORDA *et al.*, 2022; SWIFT *et al.*, 2019). Contudo, resistomas ambientais também podem incluir genes naturalmente presentes em ecossistemas, sem relação direta com o uso de antimicrobianos (SURETTE; WRIGHT, 2017).

Estudos recentes em mamíferos silvestres demonstraram prevalência moderada de resistência a antimicrobianos críticos, destacando a fauna como reservatório e sentinela da disseminação desses genes (LI *et al.*, 2024; SMOGLICA *et al.*, 2025; AKWONGO *et al.*, 2025). Dessa forma, a presença de genes como *lsaA*, *dfrE*, *emeA*, *ireK* e *efrA* (mesmo na ausência de *efrB*), deve ser contextualizada não apenas em termos de expressão funcional, mas também considerando o potencial de enriquecimento e transferência desses genes no resistoma ambiental. A fauna silvestre pode incorporar genes de resistência por meio da contaminação de solos e águas por antibióticos e bactérias de origem humana ou animal (PÄRNÄNEN *et al.*, 2016; LABORDA *et al.*, 2022).

Além disso, a presença isolada do gene *efrA*, sem o gene complementar *efrB*, pode representar um reservatório genético latente, potencialmente ativado por meio da mobilização de elementos genéticos móveis. Em *E. faecalis*, é bem documentado que plasmídeos, transposons e ilhas genômicas desempenham papel central na transferência horizontal de genes de resistência, permitindo sua aquisição ou perda em resposta à pressão seletiva (HEGSTAD *et al.*, 2010; PALMER *et al.*, 2010; PALMER *et al.*, 2014; MANSON *et al.*, 2010). Em contrapartida, a manutenção de genes sem pressão seletiva impõe um custo metabólico e, em função disso, as bactérias podem deletar genes não essenciais ao longo do tempo, por recombinação ou eventos de perda, para otimizar sua eficiência energética (DORADO-MORALES *et al.*, 2021).

Embora a presença desses genes não se traduza necessariamente em resistência fenotípica em todas as cepas, eles constituem um reservatório genético passível de mobilização para linhagens patogênicas. Tal cenário ressalta a importância da implementação de estratégias de vigilância baseadas em abordagens integradas, que considerem a interface entre ambientes naturais e antropizados, sob a ótica da Saúde Pública (PALMER *et al.*, 2010; HEGSTAD *et al.*, 2010; OMS, 2015).

De forma geral, os resultados evidenciam que, apesar da presença dos genes de resistência fornecer indícios relevantes acerca da capacidade adaptativa das cepas frente aos antimicrobianos, fatores adicionais — tais como regulação da expressão gênica, mutações em genes reguladores e a interação sinérgica entre mecanismos — devem ser considerados para uma interpretação fenotípica mais acurada (POOLE, 2005; DAVIES; DAVIES, 2010).

Tal dinâmica reforça a importância da vigilância contínua do resistoma, sobretudo em ambientes naturais, que atuam como reservatórios e fontes potenciais de genes de resistência para cepas patogênicas. O monitoramento desses ambientes é essencial para acompanhar a disseminação e a evolução desses genes, considerando a possibilidade de transferência horizontal e os impactos potenciais na saúde pública (BERENDONK *et al.*, 2015).

7.4.3.2 Relação entre genes e mecanismos de resistência nos três genomas

A análise dos genes de resistência nas três amostras de *Enterococcus faecalis* (S77_1, S77_2 e S61_2) revelou a presença consistente dos genes *dfrE*, *emeA*, *efrA*, *lsaA* e *IreK*, com alta similaridade (>93%) em todas as cepas. Esses genes estão diretamente associados a quatro mecanismos funcionais de resistência antimicrobiana classificados como centrais: substituição do alvo antimicrobiano, efluxo de antibióticos, redução da permeabilidade ao antimicrobiano e proteção do alvo.

O gene *dfrE* codifica uma di-hidrofolato redutase responsável pela substituição do alvo do antibiótico, conferindo resistência por meio da modificação da proteína alvo (COQUE *et al.*, 1999). Os genes *emeA* e *efrA* estão relacionados ao mecanismo de efluxo, promovendo a expulsão ativa dos antibióticos da célula e reduzindo sua concentração intracelular. (JONAS *et al.*, 2001; OLANREWAJU *et al.*, 2024). Entretanto, *efrA*, pertencente a um sistema de efluxo ABC, é um gene não funcional, pois depende da presença do gene complementar *efrB* para a formação de um transportador funcional (LEE *et al.*, 2003; ROSA *et al.*, 2016). O gene *ireK* codifica uma quinase do tipo Ser/Thr, associada à proteção do alvo antimicrobiano e à manutenção da integridade celular sob condições de estresse (IANNETTA *et al.*, 2021; HALL *et al.*, 2013). Já o gene *lsaA* está implicado na redução da permeabilidade da membrana bacteriana, limitando a entrada de compostos antimicrobianos (SINGH *et al.*, 2002; POOLE, 2005).

A ausência de genes ou mecanismos não correlacionados reforça a coerência entre a anotação genômica e a categorização funcional dos mecanismos de resistência. Essa consistência fortalece a confiabilidade dos dados obtidos e evidencia um perfil multifatorial de resistência, no qual diferentes estratégias são empregadas para garantir a sobrevivência bacteriana frente à pressão seletiva de antimicrobianos. Esses achados ressaltam a importância de abordagens integradas para o monitoramento e controle da resistência, especialmente em ambientes com alto potencial de disseminação de genes resistentes.

7.5 Discussão sobre o panviruloma

7.5.1 Mecanismos funcionais de virulência

A análise dos mecanismos de virulência em 267 genomas de *Enterococcus faecalis* revelou seis estratégias principais que combinam fatores centrais e elementos acessórios, indicando o papel da transferência gênica horizontal na modularidade virulenta da espécie. O mecanismo de adesão apresentou seis genes centrais e oito acessórios, incluindo proteínas de superfície — como as pili Ebp codificadas pelo operon *ebpABC* — essenciais para a colonização de tecidos e formação de biofilme, fatores-chave em infecções endocárdicas, por exemplo (NALLAPAREDDY *et al.*, 2006).

A modulação da resposta imune envolveu quatro genes centrais e dez acessórios, com destaque para o operon *fsr*, um sistema de *quorum sensing* que regula a expressão de exoenzimas como gelatinase e serina-protease. Essas moléculas, além de contribuírem para a evasão do sistema imune, estão associadas à degradação tecidual e à intensificação da infecção, evidenciando seu papel multifuncional na virulência de *E. faecalis* (FISHER; PHILLIPS, 2009; ALI *et al.*, 2017).

O mecanismo de formação de biofilme, com um gene central e três acessórios, reforça a persistência bacteriana em nichos adversos e proteção contra antimicrobianos e ações imunes (NALLAPAREDDY *et al.*, 2006; ALI *et al.*, 2017).

A produção de exotoxinas, representada por nove genes acessórios, destaca-se principalmente pela presença da citolisina, uma hemolisina altamente associada à virulência aguda em *E. faecalis* (OLANREWAJU *et al.*, 2024). Além disso, essas exotoxinas auxiliam na colonização, invasão e disseminação da bactéria em tecidos, agravando o quadro infeccioso. A diversidade dos genes de exotoxinas sugere um repertório variável entre as linhagens, conferindo a *E. faecalis* a capacidade de modular a expressão desses fatores conforme as diferentes pressões ambientais e estados do hospedeiro, o que pode influenciar a gravidade e a cronicidade das infecções (FISHER; PHILLIPS, 2009; PALMER *et al.*, 2012).

Por fim, o mecanismo de sobrevivência ao estresse, com um gene central e um acessório, está relacionado a proteínas como superóxido-dismutase, que promovem resistência a condições hostis (ALI *et al.*, 2017).

Os genomas S61_2, S77_1 e S77_2 analisados no presente trabalho confirmam esse perfil multifatorial. A presença dos genes do operon *ebpABC* foi verificada nas três amostras, reforçando a importância das pili Ebp para adesão e biofilme. Os sistemas de *quorum sensing*

fsr também foram detectados, regulando as exoenzimas gelatinase (*gelE*) e serina-protease (*sprE*), presentes em todas as amostras e essenciais para a evasão imune. Genes central e acessórios relacionados à formação de biofilme, como *ace* e outros, foram identificados, indicando a capacidade dessas cepas de persistir em ambientes adversos (NALLAPAREDDY *et al.*, 2006; ALI *et al.*, 2017; FISHER; PHILLIPS, 2009).

O operon *cyl*, responsável pela produção da exotoxina citolisina, não foi identificado nas três amostras analisadas, indicando a ausência desse fator clássico de virulência nessas cepas. Dessa forma, o único gene relacionado à produção de exotoxinas detectado foi, provavelmente, a *gelE*, que codifica uma exoenzima multifuncional com atividade proteolítica, capaz de degradar peptídeos do hospedeiro e contribuir para efeitos citotóxicos indiretos (WATERS *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2007).

Esses achados evidenciam que a virulência em *E. faecalis* resulta da combinação de fatores centrais conservados e elementos acessórios adquiridos por transferência horizontal, ampliando o potencial patogênico das cepas analisadas.

7.5.2 Genes de virulência identificados nas três amostras

A análise dos genes de virulência nas três amostras de *Enterococcus faecalis* revelou a presença de um conjunto conservado de determinantes associados à adesão, evasão imune, formação de biofilme e atividade enzimática. Genes clássicos de adesão como *efaA*, *ace*, *asaI*, *lap*, *srtC* e *ebpABC* apresentaram elevada identidade (>95%) em pelo menos duas amostras, sugerindo forte potencial de adesão a matrizes extracelulares e células epiteliais hospedeiras, mecanismos críticos na colonização e persistência em tecidos (TOLEDO-ARANA *et al.*, 2001; SINGH *et al.* 2010).

A presença do gene *ace* tem sido fortemente associada à capacidade de adesão a colágeno, fator crucial para a colonização e estabelecimento de infecções do trato urinário e endocardite. Estudos demonstram que a expressão do *ace* contribui significativamente para a virulência dessas infecções, facilitando a aderência bacteriana às matrizes extracelulares do hospedeiro (SINGH *et al.*, 2010; NALLAPAREDDY *et al.*, 2011).

O sistema *fsrABC*, um regulador *quorum-sensing* crucial na regulação de genes como *gelE* (gelatinase) e *sprE* (serina protease), foi identificado em todas as amostras. Esses genes estão relacionados à degradação de proteínas hospedeiras, formação de biofilme e evasão da resposta imune inata. A co-presença dos três genes do operon e seus genes-alvo indica um

sistema regulatório funcional, o que pode refletir maior virulência em ambientes clínicos e extra-hospedeiros (BOURGOGNE *et al.*, 2006).

O gene *asa1*, que codifica uma proteína agregante envolvida na conjugação e na formação de agregados celulares, foi ausente apenas em uma amostra (S77_2), sugerindo uma potencial variação clonal dentro do mesmo hospedeiro. Este gene tem sido associado à disseminação de elementos genéticos móveis e aumento da virulência (BONTEN *et al.*, 2001).

Além disso, a presença de *cpsA/uppS* e *cpsB/cdsA*, envolvidos na biossíntese de cápsula polissacarídica, sugere mecanismos de evasão à fagocitose e maior sobrevivência em ambientes adversos. A cápsula é uma estrutura importante para a virulência, especialmente em cepas envolvidas em infecções hospitalares (THURLOW *et al.*, 2009).

O gene *tufA* codifica o fator de alongação Tu (EF-Tu), uma GTPase (Guanosina trifosfato) central no processo de tradução proteica que transporta o aminoacil-tRNA até o sítio A do ribossomo. Em *E. faecalis*, apenas a cópia *tufA* está presente — diferentemente de outras espécies de enterococos que podem portar tanto *tufA* quanto *tufB* — demonstrando alta conservação e essencialidade funcional. Esse gene é altamente conservado entre bactérias Gram-positivas, exibindo variabilidade de apenas 1–13% entre as espécies, o que o torna um excelente marcador filogenético para identificação e estudos evolutivos (KE *et al.*, 2000).

O gene *hasC* foi identificado nas três amostras de *Enterococcus faecalis*. Embora *hasC* seja classicamente associado a biossíntese de ácido hialurônico em bactérias como *Streptococcus* spp. (ALBERTÍ *et al.* 1998; WEIGEL; DEANGELIS, 2007), sua função em *E. faecalis* ainda é pouco elucidada devido à escassez de relatos na literatura. A presença desse gene com similaridade moderada sugere uma possível função conservada, mas que necessita de confirmação funcional (TATUSOVA *et al.*, 2016). Assim, estudos futuros que investiguem sua expressão e papel em *E. faecalis* são fundamentais para esclarecer sua importância na virulência e na interação com o hospedeiro.

O gene *gndA* codifica a enzima 6-fosfogluconato desidrogenase, que catalisa a oxidação do 6-fosfogluconato a ribulose-5-fosfato, gerando NADPH por meio da via das pentoses fosfato. Em *E. faecalis*, essa função é especialmente importante pois contribui tanto para o metabolismo oxidativo da glicose quanto para o equilíbrio redox celular, promovendo capacidade de resposta ao estresse oxidativo (HOLT *et al.*, 2015; RAN *et al.*, 2015).

Os genes *bopD*, EF3023 e EF0818, descritos na cepa de referência *Enterococcus faecalis* V583, codificam proteínas conservadas cuja função ainda permanece pouco elucidada. Apesar da alta conservação desses genes indicar um padrão genômico estável e potencial relevância biológica, sua contribuição funcional específica — seja na virulência, resistência

antimicrobiana ou metabolismo — ainda não foi definida claramente. Dessa forma, a presença desses genes, embora sinalize um marcador conservado, não permite inferências conclusivas acerca do seu papel funcional no contexto patogênico ou fisiológico do microrganismo (PAULSEN *et al.*, 2003; LEBRETON *et al.*, 2017).

Portanto, a composição gênica das amostras analisadas demonstra um repertório típico de virulência em *E. faecalis*, com genes altamente conservados entre cepas, sugerindo uma predisposição dessas linhagens à patogenicidade em ambientes diversos, inclusive fora do ambiente hospitalar. Esse perfil é coerente com estudos prévios que destacam o papel multifatorial da virulência em *E. faecalis*, muitas vezes associado à persistência e à resistência antimicrobiana (KRISTICH *et al.*, 2014).

Apesar da presença de um repertório conservado de genes associados à virulência nas três amostras analisadas — incluindo determinantes de adesão, evasão imune e formação de biofilme —, os animais silvestres dos quais os isolados foram obtidos não apresentavam quaisquer sinais clínicos. Esse achado reforça o caráter comensal e oportunista da espécie, cuja capacidade patogênica depende de múltiplos fatores além do genótipo, como a suscetibilidade do hospedeiro, a regulação da expressão gênica e o contexto ecológico em que o microrganismo se encontra (ARIAS; MURRAY, 2012; VAN TYNE; GILMORE, 2014; GUZMAN PRIETO *et al.*, 2016).

Assim, embora os genes identificados indiquem uma predisposição genética à patogenicidade, sua presença isolada não implica obrigatoriamente em infecção ativa, o que é coerente com o modelo de virulência multifatorial descrito por KRISTICH *et al.* (2014), VAN TYNE; GILMORE (2014) e GUZMAN PRIETO *et al.* (2016).

Dessa forma, os dados obtidos sugerem que os animais estudados podem atuar como portadores assintomáticos de cepas potencialmente patogênicas, contribuindo, ainda que de forma silenciosa, para a manutenção e circulação de linhagens com capacidade de causar infecção sob condições favorecedoras, principalmente em cenários de desequilíbrio ambiental ou imunológico (LEBRETON *et al.*, 2013; PÄRNÄNEN *et al.*, 2016; ARNOLD *et al.*, 2016).

7.5.2.1 Correlação entre genes de virulência e os mecanismos funcionais nos três genomas

A categorização funcional dos genes de virulência encontrados nas três amostras de *Enterococcus faecalis* revelou uma predominância de genes pertencentes ao genoma central, com ausência de genes classificados como exclusivos e apenas um gene classificado como acessório associado ao mecanismo de adesão. Essa distribuição indica que os principais

determinantes de virulência presentes nas amostras representam componentes conservados da espécie, consistentes com a literatura que descreve *E. faecalis* como portador de um repertório básico de genes de virulência, mesmo em cepas não clínicas (KRISTICH *et al.*, 2014).

O mecanismo de aderência foi o mais representado, com oito genes, sendo sete classificados como central e um como acessório. Genes como *efaA*, *ace*, *ebpABC*, *srtC*, *lap* e *asal* são responsáveis pela adesão a componentes da matriz extracelular, como colágeno e fibrinogênio. Eles também desempenham papel essencial na formação do biofilme e na colonização de superfícies abióticas, fatores que favorecem a sobrevivência e persistência de *E. faecalis* (TOLEDO-ARANA *et al.*, 2001; HEIDARI *et al.*, 2017). A presença consistente desses genes entre as amostras sugere um elevado potencial de colonização, o que pode favorecer tanto a persistência ambiental quanto a infecção oportunista.

O segundo grupo mais representado foi o de genes relacionados à formação de biofilme, com quatro genes classificados como central, incluindo *gelE*, *sprE*, *ebpABC* e *fsrABC*. A co-ocorrência do sistema regulador *quorum-sensing fsrABC* e de seus genes regulados (*gelE* e *sprE*) reforça o potencial de formação de biofilme maduro e produção de enzimas extracelulares que facilitam a dispersão e a evasão da resposta imune (BOURGOGNE *et al.*, 2006).

Os mecanismos de modulação imune e de atividade exoenzimática também foram representados por quatro genes cada, todos classificados como central. Entre eles, destacam-se *gelE*, que também atua na degradação de peptídeos imunomoduladores, e *sprE*, envolvido na digestão de proteínas estruturais do hospedeiro. Essas enzimas têm sido associadas à facilitação da invasão tecidual e ao escape da resposta imune inata (TENDOLKAR *et al.*, 2003).

O único gene associado ao mecanismo de sobrevivência ao estresse foi *clpP*, também classificado como central. Este gene codifica uma protease que atua na regulação do estresse proteotóxico e está envolvido na adaptação a ambientes hostis, como pH ácido e presença de agentes antimicrobianos (ZHENG *et al.*, 2020).

O mecanismo de produção de exotoxinas foi representado por apenas um gene central; contudo, considerando a ausência dos genes clássicos *cylL*, *cylM* e *cylB* nas amostras analisadas, esse gene provavelmente corresponde a uma exoenzima multifuncional, como a *gelE*, que atua na degradação de peptídeos do hospedeiro e contribui para efeitos citotóxicos indiretos, em vez de representar uma exotoxina clássica (WATERS *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2007). Assim, o papel da *gelE* é melhor descrito como uma enzima de virulência com múltiplas funções, incluindo atividades proteolíticas que facilitam a invasão e evasão imune, embora não haja evidências claras na literatura que a classifiquem como exotoxina clássica (WATERS *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2007; FISHER; PHILLIPS, 2009).

Em conjunto, os dados sugerem que as cepas analisadas possuem um arsenal básico, porém funcionalmente robusto, de genes de virulência. A predominância de genes centrais entre os mecanismos analisados corrobora a ideia de que *E. faecalis*, mesmo fora de ambientes hospitalares, carrega um repertório estável de fatores que contribuem para a patogênese (LEBRETON *et al.*, 2013). A identificação de apenas um gene acessório (possivelmente *asa1*, ausente em uma das amostras) indica baixa diversidade genômica relacionada à virulência entre essas cepas. Conforme descrito por WILLEMS e VAN SCHAIK (2005) e HE *et al.* (2018), essa característica pode ter implicações importantes para a vigilância epidemiológica em ambientes naturais e na interface com populações humanas e animais.

7.5.2.2 Variações no perfil de genes de virulência entre as três amostras

A análise comparativa dos genes de virulência entre as três amostras de *Enterococcus faecalis* revelou um perfil altamente conservado. As amostras S61_2, S77_1 e S77_2 apresentaram valores idênticos de identidade para todos os 22 genes avaliados, com exceção do gene *asa1*, ausente em S77_2. Este gene, que codifica uma proteína de agregação celular associada à formação de biofilmes e à facilitação de conjugação plasmidial (EATON; GASSON, 2001; MOHAMED; HUANG, 2007), pode contribuir tanto para a disseminação de fatores de resistência quanto para a persistência em ambientes complexos. Sua ausência em S77_2 pode estar relacionada a eventos de perda gênica ou à presença de elementos móveis distintos entre os isolados, sugerindo variação intraclonal mesmo entre amostras de origem semelhante (PALMER *et al.*, 2012; VAN SCHAIK, 2015).

A amostra S61_2, por sua vez, compartilha o mesmo repertório gênico de S77_1, incluindo a presença do gene *asa1*, o que reforça a hipótese de que S77_2 representa uma variante com perda desse gene. Essa constatação é relevante epidemiologicamente, pois a presença do *asa1* está frequentemente associada a cepas envolvidas em infecções nosocomiais e a uma maior capacidade de formação de biofilmes, facilitando a persistência bacteriana em ambientes hospitalares (EATON; GASSON, 2001; MOHAMED; HUANG, 2007; CRETI *et al.*, 2004).

Portanto, mesmo diante de um perfil majoritariamente conservado entre os isolados, a ausência de *asa1* em S77_2 representa uma variação genômica pontual, mas potencialmente significativa. Tal diferença pode refletir a plasticidade genômica característica de *Enterococcus faecalis*, que inclui recombinação frequente, mobilidade genética e perdas ou aquisições de genes conforme o ambiente (PALMER *et al.*, 2012). De acordo com EATON e GASSON (2001)

e CRETI *et al.* (2004), esses elementos impactam diretamente em fatores como adesão, formação de biofilmes e transferência horizontal de genes — aspectos cruciais no contexto ecológico e epidemiológico das cepas analisadas.

De forma integrada, os dados obtidos neste estudo destacam a conservação dos fatores de virulência entre os isolados de *Enterococcus faecalis*, ao mesmo tempo em que revelam uma diferença específica que pode refletir adaptações microevolutivas relevantes. A análise conjunta dessas informações reforça a complexidade da biologia da espécie e a necessidade de abordagens combinadas para melhor caracterizá-la em diferentes contextos.

8 CONCLUSÃO

O presente trabalho permitiu uma caracterização genômica detalhada de três isolados de *Enterococcus faecalis* (S61_2, S77_1 e S77_2), a partir de múltiplas abordagens integradas de bioinformática. A anotação genômica viabilizou a identificação de elementos relacionados à sobrevivência, adaptação e potencial patogênico da bactéria, estabelecendo a base para análises funcionais mais aprofundadas.

As análises de similaridade genômica evidenciaram uma alta identidade entre os isolados, sugerindo uma relação filogenética estreita e uma possível origem comum ou dispersão local. A árvore filogenômica reforçou esse achado ao posicionar as cepas em um mesmo agrupamento. Comparações com genomas internacionais ampliaram o entendimento sobre a diversidade da espécie, revelando tanto características compartilhadas quanto variações regionais que refletem sua adaptabilidade a diferentes nichos ecológicos.

A investigação de fatores associados à resistência e à virulência demonstrou que os isolados possuem um repertório genético compatível com perfis potencialmente preocupantes em contextos clínicos e ambientais. Embora nem todos os determinantes identificados impliquem em expressão fenotípica direta, eles compõem um reservatório genético relevante sob a perspectiva da vigilância em saúde pública.

Dessa forma, os dados aqui apresentados contribuem para a compreensão da base genética de variabilidade e adaptação de *E. faecalis*, reforçando a importância da genômica como ferramenta para o monitoramento de microrganismos com potencial risco epidemiológico. Os resultados obtidos podem subsidiar estratégias de vigilância mais eficazes, integradas e direcionadas à contenção da disseminação de cepas com perfis de resistência e virulência elevados.

A elucidação da diversidade genômica e do potencial adaptativo de *Enterococcus faecalis* contribui para ampliar a compreensão sobre os mecanismos que sustentam sua persistência em diferentes ambientes, especialmente no contexto clínico. Os achados deste estudo reforçam a importância de abordagens genômicas integradas para revelar variações sutis, porém significativas, entre isolados próximos, com implicações epidemiológicas e funcionais.

9 PERSPECTIVAS

Futuros estudos devem aprofundar a compreensão genômica de *Enterococcus faecalis* por meio de análises do mobiloma, visando identificar elementos móveis associados à resistência e à virulência. A detecção de ilhas genômicas permitirá identificar regiões adquiridas por transferência horizontal que contribuem para o potencial adaptativo da espécie. Além disso, estudos evolutivos dos genes de resistência e virulência poderão esclarecer os processos de diversificação e adaptação da bactéria em diferentes ambientes. Também se destaca a importância de investigar a ausência do gene *asaI* na amostra S77_2, o que pode representar uma variação genômica pontual de relevância funcional e evolutiva.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKTER, T. *et al.* Virulence and antibiotic-resistance genes in *Enterococcus faecalis* associated with streptococcosis disease in fish. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1551, 2023. DOI: 10.1038/s41598-022-25968-8.
- AKWONGO, C. J. *et al.* Antimicrobial resistance in wild game mammals: a glimpse into the contamination of wild habitats in a systematic review and meta-analysis. **BMC Veterinary Research**, v. 21, n. 1, p. 14, 2025. DOI: 10.1186/s12917-024-04462-5.
- ALBERTÍ, S.; ASHBAUGH, C. D.; WESSELS, M. R. Structure of the has operon promoter and regulation of hyaluronic acid capsule expression in group A Streptococcus. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 343–353, 1998. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00800.x.
- ALCOCK, B. P. *et al.* CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D690–D699, 2023. DOI: 10.1093/nar/gkac920.
- ALHINAI, E. A.; WALTON, G. E.; COMMANE, D. M. The role of the gut microbiota in colorectal cancer causation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 21, p. 5295, 2019. DOI: 10.3390/ijms20215295
- ALI, L. *et al.* Molecular mechanisms of quorum-sensing regulation in *Enterococcus faecalis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, art. 960, 2017. DOI: 10.3390/ijms18050960.
- ANDERSON, A. C. *et al.* *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1534, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01534
- ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. **Babraham Bioinformatics**, 2010. Disponível em: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/index.html>.
- ARBELOA, A. *et al.* Role of class A penicillin-binding proteins in PBP5-mediated β -lactam resistance in *Enterococcus faecalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1221–1228, 2004. DOI: 10.1128/JB.186.5.1221-1228.2004.
- ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 266–278, 2012. DOI: 10.1038/nrmicro2761.
- ARNOLD, K. E.; WILLIAMS, N. J.; BENNETT, M. ‘Disperse abroad in the land’: the role of wildlife in the dissemination of antimicrobial resistance. **Biology Letters**, v. 12, n. 8, p. 20160137, 2016. DOI: 10.1098/rsbl.2016.0137.
- AWADH, H. *et al.* Management of enterococcal central line-associated bloodstream infections in patients with cancer. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 643, 2021. DOI: 10.1186/s12879-021-06328-9.

BERENDONK, T. U. *et al.* Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 310–317, 2015. DOI: 10.1038/nrmicro3439.

BIN-ASIF, H.; ABID ALI, S. *The genus Enterococcus and its associated virulent factors*. In: **Microorganisms**, IntechOpen, 2020. DOI: 10.5772/intechopen.89083.

BLAIR, J. M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, jan. 2015. DOI: 10.1038/nrmicro3380.

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.

BONTEN, M. J.; WILLEMS, R.; WEINSTEIN, R. A. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 5, p. 314-325, 2001. DOI: 10.1016/S1473-3099(01)00145-1.

BORGES, K. A. *et al.* Biofilm formation capacity of Salmonella serotypes at different temperature conditions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 1, 2018.

BOURGOGNE, A.; HILSENBECK, S. G.; DUNNY, G. M.; MURRAY, B. E. Comparison of OG1RF and an Isogenic *fsrB* Deletion Mutant by Transcriptional Analysis: the *Fsr* System of *Enterococcus faecalis* Is More than the Activator of Gelatinase and Serine Protease. **J Bacteriol.**, v. 188, n. 8, p. 2875-2884, 2006. DOI: 10.1128/JB.188.8.2875-2884.2006.

BOWERS, R. M. *et al.* Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea. **Nature Biotechnology**, v. 35, p. 725–731, 2017. DOI: 10.1038/nbt.3893.

CAGLAYAN, N. *et al.* Discovery of amino acid substitutions in penicillin-binding proteins associated with adaptation to D-Ala-D-Lac in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 15, art. 1522114, 11 fev. 2025. DOI: 10.3389/fcimb.2025.1522114.

CAMARGO, I. L. B. C.; ZANELLA, R. C.; GILMORE, M. S.; DARINI, A. L. C. Virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 273–278, 2008. DOI: 10.1590/S1517-83822008000200014.

CHATTOPADHYAY, I. *et al.* Exploring the role of gut microbiome in colon cancer. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 6, p. 1780-1799, jun. 2021. DOI: 10.1007/s12010-021-03498-9

CHKLOVSKI, A. *et al.* CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning. **Microbiome**, v. 10, n. 132, 2022. DOI: 10.1038/s41592-023-01940-w.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. C. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular**

Biology Reviews, v. 65, n. 2, p. 232–260, jun. 2001. DOI: 10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001.

COQUE, T. M.; SINGH, K. V.; WEINSTOCK, G. M.; MURRAY, B. E. Characterization of Dihydrofolate Reductase Genes from Trimethoprim-Susceptible and Trimethoprim-Resistant Strains of *Enterococcus faecalis*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 43, n. 1, p. 141-147, 1999. DOI: 10.1128/AAC.43.1.141.

COURVALIN, P. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, suppl. 1, p. 12–18, 2006. DOI: 10.1086/491711.

CRETI, R.; IMPERI, M.; BERTUCCINI, L., *et al.* Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 13-20, 2004. DOI: 10.1099/jmm.0.05353-0.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417–433, set. 2010. DOI: 10.1128/MMBR.00016-10.

DAZA, M. V. *et al.* Genomic insights of *Enterococcus faecium* UC7251, a multi-drug resistant strain from ready-to-eat food, highlight the risk of antimicrobial resistance in the food chain. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.894241.

DEIANA, G. *et al.* OneWorld, One Health: Zoonotic Diseases, Parasitic Diseases, and Infectious Diseases. **Healthcare**, v. 12, art. 922, 2024. DOI: 10.3390/healthcare12090922.

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

DORADO-MORALES, P. *et al.* Fitness cost evolution of natural plasmids of *Staphylococcus aureus*. **mBio**, v. 12, 2021. DOI: 10.1128/mbio.03094-20.

DUFFUS, D. A.; DEARDEN, P. Recreational use, valuation, and management of killer whales (*Orcinus orca*) on Canada's Pacific Coast. **Environmental Conservation**, v. 20, n. 2, p. 149–156, 1993. DOI: 10.1017/S0376892900037656.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. **Appl Environ Microbiol.**, v. 67, n. 4, p. 1628-1635, 2001. DOI: 10.1128/AEM.67.4.1628-1635.2001.

ELHADIDY, M.; ELSAYYAD, A. Uncommitted role of enterococcal surface protein, Esp, and origin of isolates on biofilm production by *Enterococcus faecalis* isolated from bovine mastitis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 46, 2012. DOI: 10.1016/j.jmii.2012.02.002.

EMERY, B. D. *et al.* Antimicrobial and antibiofilm activity of silver nanoparticles against *Salmonella* Enteritidis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 285–292, 2023. DOI: 10.1007/s42770-022-00868-1.

EMMS, D. M.; KELLY, S. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. **Genome Biol.**, v. 20, n. 1, p. 238, 2019. DOI: 10.1186/s13059-019-1832-y.

FAHIM, N. A. I. *et al.* Biofilms and antibiotic resistance profile of *Enterococcus faecalis* in selected dairy cattle farm environments in Bangladesh. **Plos One**, v. 20, n. 5, p. e0323667, 2025. DOI: 10.1371/journal.pone.0323667.

FARIA, A. M. **Escherichia coli e Salmonella sp. em suiformes nativos e exóticos assintomáticos em criações comerciais do estado de Goiás.** 2016. 69 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

FARMAN, M.; YASIR, M.; AL-HINDI, R. R., *et al.* Genomic analysis of multidrug-resistant clinical *Enterococcus faecalis* isolates for antimicrobial resistance genes and virulence factors from the western region of Saudi Arabia. **Antimicrob Resist Infect Control**, v. 8, n. 1, p. 55, 2019. DOI: 10.1186/s13756-019-0508-4.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783–791, 1985. DOI: /10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x.

FERGUSON, D. M.; TALAVERA, G. N.; HERNÁNDEZ, L. A. R.; 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. **Journal of Pathogens**, 2016, p. 1-7, 2016. DOI: 10.1155/2016/3437214.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, n. 6, p. 1749-1757, 2009. DOI: 10.1099/mic.0.026385-0.

FREITAS, A. M. *et al.* Comparative genomics of *Enterococcus faecalis* reveals lineage-specific traits associated with virulence and niche adaptation. **Microbial Genomics**, v. 8, n. 7, 2022. DOI: 10.1099/mgen.0.000350.

FREITAS, A. R.; COQUE, T. M.; NOVAIS, C., *et al.* Human and Swine Hosts Share Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* CC17 and CC5 and *Enterococcus faecalis* CC2 Clonal Clusters Harboring Tn1546 on Indistinguishable Plasmids. **J Clin Microbiol.**, v. 49, n. 3, p. 925-931, 2011. DOI: 10.1128/JCM.01750-10.

FREITAS, L. D. *et al.* Mecanismos de virulência de *Enterococcus faecalis* associados ao câncer colorretal. **Revista Científica Internacional**, v. 5, n. 2, 2023. DOI: 10.51126/revsalus.v5i2.496.

GAGNIÈRE, J. *et al.* Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 2, p. 501-518, 14 jan. 2016. DOI: .3748/wjg.v22.i2.501

GARCÍA-SOLACHE, M.; RICE, L. B. The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. e00058-18, 30 jan. 2019. DOI: 10.1128/CMR.00058-18.

GERALDES, C. *et al.* *Enterococcus* virulence and resistant traits associated with its permanence in the hospital environment. **Antibiotics**, v. 11, art. 857, 2022.

GILMORE, M. S.; CLEWELL, D. B.; IKE, Y.; SHANKAR, N. (ed.). Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection. **Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary**, 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. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 10-16, 2013. DOI: 10.1016/j.mib.2013.01.006.

GOLIŃSKA, E.; TOMUSIAK, A.; GOSIEWSKI, T.; WIĘCEK, G.; MACHUL, A.; MIKOŁAJCZYK, D. *et al.* Virulence factors of *Enterococcus* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 23, p. 3562–3572, 21 jun. 2013. DOI: 10.3748/wjg.v19.i23.3562.

GORIS, J. *et al.* DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 57, p. 81–91, 2007. DOI: doi.org/10.1099/ijs.0.64483-0.

GUNDERSON, K. *et al.* A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. **Nature Genetics**, v. 37, p. 549–554, 2005. DOI: doi.org/10.1038/ng1547

GUREVICH, A. *et al.* QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072–1075, 2013. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt086.

GUZMAN PRIETO, A. M. *et al.* Global emergence and dissemination of Enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones? **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, p. 788, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00788.

HALL, C. L.; TSCHANNEN, M.; WORTHEY, E. A.; KRISTICH, C. J. IreB, a Ser/Thr Kinase Substrate, Influences Antimicrobial Resistance in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 57, n. 12, p. 6179-6186, 2013. DOI: 10.1128/AAC.01472-13.

HALL, M. R.; MCGILLICUDDY, E.; KAPLAN, L. J. Biofilm: basic principles, pathophysiology, and implications for clinicians. **Surgical Infections (Larchmt)**, v. 15, n. 1, p. 1–7, fev. 2014. DOI: 10.1089/sur.2012.129.

HAMMERUM, A. M. Enterococci of animal origin and their significance for public health. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 7, p. 619–625, 2012. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03829.x.

HAMMERUM, A. M. *et al.* Antimicrobial-resistant Enterococci in animals and meat: a human health hazard? **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 10, 2010. DOI: 10.1089/fpd.2010.0552.

HANCOCK, L. E.; GILMORE, M. S. The capsular polysaccharide of *Enterococcus faecalis* and its relationship to other polysaccharides in the cell wall. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 3, p. 1574-1579, 5 fev. 2002. DOI: 1073/pnas.032448299.

HASMAN, H.; AARESTRUP, F. M. tcrB, a Gene Conferring Transferable Copper Resistance in *Enterococcus faecium*: Occurrence, Transferability, and Linkage to Macrolide and Glycopeptide Resistance. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 46, n. 5, p. 1410-1416, 2002. DOI: 10.1128/AAC.46.5.1410-1416.2002.

HE, Q. *et al.* Comparative genomic analysis of *Enterococcus faecalis*: insights into their environmental adaptations. **BMC Genomics**, v. 19, art. 527, 2018. DOI: 10.1186/s12864-018-4887-3.

HEGSTAD, K. *et al.* Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, p. 541–554, 2010. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03226.x.

HEIDARI, H.; HASANPOUR, S.; EBRAHIM-SARAIE, H. S.; MOTAMEDIFAR, M. High Incidence of Virulence Factors Among Clinical *Enterococcus faecalis* Isolates in Southwestern Iran. **Infect Chemother.**, v. 49, n. 1, p. 51, 2017. DOI: 10.3947/ic.2017.49.1.51.

HOFF, J. S. *et al.* Restructuring of *Enterococcus faecalis* biofilm architecture in response to antibiotic-induced stress. **mBio**, v. 8, n. 2, e02217-16, 2017.

HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. **Virulence**, v. 3, n. 5, p. 421–433, 2012. DOI: 10.4161/viru.21282.

HOLT, J. F. *et al.* *Enterococcus faecalis* 6-phosphogluconolactonase is required for both commensal and pathogenic interactions with *Manduca sexta*. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 1, p. 396-404, jan. 2015. DOI: 10.1128/IAI.02442-14.

HOOPER, D. C. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, suppl. 2, p. S24–S28, abr. 2000. DOI: 10.1086/314060.

HOURIGAN, D. *et al.* Promiscuous, persistent and problematic: insights into current enterococcal genomics to guide therapeutic strategy. **BMC Microbiology**, v. 24, n. 103, 2024. DOI: 10.1186/s12866-024-03243-2.

HÜRLIMANN, R. *et al.* The heterodimeric ABC transporter EfrCD mediates multidrug efflux in *Enterococcus faecalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 24, 2016.

HUYCKE, M. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. S. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 239-249, 1998. DOI: 10.3201/eid0402.980211.

IANNETTA, A. A.; MINTON, N. E.; UITENBROEK, A. A., *et al.* IreK-Mediated, Cell Wall-Protective Phosphorylation in *Enterococcus faecalis*. **J Proteome Res.**, v. 20, n. 11, p. 5131-5144, 2021. DOI: 10.1021/acs.jproteome.1c00635.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE – ICMBIO. Relatório de atividades 2022. Brasília: ICMBio, 2022. Disponível em:

<https://www.gov.br/icmbio/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/relatorios/Relatrio2022.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2024.

IWERIEBOR, B. C. *et al.* Virulence and antimicrobial resistance factors of *Enterococcus* spp. isolated from fecal samples from piggery farms in Eastern Cape, South Africa. **BMC Microbiology**, v. 15, art. 136, 2015. DOI: 10.1186/s12866-015-0468-7.

JOHANSON, J. J.; FERIANCIKOVA, L.; XU, S. Influence of enterococcal surface protein (*esp*) on the transport of *Enterococcus faecium* within saturated quartz sands. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 3, p. 1511–1518, 7 fev. 2012. doi: 10.1021/es203265m.

JONAS, B. M.; MURRAY, B. E.; WEINSTOCK, G. M. Characterization of *emeA*, a NorA homolog and multidrug resistance efflux pump, in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 45, n. 12, p. 3574-3579, 2001. DOI: 10.1128/AAC.45.12.3574-3579.2001.

KAYAOGU, G.; ORSTAVIK, D. Virulence Factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to Endodontic Disease. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 15, n. 5, p. 308-320, 2004. DOI: 10.1177/154411130401500506.

KE, D. *et al.* Evidence for horizontal gene transfer in evolution of elongation factor Tu in enterococci. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 24, p. 6913–6920, dez. 2000. DOI: 10.1128/JB.182.24.6913-6920.2000.

KHALIL, M. A. *et al.* Antibiotic resistance and biofilm formation in *Enterococcus* spp. isolated from urinary tract infections. **Pathogens**, v. 12, n. 1, p. 34, 2022. DOI: 10.3390/pathogens12010034.

KIM, D. H. *et al.* Antimicrobial resistance and virulence profiles of *Enterococcus* spp. isolated from horses in Korea. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, n. 48, p. 6–13, 2016. DOI: 10.1016/j.cimid.2016.07.001.

KIM, M. A.; ROSA, V.; MIN, K. S. Characterization of *Enterococcus faecalis* in different culture conditions. **Sci Rep.**, v. 10, n. 1, p. 21867, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-78998-5.

KIRUTHIGA, A.; PADMAVATHY, K.; SHABANA, P.; NAVEENKUMAR, V.; GNANADESIKAN, S.; MALAIYAN, J. Improved detection of *esp*, *hyl*, *asa1*, *gelE*, *cylA* virulence genes among clinical isolates of *Enterococci*. **BMC Research Notes**, v. 13, n. 1, p. 170, 20 mar. 2020. doi: 10.1186/s13104-020-05018-0.

KRAWCZYK, B. *et al.* The many faces of *Enterococcus* spp.—commensal, probiotic and opportunistic pathogen. **Microorganisms**, v. 9, art. 1900, 2021.

KRISTIAN, S. A. *et al.* Genetic and pharmacological inactivation of d-alanylation of teichoic acids sensitizes pathogenic enterococci to β -lactams. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 11, p. 3162–3173, 2019.

KRISTICH, C. J. *et al.* Enterococcal infection—treatment and antibiotic resistance. In: GILMORE, M. S.; CLEWELL, D. B.; IKE, Y.; SHANKAR, N. (Eds.). *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. **Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary**, 2014.

KRISTICH, C. J.; CHANDLER, J. R.; DUNNY, G. M. Development of a host-genotype-independent counterselectable marker and a high-frequency conjugative delivery system and their use in genetic analysis of *Enterococcus faecalis*. **Plasmid**, v. 57, n. 2, p. 131-144, 2007. DOI: 10.1016/j.plasmid.2006.08.003.

KRISTICH, C. J.; LITTLE, J. L.; HALL, C. L.; HOFF, J. S. Reciprocal Regulation of Cephalosporin Resistance in *Enterococcus faecalis*. In: LOW, D. E. (Ed.). **mBio**, v. 2, n. 6, e00199-11, 2011. DOI: 10.1128/mBio.00199-11.

KRISTICH, C. J.; WELLS, C. L.; DUNNY, G. M. A eukaryotic-type Ser/Thr kinase in *Enterococcus faecalis* mediates antimicrobial resistance and intestinal persistence. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, n. 9, p. 3508-3513, 2007. DOI: 10.1073/pnas.0608742104.

LABORDA, P.; SANZ-GARCÍA, F.; OCHOA-SÁNCHEZ, L. E.; GIL-GIL, T.; HERNANDO-AMADO, S.; MARTÍNEZ, J. L. Wildlife and Antibiotic Resistance. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 12, p. 873989, 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2022.873989.

LEBRETON, F. *et al.* Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. **mBio**, v. 4, n. 4, e00534-13, 2013. DOI: 10.1128/mBio.00534-13.

LEBRETON, F. *et al.* *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization. In: *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. **Massachusetts Eye and Ear Infirmary**, Boston, MA, USA, p. 1–46, 2014.

LEBRETON, F.; MANSON, A. L.; SAAVEDRA, J. T.; STRAUB, T. J.; EARL, A. M.; GILMORE, M. S. Tracing the enterococci from Paleozoic origins to the hospital. **Cell**, v. 169, p. 849–861, 2017.

LEE, E. W.; HUDA, M. N.; KURODA, T.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. EfrAB, an ABC Multidrug Efflux Pump in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 47, n. 12, p. 3733-3738, 2003. DOI: 10.1128/AAC.47.12.3733-3738.2003.

LEE, E. W. *et al.* Functional cloning and expression of *emeA*, and characterization of EmeA, a multidrug efflux pump from *Enterococcus faecalis*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 2, p. 266–270, 2003. DOI: 10.1248/bpb.26.266.

LEE, T.; PANG, S.; ABRAHAM, S.; COOMBS, G. W. Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: the past, the present and the future. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 16, p. 36–47, 2019.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. **Nucleic Acids Research**, v. 52, 2024. DOI: 10.1093/nar/gkae268.

LI, X. S.; QI, Y.; LI, P. *et al.* Genetic characterization of MDR genomic elements carrying two *aac(6')*-*aph(2'')* genes in feline-derived clinical *Enterococcus faecalis* isolate. **Front Microbiol.**, v. 14, p. 1191837, 2023. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1191837.

LI, X. Y.; YU, R.; XU, C.; SHANG, Y.; LI, D.; DU, X. D. A Small Multihost Plasmid Carrying erm(T) Identified in *Enterococcus faecalis*. **Front Vet Sci.**, v. 9, p. 850466, 2022. DOI: 10.3389/fvets.2022.850466.

LI, X.; MOWLABOCCUS, S.; JACKSON, B.; CAI, C.; COOMBS, G. W. Antimicrobial resistance among clinically significant bacteria in wildlife: An overlooked one health concern. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 64, n. 3, p. 107251, 2024. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2024.107251.

LI, X.; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 28, p. 337–418, 2015. DOI: 1128/cmr.00117-14.

LIU, B. *et al.* VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. **Nucleic Acids Research**, v. 50, p. D912–D917, 2022. DOI: 10.1093/nar/gkab1107.

LOPES, M. F. S. *et al.* Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, n. 3, p. 208–214, 2006. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.004.

MADELA, N. K. *et al.* Isolamento, identificação e detecção de resistência aos antimicrobianos em *Enterococcus* spp. isolados de carnes bovinas e suínas. **Journal of Health Science Institute**, v. 35, n. 2, p. 87–90, 2017.

MAKOVSKA, I.; DHAKA, P.; CHANTZIARAS, I.; PESSOA, J.; DEWULF, J. The role of wildlife and pests in the transmission of pathogenic agents to domestic pigs: a systematic review. **Animals**, v. 13, p. 1830, 2023. DOI: 10.3390/ani13111830.

MANNI, M.; BERKELEY, M. R.; SEPPEY, M.; ZDOBNOV, E. M. BUSCO: Assessing Genomic Data Quality and Beyond. **Current Protocols**, v. 1, n. 12, e323, 2021. DOI: 10.1002/cpz1.323.

MANSON, J. M.; HANCOCK, L. E.; GILMORE, M. S. Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 12269–12274, 2010. DOI: 10.1073/pnas.1000139107

MARKEY, B. *et al.* Clinical Veterinary Microbiology. 2. ed. **St. Louis: Elsevier Health Sciences**, 2013. E-book.

MARQUES, G. R. *et al.* Resistência bacteriana na medicina veterinária e implicações com a saúde pública. **Veterinária e Zootecnia**, v. 30, p. 1–12, 2023.

McLENNAN, D. A. How to read a phylogenetic tree. **Evolution: Education and Outreach**, n. 3, p. 506–519, 2010. DOI: 10.1007/s12052-010-0273-6.

MEN, P. *et al.* Association between the AUC/MIC ratio of vancomycin and its clinical effectiveness: a systematic review and meta-analysis. **PLOS One**, v. 11, n. 1, 2016.

MIGURA, L. G. *et al.* Presence of glycopeptide-encoding plasmids in enterococcal isolates from food and humans in Denmark. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 11, p. 1191–1197, 2011. DOI: 10.1089/fpd.2011.0897.

MILLER, W. R.; MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 12, p. 1221–1236, 2014. DOI: 10.1586/14787210.2014.956092.

MILLER, W. R.; MURRAY, B. E.; RICE, L. B.; ARIAS, C. A. Vancomycin-resistant *Enterococci*: therapeutic challenges in the 21st century. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 415–439, 2016. doi: 10.1016/j.idc.2016.02.012.

MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1581–1588, 2007. DOI: 10.1099/jmm.0.47331-0.

MOTALLEBI, M.; SEYYEDI, Z. S.; AZADCHEHR, M. J. Genetic Diversity, Antimicrobial Resistance, and Virulence Factors of *Enterococcus faecalis* Isolates Obtained from Stool Samples of Hospitalized Patients. **Jundishapur J Microbiol.**, v. 15, n. 6, 2022. DOI: 10.5812/jjm-121379.

MUBARAK, A. G. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from fish, vegetables, and humans. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-71610-0.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, 2016. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.

MWIKUMA, G.; KAINGA, H.; KALLU, S. A.; NAKAJIMA, C.; SUZUKI, Y.; HANG'OMBE, B. M. Determination of the prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* associated with poultry in four districts in Zambia. **Antibiotics**, v. 12, n. 4, p. 657, 2023. DOI: 10.3390/antibiotics12040657.

NALLAPAREDDY, S. R.; SINGH, K. V.; SILLANPAA, J., *et al.* Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 10, p. 2799–2807, 2006. DOI: 10.1172/JCI29021.

NALLAPAREDDY, S. R.; SINGH, K. V.; SILLANPÄÄ, J.; ZHAO, M.; MURRAY, B. E. Relative contributions of Ebp pili and the collagen adhesin Ace to host extracellular matrix protein adherence and experimental urinary tract infection by *Enterococcus faecalis* OG1RF. In: CAMILLI, A., ed. **Infect Immun.**, v. 79, n. 7, p. 2901–2910, 2011. DOI: 10.1128/IAI.00038-11.

NATES, J. L. *et al.* Septic shock in the immunocompromised cancer patient: a narrative review. **Critical Care**, v. 28, art. 285, 2024. DOI: 10.1186/s13054-024-05073-0.

NCBI. *Enterococcus faecalis* EnGen0336. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1169293>.

NÜESCH-INDERBINEN, M. *et al.* Oxazolidinone resistance genes in florfenicol-resistant enterococci from beef cattle and veal calves at slaughter. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1150070.

OGLESBY-SHERROUSE, A. G. *et al.* The complex interplay of iron, biofilm formation, and mucoidy affecting antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. **Pathogens Disease**, v. 70, p. 307-320, 2014.

OLANREWAJU, O. S. *et al.* Genomic diversity, antibiotic resistance, and virulence in South African *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus lactis* isolates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 8, p. 289, 2024. DOI: 10.1007/s11274-024-04098-5.

OLSEN, R. H. *et al.* *Enterococcus faecalis* of human and poultry origin share virulence genes supporting the zoonotic potential of *E. faecalis*. **Zoonoses and Public Health**, v. 59, p. 256–263, 2012.

ORAMS, M. B. Feeding wildlife as a tourism attraction: a review of issues and impacts. **Tourism Management**, v. 23, p. 281–293, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Plano de ação global sobre a resistência aos antimicrobianos. Genebra: OMS, 2015. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>. Acesso em: 7 jul. 2025.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 1 abr. 2014. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564748>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Resistência antimicrobiana: relatório global de vigilância 2020. Genebra: WHO Press, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240027336>.

OVERGAAUW, P. A. M. *et al.* A One Health perspective on the human–companion animal relationship with emphasis on zoonotic aspects. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, art. 3789, 2020. DOI: 10.3390/ijerph17113789.

PÁDUA, S. B. de. **Doenças bacterianas em bagres sul-americanos: isolamento, caracterização e patogenia**. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, SP, 2013.

PAL, C.; BENGTTSSON-PALME, J.; KRISTIANSSON, E.; LARSSON, D. G. J. The structure and diversity of human, animal and environmental resistomes. **Microbiome**, v. 4, n. 1, p. 54, 2016. DOI: 10.1186/s40168-016-0199-5.

PALMER, K. L. *et al.* Comparative genomics of enterococci: variation in *Enterococcus faecalis*, clade structure, and genomic determinants of pathogenicity. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, e12489, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0012489.

- PALMER, K. L. *et al.* Comparative genomics of enterococci: variation in *Enterococcus faecalis*, clade structure in *E. faecium*, and defining characteristics of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*. **mBio**, v. 3, 2012. DOI: 10.1128/mbio.00318-11.
- PALMER, K. L.; KOS, V. N.; GILMORE, M. S. Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 632–639, 2010. DOI: 10.1016/j.mib.2010.08.004.
- PAULSEN, I. T. *et al.* Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Science**, v. 299, n. 5615, p. 2071–2074, 2003. DOI: 10.1126/science.1080613.
- PARADELLA, T. C. *et al.* *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. **Revista de Odontologia da UNESP**, São José dos Campos, v. 36, n. 2, p. 163–168, 2007.
- PARK, S. Y.; KIM, K. M.; LEE, J. H.; SEO, S. J.; LEE, I. H. Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. **Infect Immun.**, v. 75, n. 4, p. 1861–1869, 2007. DOI: 10.1128/IAI.01473-06.
- PÄRNÄNEN, K.; KARKMAN, A.; TAMMINEN, M., *et al.* Evaluating the mobility potential of antibiotic resistance genes in environmental resistomes without metagenomics. **Sci Rep.**, v. 6, n. 1, p. 35790, 2016. DOI: 10.1038/srep35790.
- PASCHOALINI, B. R. *et al.* The emergence of antimicrobial resistance and virulence characteristics in *Enterococcus* species isolated from bovine milk. **Antibiotics**, v. 12, art. 1243, 2023. DOI: 10.3390/antibiotics12081243.
- PEREIRA, A. P. *et al.* Evolution of chlorhexidine susceptibility and of the *EfrEF* operon among *Enterococcus faecalis* from diverse environments, clones, and time spans. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 4, p. e01176-22, 31 ago. 2022. DOI: 10.1128/spectrum.01176-22.
- PERNAMBUCO. Parque Nacional do Catimbau, Buíque, 2010. Disponível em: <https://buique.pe.gov.br/parque-nacional-do-catimbau/>.
- POMBA, C. *et al.* Treatment of a lower urinary tract infection in a cat caused by a multi-drug methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and *Enterococcus faecalis*. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, p. 802–806, 2010. DOI: 10.1016/j.jfms.2010.04.006.
- POOLE, K. Efflux mediated antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 20–51, jul. 2005. DOI: 10.1093/jac/dki171.
- PRAGER, K. C. *et al.* The effect of protected areas on pathogen exposure in endangered African wild dog (*Lycaon pictus*) populations. **Biological Conservation**, v. 150, n. 1, p. 15–22, jun. 2012. DOI: 10.1016/j.biocon.2012.03.005.
- PRITCHARD, L.; GLOVER, R. H.; HUMPHRIS, S.; ELPHINSTONE, J. G.; TOTH, I. K. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. **Anal Methods**, v. 8, n. 1, p. 12–24, 2016. DOI: 10.1039/C5AY02550H.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2023.

RAMÍREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 6, p. 151–171, dez. 2010.

RAN, S.; LIU, B.; JIANG, W.; LIANG, J. Transcriptome analysis of *Enterococcus faecalis* in response to alkaline stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00795

RAVEN, K. E.; REUTER, S.; GOULIOURIS, T., *et al.* Genome-based characterization of hospital-adapted *Enterococcus faecalis* lineages. **Nat Microbiol.**, v. 1, n. 3, p. 15033, 2016. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2015.33.

RICHER, M. *et al.* JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. **Bioinformatics**, v. 32, n. 6, p. 929–931, 2016. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv681.

ROBERTS, M. C. Update on macrolide–lincosamide–streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 282, n. 2, p. 147–159, 2008. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01145.x.

RODRIGUES, C.; CUNHA, M. Â. Assessment of the microbiological quality of recreational waters: indicators and methods. **Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration**, v. 2, p. 25, 2017. DOI: 10.1007/s41207-017-0035-8

RODRIGUES, D. L. N.; ARIUTE, J. C.; RODRIGUES DA COSTA, F. M., *et al.* PanViTa: Pan Virulence and resisTance analysis. **Front Bioinform.**, v. 3, p. 1070406, 2023. DOI: 10.3389/fbinf.2023.1070406.

ROMAGNOLI, F. C. **Interpretação ambiental e envolvimento comunitário: ecoturismo como ferramenta para a conservação do boto-vermelho *Inia geoffrensis*.** 2010. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, 2010.

ROTHENHEBER, D.; JONES, S. Enterococcal concentrations in a coastal ecosystem are a function of fecal source input, environmental conditions, and environmental sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 17, 2018. DOI: 10.1128/AEM.01038-18

RSTUDIO TEAM. RStudio: Integrated Development Environment for R. Boston: RStudio, PBC, 2023.

SANTOS, L. D. R. dos. **Caracterização molecular de isolados ambientais de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*.** 2021. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2021.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu153.

SHOBO, C. O.; AMOAKO, D. G.; ALLAM, M.; ISMAIL, A.; ESSACK, S. Y.; BESTER, L. A. A genomic snapshot of antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* within public hospital environments in South Africa. In: SANTANGELO, O. E., ed. **Global Health**, 2023, p. 1-11. DOI: 10.1155/2023/6639983.

SINGH, K. V.; NALLAPAREDDY, S. R.; SILLANPÄÄ, J.; MURRAY, B. E. Importance of the collagen adhesin Ace in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis. In: CHEUNG, A., ed. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 1, p. e1000716, 2010. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000716.

SINGH, K. V.; WEINSTOCK, G. M.; MURRAY, B. E. An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 46, n. 6, p. 1845-1850, 2002. DOI: 10.1128/AAC.46.6.1845-1850.2002.

SIRICHOAT, A. *et al.* Antibiotic resistance-susceptibility profiles of *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus* spp. from the human vagina, and genome analysis of the genetic basis of intrinsic and acquired resistances. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 11, p. 1438, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01438.

SMITH, H. *et al.* Reducing risky interactions between tourists and free-ranging dolphins (*Tursiops* sp.) in an artificial feeding program at Monkey Mia, Western Australia. **Tourism Management**, v. 29, p. 994–1001, 2008. DOI: 10.1016/j.tourman.2008.01.001.

SMOGLICA, C.; CARCAGNÌ, A.; ANGELUCCI, S., *et al.* Systematic review and meta-analysis of antimicrobial resistant bacteria in free-ranging wild mammals. **BMC Vet Res.**, v. 21, n. 1, p. 150, 2025. DOI: 10.1186/s12917-025-04548-8.

SOUZA, D. B. de *et al.* Resistant enterococci isolated from raw sheep's milk and cheeses from South region of Brazil. **Ciência Rural**, v. 53, n. 10, 2023. DOI: 10.1590/0103-8478cr20220288.

STANTON, I. C. *et al.* Existing evidence on antibiotic resistance exposure and transmission to humans from the environment: a systematic map. **Environmental Evidence**, v. 11, p. 8, 2022. DOI: 10.1186/s13750-022-00262-2.

SUKMAWINATA, E. *et al.* Antimicrobial-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from healthy thoroughbred racehorses in Japan. **Journal of Equine Veterinary Science**, n. 94, 2020. DOI: 10.1016/j.jevs.2020.103232.

SURETTE, M. D.; WRIGHT, G. D. Lessons from the environmental antibiotic resistome. **Annu Rev Microbiol.**, v. 71, n. 1, p. 309-329, 2017. DOI: 10.1146/annurev-micro-090816-093420.

SWIFT, B. M. C.; BENNETT, M.; WALLER, K., *et al.* Anthropogenic environmental drivers of antimicrobial resistance in wildlife. **Science of The Total Environment**, v. 649, p. 12-20, 2019. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.180.

TATUSOVA, T.; DICUCCIO, M.; BADRETDIN, A., *et al.* NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. **Nucleic Acids Res.**, v. 44, n. 14, p. 6614-6624, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkw569.

TAVARES, M. M. P. **Caracterização de Enterococcus spp. isolados da boca e do coração de cães com doença periodontal**. 2014. 107 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2014.

TEN HOOPEN, P.; FINN, R. D.; BONGO, L. A., *et al.* The metagenomic data life-cycle: standards and best practices. **GigaScience**, v. 6, n. 8, 2017. DOI: 10.1093/gigascience/gix047.

TENDOLKAR, P. M.; BAGHDAYAN, A. S.; SHANKAR, N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, v. 60, n. 12, p. 2622-2636, 2003. DOI: 10.1007/s00018-003-3138-0.

THURLOW, L. R.; THOMAS, V. C.; HANCOCK, L. E. Capsular polysaccharide production in *Enterococcus faecalis* and contribution of CpsF to capsule serospecificity. **J Bacteriol.**, v. 191, n. 20, p. 6203-6210, 2009. DOI: 10.1128/JB.00592-09.

TOLEDO-ARANA, A.; VALLE, J.; SOLANO, C., *et al.* The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Appl Environ Microbiol.**, v. 67, n. 10, p. 4538-4545, 2001. DOI: 10.1128/AEM.67.10.4538-4545.2001.

VAN SCHAIK, W. The human gut resistome. **Phil Trans R Soc B.**, v. 370, n. 1670, 2015. DOI: 10.1098/rstb.2014.0087.

VAN REENEN, C. A.; DICKS, L. M. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 3, p. 157–168, mar. 2011. DOI: 10.1007/s00203-010-0668-3

VAN TYNE, D. V. *et al.* Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. **Toxins**, v. 5, p. 895–911, 2013. DOI: 10.3390/toxins5050895.

VAN TYNE, D.; GILMORE, M. S. Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. **Annual Review of Microbiology**, v. 68, p. 337–356, 2014. DOI: 10.1146/annurev-micro-091213-113003.

VANEK, N. N. *et al.* *Enterococcus faecalis* aggregation substance promotes opsonin independent binding to human neutrophils via complement receptor type 3-mediated mechanism. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 49–60, 1999.

VIDAL, M. D. *et al.* Diversidade, desafios e potencialidades do turismo com mamíferos na Amazônia brasileira. **Revista Brasileira de Ecoturismo**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 157–179, 2022.

WANG, Y. *et al.* Crosstalk between microbial biofilms in the gastrointestinal tract and chronic mucosa diseases. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1151552, 2023. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1151552.

WATERS, C. M.; ANTIPOORTA, M. H.; MURRAY, B. E.; DUNNY, G. M. Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. **J Bacteriol.**, v. 185, n. 12, p. 3613-3623, 2003. DOI: 10.1128/JB.185.12.3613-3623.2003.

WECKWERTH, P. H.; ZAPATA, R. O.; VIVAN, R. R.; TANOMARU FILHO, M.; MALIZA, A. G. A.; DUARTE, M. A. H. In vitro alkaline pH resistance of *Enterococcus faecalis*. **Braz Dent J.**, v. 24, n. 5, p. 474-476, 2013. DOI: 10.1590/0103-6440201301731.

WEIGAND, M. R.; ASHBOLT, N. J.; KONSTANTINIDIS, K. T.; SANTO DOMINGO, J. W. Genome sequencing reveals the environmental origin of enterococci and potential biomarkers for water quality monitoring. **Environ Sci Technol.**, v. 48, n. 7, p. 3707-3714, 2014. DOI: 10.1021/es4054835.

WEIGEL, P. H.; DEANGELIS, P. L. Hyaluronan synthases: a decade-plus of novel glycosyltransferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 51, p. 36777-36781, 2007. DOI: 10.1074/jbc.R700036200.

WERNER, G.; COQUE, T. M.; HAMMERUM, A. M., *et al.* Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. **Euro Surveill.**, v. 13, n. 47, 2008.

WILLEMS, R. J. L.; TOP, J.; VAN SANTEN, M., *et al.* Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. **Emerg Infect Dis.**, v. 11, n. 6, p. 821-828, 2005. DOI: 10.3201/1106.041204.

WONG, T.; LY-TRONG, N.; REN, H., *et al.* **IQ-TREE 3: Phylogenomic inference software using complex evolutionary models.** Publicado em 7 abr. 2025. DOI: 10.32942/X2P62N.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1451-1470, jul. 2005. DOI: 10.1016/j.addr.2005.04.002.

YOON, S. H. *et al.* A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. **Antonie van Leeuwenhoek**, n. 110, p. 1281-1286, 2017. DOI: 10.1007/s10482-017-0844-4.

ZAIDI, S. E. Z.; ZAHEER, R.; POULIN-LAPRADE, D., *et al.* Comparative genomic analysis of enterococci across sectors of the One Health continuum. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 727, 2023. DOI: 10.3390/microorganisms11030727.

ZALIPOUR, M.; ESFAHANI, B. N.; HAVAEI, S. A. Phenotypic and genotypic characterization of glycopeptide, aminoglycoside and macrolide resistance among clinical isolates of *Enterococcus faecalis*: a multicenter based study. **BMC Res Notes**, v. 12, n. 1, p. 292, 2019. DOI: 10.1186/s13104-019-4339-4.

ZHAO, Y. C.; SUN, Z. H.; LI, J. K. *et al.* Exploring the causes of the prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Environmental Sciences Europe**, v. 36, p. 92, 2024. DOI: 10.1186/s12302-024-00923-8.

ZHENG, J.; WU, Y.; LIN, Z., *et al.* ClpP participates in stress tolerance, biofilm formation, antimicrobial tolerance, and virulence of *Enterococcus faecalis*. **BMC Microbiol.**, v. 20, n. 1, p. 30, 2020. DOI: 10.1186/s12866-020-1719-9.

APÊNDICE A

Tabela A.1 - Metadados dos 264 genomas de *Enterococcus faecalis*

Nome da Amostra	Bio Project	Bio Sample	Hospedeiro	Ano de coleta	Ano de depósito	País	Origem da amostra	Enfermidade
59	PRJNA 800580	SAMN25 249814	<i>Homo sapiens</i>	2015	2022	EUA	fecal	-
62	PRJNA 61185	SAMN02 603509	D	D	2011	D	D	-
152	PRJNA 800580	SAMN25 249822	<i>Homo sapiens</i>	2015	2022	EUA	fecal	-
249	PRJNA 783264	SAMN23 424735	<i>Homo sapiens</i>	2021	2022	Suíça	fecal	-
661	PRJNA 783264	SAMN23 424737	<i>Homo sapiens</i>	2021	2022	Suíça	fecal	-
705	PRJNA 783264	SAMN23 424734	<i>Homo sapiens</i>	2021	2022	Suíça	fecal	-
732	PRJNA 783264	SAMN23 424736	<i>Homo sapiens</i>	2021	2022	Suíça	fecal	-
1521	PRJNA 783264	SAMN23 424733	<i>Homo sapiens</i>	2021	2022	Suíça	fecal	-
3143	PRJNA 941924	SAMN33 617003	<i>Homo sapiens</i>	2015	2023	EUA	urina	Catéter urinário
29212	PRJNA 244550	SAMN02 870637	D	D	2014	EUA	D	-
0921600 07-3	PRJNA 587161	SAMN13 182395	A/A	2009	2020	EUA	ar	-
101-1	PRJNA 800580	SAMN25 249816	<i>Homo sapiens</i>	2015	2022	EUA	fecal	-
1115400 27-2	PRJNA 587161	SAMN13 182396	A/A	2011	2020	EUA	superfície	-
1115400 47-1	PRJNA 587161	SAMN13 182397	A/A	2011	2020	EUA	superfície	-
119-1	PRJNA 800580	SAMN25 249817	<i>Homo sapiens</i>	2015	2022	EUA	fecal	-
119-2	PRJNA 800580	SAMN25 249818	<i>Homo sapiens</i>	2015	2022	EUA	fecal	-
1207/14	PRJNA 731638	SAMN19 292310	<i>Homo sapiens</i>	2014	2021	Polônia	fecal	-

(continua)

133-1	PRJNA 800580	SAMN25 249819	<i>Homo sapiens</i>	2015	2022	EUA	fecal	-
1331700 41-3	PRJNA 587161	SAMN13 182398	A/A	2013	2020	EUA	ar	-
142-1	PRJNA 800580	SAMN25 249820	<i>Homo sapiens</i>	2015	2022	EUA	fecal	-
143-1	PRJNA 800580	SAMN25 249821	<i>Homo sapiens</i>	2015	2022	EUA	fecal	-
18-243	PRJNA 682333	SAMN16 988090	<i>Homo sapiens</i>	2018	2021	França	sistema digestivo	-
2-1	PRJNA 800580	SAMN25 249812	<i>Homo sapiens</i>	2015	2022	EUA	fecal	-
43-2	PRJNA 800580	SAMN25 249813	<i>Homo sapiens</i>	2015	2022	EUA	fecal	-
90_2023	PRJNA 980555	SAMN35 638176	A/A	2023	2023	Suíça	alimento	-
AFL- 109F	PRJNA 889763	SAMN31 253290	<i>Camelus bactrianus</i>	2019	2023	China	fecal	-
AKSZ- 208	PRJNA 716763	SAMN27 545017	A/A	2018	2018	China	ambiente	-
AR_0780	PRJNA 523425	SAMN11 953790	D	D	2019	D	D	-
ARO1/D G	PRJNA 395129	SAMN07 371835	<i>Canis lupus familiaris</i>	2001	2017	Nova Zelândia	D	Mastite
AT04	PRJNA 833940	SAMN28 025447	A/A	2022	2022	Suíça	alimento	-
AT09	PRJNA 833940	SAMN28 025448	A/A	2022	2022	Suíça	alimento	-
AT22	PRJNA 833940	SAMN28 025451	A/A	2022	2022	Suíça	alimento	-
AT29	PRJNA 833940	SAMN28 025452	A/A	2022	2022	Suíça	alimento	-
AT34	PRJNA 833940	SAMN28 025455	A/A	2022	2022	Suíça	alimento	-
AT39	PRJNA 833940	SAMN28 025456	A/A	2022	2022	Suíça	alimento	-
AT40a	PRJNA 833940	SAMN28 025457	A/A	2022	2022	Suíça	alimento	-
AT40b	PRJNA 833940	SAMN28 025458	A/A	2022	2022	Suíça	alimento	-

(continua)

AT41	PRJNA 833940	SAMN28 025459	A/A	2022	2022	Suíça	alimento	-
AT43a	PRJNA 833940	SAMN28 025460	A/A	2022	2022	Suíça	alimento	-
AT46a	PRJNA 833940	SAMN28 025463	A/A	2022	2022	Suíça	alimento	-
AT48	PRJNA 833940	SAMN28 025466	A/A	2022	2022	Suíça	alimento	-
AT49a	PRJNA 833940	SAMN28 025467	A/A	2022	2022	Suíça	alimento	-
AT50	PRJNA 833940	SAMN28 025468	A/A	2022	2022	Suíça	alimento	-
B05	PRJNA 103987 7	SAMN38 231263	<i>Homo sapiens</i>	2023	2024	China	sistema digestivo	-
B-537	PRJNA 933695	SAMN33 246475	<i>Homo sapiens</i>	2021	2023	EUA	D	-
B594	PRJNA 88231	SAMN00 808929	<i>Homo sapiens</i>	1985	2019	EUA	sangue	-
BE11	PRJNA 891504	SAMN31 342458	<i>Homo sapiens</i>	2019	2022	Itália	saliva	-
BE13	PRJNA 891504	SAMN31 342459	<i>Homo sapiens</i>	2019	2022	Itália	saliva	-
BE15	PRJNA 891504	SAMN31 342460	<i>Homo sapiens</i>	2019	2022	Itália	saliva	-
BE16	PRJNA 891504	SAMN31 342461	<i>Homo sapiens</i>	2019	2022	Itália	saliva	-
BE17	PRJNA 891504	SAMN31 342462	<i>Homo sapiens</i>	2019	2022	Itália	saliva	-
BE25	PRJNA 891504	SAMN31 342463	<i>Homo sapiens</i>	2019	2022	Itália	saliva	-
BE32	PRJNA 891504	SAMN31 342464	<i>Homo sapiens</i>	2019	2022	Itália	saliva	-
BE33	PRJNA 891504	SAMN31 342465	<i>Homo sapiens</i>	2019	2022	Itália	saliva	-
BE43	PRJNA 891504	SAMN31 342466	<i>Homo sapiens</i>	2019	2022	Itália	saliva	-
BE45	PRJNA 891504	SAMN31 342467	<i>Homo sapiens</i>	2019	2022	Itália	saliva	-
BE47	PRJNA 891504	SAMN31 342468	<i>Homo sapiens</i>	2019	2022	Itália	saliva	-

(continua)

BE5	PRJNA 891504	SAMN31 342455	<i>Homo sapiens</i>	2019	2022	Itália	saliva	-
BE52	PRJNA 891504	SAMN31 342470	<i>Homo sapiens</i>	2019	2022	Itália	saliva	-
BE69	PRJNA 891504	SAMN31 342476	<i>Homo sapiens</i>	2021	2022	Itália	saliva	-
BE7	PRJNA 891504	SAMN31 342456	<i>Homo sapiens</i>	2019	2022	Itália	saliva	-
BE8	PRJNA 891504	SAMN31 342457	<i>Homo sapiens</i>	2019	2022	Itália	saliva	-
BFF1B1	PRJNA 587826	SAMN13 219623	<i>Oreochromis niloticus</i>	2018	2021	Bangladesh	D	-
BX5936	PRJEB 36950	SAMEA 6595201	<i>Homo sapiens</i>	2017	2021	Reino Unido	sêmen	Doente
BX8117	PRJEB 36950	SAMEA 6595202	<i>Homo sapiens</i>	2017	2021	Reino Unido	urina	-
C25	PRJNA 476188	SAMN09 428129	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2017	2019	China	fecal	Diarreia
C54	PRJNA 476189	SAMN09 428130	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2017	2019	China	fecal	Diarreia
CF2A-2143	PRJNA 104148 7	SAMN38 286514	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2020	2024	Coreia do Sul	D	-
CF3A-1283	PRJNA 104476 9	SAMN38 411962	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2021	2024	Coreia do Sul	D	-
CF3A-2134	PRJNA 102403 5	SAMN37 686922	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2020	2023	Coreia do Sul	retal	-
CF3A-253	PRJNA 104148 7	SAMN38 286516	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2020	2024	Coreia do Sul	D	-
CF3A-343	PRJNA 104148 7	SAMN38 286517	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2020	2024	Coreia do Sul	D	-
CF4A-3113	PRJNA 104148 7	SAMN38 286515	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2020	2024	Coreia do Sul	D	-
CF4H-114	PRJNA 104148 7	SAMN38 286518	<i>Homo sapiens</i>	2020	2024	Coreia do Sul	D	-
Chr-JH2-2	PRJNA 855326	SAMN29 489200	D	2022	2022	China	D	-

(continua)

CLB215 60	PRJNA 368724	SAMN06 270347	<i>Homo sapiens</i>	2017	2017	EUA	D	-
CQ025	PRJNA 842555	SAMN28 677770	<i>Anser spp.</i>	2021	2022	China	anal	-
CQHNJ2 1-056	PRJNA 932178	SAMN33 180036	D	2021	2024	China	fecal	-
CQHZJ2 1-185	PRJNA 932179	SAMN33 180039	D	2021	2024	China	fecal	-
CQJXZ2 1-076	PRJNA 932180	SAMN33 180040	D	2021	2023	China	fecal	-
CQJXZ2 1-077	PRJNA 932182	SAMN33 180068	D	2021	2023	China	fecal	-
CQNBZ2 1-135	PRJNA 932183	SAMN33 180069	D	2021	2023	China	fecal	-
CVM N48037F	PRJNA 292669	SAMN08 689725	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2013	2019	EUA	D	-
CVM N60443F	PRJNA 292669	SAMN08 689724	<i>Bos taurus</i>	2014	2019	EUA	D	-
D32	PRJNA 169860	SAMN02 603765	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2001	2012	Dina marca	fecal	-
DENG1	PRJNA 187445	SAMN03 081447	<i>Homo sapiens</i>	D	2014	China	D	Leucemia mielocítica
DM01	PRJNA 551907	SAMN12 168219	A/A	2019	2019	Coreia do Sul	alimento	-
DM86	PRJNA 929192	SAMN32 953418	<i>Anas platyrhynchos domesticus</i>	2021	2023	China	D	-
DSM 20478	PRJNA 936091	SAMN33 336514	D	D	2023	D	D	-
E006	PRJNA 755274	SAMN20 824245	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2018	2021	China	D	-
E006xJH 2-2-TC1	PRJNA 755466	SAMN20 825296	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2018	2021	China	D	-
E509	PRJNA 778173	SAMN22 929586	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2015	2021	China	retal	-
E512	PRJNA 778100	SAMN22 929436	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2015	2021	China	D	-
E512- TC1	PRJNA 778189	SAMN22 929935	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2020	2021	China	D	-

(continua)

EGM183	PRJNA 613544	SAMN14 408962	<i>Gallus gallus domesticus</i>	2016	2020	Canadá	fecal	-
ES-1	PRJNA 609523	SAMN14 253864	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2017	2020	China	fecal	-
ES-108-1	PRJNA 103915 9	SAMN38 203341	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2021	2023	Coreia do Sul	fecal	-
ES-109	PRJNA 103915 9	SAMN38 203343	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2021	2023	Coreia do Sul	fecal	-
ES-11	PRJNA 103915 9	SAMN38 203342	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2021	2023	Coreia do Sul	fecal	-
ES-110-1	PRJNA 103915 9	SAMN38 203345	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2022	2023	Coreia do Sul	fecal	-
ES-1276	PRJNA 102304 7	SAMN37 639061	<i>Homo sapiens</i>	2021	2023	Coreia do Sul	urina	ITU
ES-1348	PRJNA 102304 7	SAMN37 639062	<i>Homo sapiens</i>	2022	2023	Coreia do Sul	urina	ITU
ES-1390	PRJNA 102304 7	SAMN37 639063	<i>Homo sapiens</i>	2022	2023	Coreia do Sul	urina	-
ES-2-1	PRJNA 103915 9	SAMN38 203344	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2021	2023	Coreia do Sul	fecal	-
ES-2953	PRJNA 102304 7	SAMN37 639064	<i>Homo sapiens</i>	2022	2023	Coreia do Sul	urina	ITU
ES-3-1	PRJNA 103915 9	SAMN38 203339	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2021	2023	Coreia do Sul	fecal	-
ES-3222	PRJNA 102304 7	SAMN37 639065	<i>Homo sapiens</i>	2022	2023	Coreia do Sul	urina	ITU
ES-397	PRJNA 102304 7	SAMN37 639060	<i>Homo sapiens</i>	2021	2023	Coreia do Sul	urina	ITU
ES-90-2	PRJNA 103915 9	SAMN38 203340	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2021	2023	Coreia do Sul	fecal	-

(continua)

ESC1	PRJNA 921923	SAMN32 638696	D	2018	2023	China	fecal	-
FA2-2	PRJNA 774355	SAMN22 569088	A/A	2021	2022	EUA	ambiente	-
Fac74	PRJNA 778605	SAMN22 965540	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2017	2021	China	D	-
FC	PRJNA 445927	SAMN08 803040	<i>Bos taurus</i>	2017	2019	China	leite	-
FDAAR GOS_32 4	PRJNA 231221	SAMN06 173337	<i>Homo sapiens</i>	2015	2018	EUA	ocular	-
FDAAR GOS_33 8	PRJNA 231221	SAMN06 173351	<i>Homo sapiens</i>	2015	2018	EUA	urina	Catéter contaminado
FDAAR GOS_52 8	PRJNA 231221	SAMN10 163222	<i>Homo sapiens</i>	2016	2018	D	cateter central	-
FDAAR GOS_61 1	PRJNA 231221	SAMN10 346775	A/A	D	2019	EUA	alimento	-
FMAMO B6	PRJNA 604113	SAMN13 955257	<i>Gallus gallus</i>	2012	2022	Alema- nha	coana	-
GENOM IC22-006	PRJNA 938504	SAMN33 438668	A/A	2022	2023	Dina- marca	alimento	-
H25	PRJNA 400682	SAMN07 572761	D	D	2018	Espanha	D	-
HA-1	PRJNA 546453	SAMN11 959349	<i>Homo sapiens</i>	2019	2019	Coreia do Sul	fecal	-
HL1	PRJNA 964481	SAMN34 473392	<i>Homo sapiens</i>	2022	2023	Coreia do Sul	intestino	-
HRH40	PRJNA 104901 7	SAMN38 673172	<i>Homo sapiens</i>	2022	2023	EUA	urina	ITU recorrente
HRH46	PRJNA 104901 7	SAMN39 888444	<i>Homo sapiens</i>	2022	2024	EUA	urina	ITU recorrente
HRH55	PRJNA 104901 7	SAMN38 673182	<i>Homo sapiens</i>	2023	2023	EUA	urina	ITU recorrente
IDRL- 7415	PRJNA 106999 8	SAMN39 634307	<i>Homo sapiens</i>	2005	2024	EUA	fluido	Implante de quadril

(continua)

IDRL-7538	PRJNA 1069998	SAMN39 634308	<i>Homo sapiens</i>	2005	2024	EUA	fluido	Implante de quadril
IDRL-7639	PRJNA 1069998	SAMN39 634309	<i>Homo sapiens</i>	2005	2024	EUA	fluido	Implante de joelho
IDRL-9065	PRJNA 1069998	SAMN39 634310	<i>Homo sapiens</i>	2005	2024	EUA	fluido	Implante de joelho
J-5	PRJNA 1086380	SAMN40 375179	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2022	2024	China	D	-
J-5-A	PRJNA 953762	SAMN34 123084	A/A	2022	2023	China	D	-
JARB-HU0796	PRJDB 14228	SAMD00 521555	<i>Homo sapiens</i>	2021	2023	Japão	pus	-
JF1A-4353	PRJNA 1044769	SAMN38 411963	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2020	2024	Coreia do Sul	D	-
JF1H-454	PRJNA 1044769	SAMN38 411964	<i>Homo sapiens</i>	2020	2024	Coreia do Sul	D	-
JF3A-223	PRJNA 863066	SAMN30 011706	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2020	2023	Coreia do Sul	retal	-
JF3A-4253	PRJNA 863070	SAMN30 011847	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2020	2022	Coreia do Sul	retal	-
JF3A-4314	PRJNA 1041487	SAMN38 286512	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2020	2024	Coreia do Sul	D	-
JF4A2234	PRJNA 1009599	SAMN37 158604	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2022	2023	Coreia do Sul	retal	-
JF4A-2234	PRJNA 1041487	SAMN38 286513	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2020	2024	Coreia do Sul	D	-
JF4H-114	PRJNA 1024047	SAMN37 687441	<i>Homo sapiens</i>	2020	2023	Coreia do Sul	retal	-
JF4H-224	PRJNA 1041487	SAMN38 286519	<i>Homo sapiens</i>	2020	2024	Coreia do Sul	D	-
JY32	PRJNA 576338	SAMN12 990710	<i>Homo sapiens</i>	2016	2020	China	fecal	-

(continua)

K137-1a	PRJNA 783265	SAMN23 424516	<i>Bos taurus</i>	2021	2023	Suíça	fecal	-
K188-1	PRJNA 783265	SAMN23 424514	<i>Bos taurus</i>	2021	2023	Suíça	fecal	-
K190-1	PRJNA 783265	SAMN23 424511	<i>Bos taurus</i>	2021	2023	Suíça	fecal	-
K191-1	PRJNA 783265	SAMN23 424513	<i>Bos taurus</i>	2021	2023	Suíça	fecal	-
K194-1	PRJNA 783265	SAMN23 424517	<i>Bos taurus</i>	2021	2023	Suíça	fecal	-
K198-1	PRJNA 783265	SAMN23 424512	<i>Bos taurus</i>	2021	2023	Suíça	fecal	-
K205-3	PRJNA 783265	SAMN23 424510	<i>Bos taurus</i>	2021	2023	Suíça	fecal	-
K-4	PRJDB 12421	SAMD00 412537	A/A	D	2021	Tailân- dia	alimento	-
K70-12a	PRJNA 783265	SAMN23 424518	<i>Bos taurus</i>	2021	2023	Suíça	fecal	-
K72-1	PRJNA 783265	SAMN23 424515	<i>Bos taurus</i>	2021	2023	Suíça	fecal	-
K80-2b	PRJNA 783265	SAMN23 424519	<i>Bos taurus</i>	2021	2023	Suíça	fecal	-
KB1	PRJNA 317592	SAMN04 621616	<i>Mus musculus</i>	2015	2017	Suíça	organismo inteiro	-
KS2H- 124	PRJNA 104476 9	SAMN38 411965	<i>Homo sapiens</i>	2021	2024	Coreia do Sul	D	-
KS3H- 124	PRJNA 104476 9	SAMN38 411966	<i>Homo sapiens</i>	2021	2024	Coreia do Sul	D	-
KUB300 6	PRJDB 6823	SAMD00 113788	<i>Homo sapiens</i>	2017	2018	Japão	urina	-
KUB300 7	PRJDB 6823	SAMD00 113789	<i>Homo sapiens</i>	2017	2018	Japão	urina	-
L11	PRJNA 352597	SAMN17 615183	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2013	2021	Brasil	retal	-
L13	PRJNA 352597	SAMN18 062968	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2013	2021	Brasil	retal	-
L18	PRJNA 352597	SAMN18 063036	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2013	2021	Brasil	retal	-

(continua)

L6D	PRJDB 15240	SAMD00 577373	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2021	2023	Japão	fecal	-
L8	PRJNA 352597	SAMN12 272102	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2013	2021	Brasil	retal	-
LD33	PRJNA 316564	SAMN04 585513	A/A	2010	2016	China	D	-
LJX 0909	PRJNA 810760	SAMN26 281488	D	2022	2022	China	tecido	-
LS05-1	PRJNA 833940	SAMN28 025469	A/A	2022	2022	Suíça	alimento	-
LS05-2	PRJNA 833940	SAMN28 025470	A/A	2022	2022	Suíça	alimento	-
LS06-1	PRJNA 833940	SAMN28 025471	A/A	2022	2022	Suíça	alimento	-
M61	PRJNA 846573	SAMN32 023589	<i>Gallus gallus domesticus</i>	2021	2022	China	D	-
M817	PRJNA 752808	SAMN20 607820	<i>Homo sapiens</i>	2019	2022	China	fluido drenado	Uremia
M9	PRJNA 846573	SAMN28 891356	A/A	2021	2022	China	fecal	-
MGYG- HGUT- 01694	PRJEB 33885	SAMEA 5851198	<i>Homo sapiens</i>	D	2019	D	intestino	-
N23- 3408	PRJNA 107636 2	SAMN39 939912	<i>Homo sapiens</i>	2023	2024	Suíça	urina	-
N4E	PRJDB 15240	SAMD00 577375	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2021	2023	Japão	fecal	-
N775_P C2	PRJNA 863576	SAMN30 050172	<i>Homo sapiens</i>	D	2023	França	intestino	-
N775_P C7	PRJNA 863576	SAMN30 050173	<i>Homo sapiens</i>	D	2023	França	intestino	-
NCTC87 32	PRJEB 6403	SAMEA 3614265	D	D	2019	D	D	-
NCTC87 45	PRJEB 6403	SAMEA 1046663	D	D	2018	D	D	-
NS2	PRJNA 743738	SAMN20 059107	A/A	2019	2021	China	água	-
NY1332 1	PRJNA 817327	SAMN26 754979	<i>Homo sapiens</i>	D	2022	China	D	-

(continua)

NY1341 0	PRJNA 883536	SAMN30 967739	<i>Homo sapiens</i>	2019	2023	China	cateter	Síndrome da angústia respiratória do recém- nascido
NY1341 2	PRJNA 882356	SAMN30 932864	<i>Homo sapiens</i>	2020	2023	China	hidrotórax	Pneumonia intersticial
OG1RF	PRJNA 20843	SAMN02 603002	D	D	2011	D	D	-
PartL- Efaecalis -RM8376	PRJNA 605254	SAMN14 078803	D	D	2022	D	D	-
PC15	PRJNA 934396	SAMN33 929497	<i>Mus musculus</i>	2017	2024	EUA	microbiota intestinal	-
PCH555	PRJNA 794021	SAMN24 600170	D	2021	2022	China	fecal	-
QZ076	PRJNA 842552	SAMN28 677694	<i>Gallus gallus domesticus</i>	2021	2022	China	fecal	-
R5	PRJNA 777728	SAMN22 871634	A/A	2021	2021	China	água	-
R712	PRJNA 523028	SAMN10 962800	<i>Homo sapiens</i>	D	2019	Colômbi a	sangue	-
RE25	PRJNA 983989	SAMN35 741683	A/A	1991	2023	Suíça	alimento	-
RF_1_1_ 25_1	PRJNA 590637	SAMN13 336268	<i>Rhodnius prolixus</i>	2019	2022	Repúbli ca Tcheca	fecal	-
S11-6	PRJNA 774104	SAMN23 424485	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2021	2022	Suíça	fecal	-
S39-4	PRJNA 774104	SAMN23 424484	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2021	2022	Suíça	fecal	-
SF28073	PRJNA 659221	SAMN15 900780	D	2003	2020	EUA	urina	-
SGAir03 97	PRJNA 388547	SAMN11 388367	A/A	2015	2019	Singapu ra	ar	-
SJ82	PRJNA 874495	SAMN30 551391	<i>Homo sapiens</i>	2018	2022	Banglad esh	urina	ITU
SN21-3	PRJNA 103732 8	SAMN38 169127	<i>Gallus gallus domesticus</i>	2019	2023	China	D	-
sorialis	PRJNA 318633	SAMN04 859054	<i>Mus musculus</i>	2014	2017	EUA	fecal	Doença hepática

(continua)

SVJ-EF01	PRJNA 901658	SAMN31 723118	<i>Homo sapiens</i>	2022	2023	Índia	urina	Glomerulonefrite crescêntica pauci-imune (PICGN)
SVR2330	PRJDB 14106	SAMD00 520112	<i>Homo sapiens</i>	2017	2023	Japão	D	-
SY-1	PRJNA 742506	SAMN19 958212	<i>Capra aegagrus hircus</i>	2019	2021	China	fecal	-
Symbiofl or 1	PRJEB 648	SAMEA 2272087	D	2013	2012	Reino Unido	D	-
T30	PRJNA 846573	SAMN32 023558	<i>Gallus gallus domesticus</i>	2021	2022	China	conteúdo digestivo	-
T90-1	PRJNA 688146	SAMN17 169733	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2019	2021	China	D	-
TH4125	PRJNA 594846	SAMN13 536105	<i>Homo sapiens</i>	D	2020	China	urina	-
TK-P4B	PRJNA 579198	SAMN13 106281	A/A	2019	2020	China	probióticos	-
TM6294	PRJEB 36950	SAMEA 6595200	<i>Homo sapiens</i>	2017	2021	Reino Unido	urina	Doente
TY1	PRJNA 480550	SAMN09 640605	<i>Pleuronectoi dei spp.</i>	2011	2018	Coreia do Sul	tecido	-
UAMS_EL53	PRJNA 735268	SAMN19 573779	<i>Homo sapiens</i>	2019	2022	EUA	sangue	-
UAMS_EL54	PRJNA 735268	SAMN19 573780	<i>Homo sapiens</i>	2019	2022	EUA	sangue	-
UAMS_EL56	PRJNA 735268	SAMN19 573781	<i>Homo sapiens</i>	2019	2022	EUA	sangue	-
UK045	PRJNA 779589	SAMN25 117697	<i>Homo sapiens</i>	2018	2022	Alemanha	fecal	-
UO.H3019	PRJNA 1055583	SAMN39 462675	<i>Homo sapiens</i>	2020	2024	Tunísia	microbiota intestinal	-
V583	PRJNA 70	SAMN02 603978	D	D	2003	D	D	-
VE14089	PRJNA 532354	SAMN11 397621	<i>Homo sapiens</i>	2004	2019	França	sangue	-
VE18379	PRJNA 532354	SAMN11 415942	<i>Homo sapiens</i>	2015	2019	França	D	-
VE18395	PRJNA 532354	SAMN11 416928	<i>Homo sapiens</i>	2016	2019	França	D	-

(continua)

VRE-WC031	PRJNA 808078	SAMN26 026624	<i>Homo sapiens</i>	2004	2022	EUA	retal	ITU
VSE-WC032	PRJNA 808078	SAMN26 026625	<i>Homo sapiens</i>	2004	2022	EUA	retal	ITU
VSI48	PRJNA 934404	SAMN33 275456	<i>Homo sapiens</i>	2021	2023	EUA	vaginal	-
W11	PRJDB 5023	SAMD00 056606	<i>Undaria pinnatifida</i>	D	2016	Japão	alimento	-
W5	PRJNA 936600	SAMN33 357555	A/A	2021	2023	China	esgoto	-
WE0254	PRJEB 36950	SAMEA 6595198	<i>Homo sapiens</i>	2015	2021	Reino Unido	urina	-
WE0438	PRJEB 36950	SAMEA 6595199	<i>Homo sapiens</i>	2016	2016	Coreia do Sul	urina	ITU
WE0851	PRJEB 36950	SAMEA 6595197	<i>Homo sapiens</i>	2014	2021	Reino Unido	urina	Doente

Nota: A/A – Amostra de origem ambiental ou alimentar; D – desconhecido; EUA – Estados Unidos da América; ITU – Infecção do Trato Urinário.

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

APÊNDICE B

Tabela B.1 - Frequência absoluta e relativa dos 65 genes de resistência identificados nas 267 amostras avaliadas com critério de mínimo de 70% de identidade

Gene	Frequência absoluta (n/267)	Frequência relativa (%)
<i>emeA</i>	267	100,00%
<i>dfrE</i>	267	100,00%
<i>lsaA</i>	267	100,00%
<i>efrA</i>	267	100,00%
<i>ireK</i>	267	100,00%
<i>dfrG</i>	74	27,72%
<i>optrA</i>	78	29,21%
<i>fexA</i>	78	29,21%
<i>ErmA</i>	46	17,23%
ANT(9)-Ia	25	9,36%
<i>tet(M)</i>	187	70,04%
<i>tet(L)</i>	87	32,58%
<i>catA8</i>	69	25,84%
APH(3')-IIIa	103	38,58%
<i>ErmB</i>	154	57,68%
AAC6_Ie_APH2_Ia	84	31,46%
<i>ANT(4')-Ia</i>	5	1,87%
<i>dfrC</i>	2	0,75%
<i>cfrA</i>	8	3,00%
<i>cfr(D)</i>	18	6,74%
<i>poxA</i>	22	8,24%
SAT-4	86	32,21%
<i>aad(6)</i>	86	32,21%

(continua)

<i>lnuB</i>	40	14,98%
<i>lsaE</i>	40	14,98%
ANT(6)-Ia	56	20,97%
ANT(9)-Ib	1	0,37%
<i>lnuG</i>	12	4,49%
<i>dfrF</i>	11	4,12%
<i>vanX_in_vanB_cl</i>	5	1,87%
<i>vanB</i>	5	1,87%
<i>vanH_in_vanB_cl</i>	5	1,87%
<i>vanW_in_vanB_cl</i>	5	1,87%
<i>vanY_in_vanB_cl</i>	5	1,87%
<i>vanS_in_vanB_cl</i>	5	1,87%
<i>vanR_in_vanB_cl</i>	5	1,87%
Efae_ACT_CHL	6	2,25%
<i>vanZ_in_vanA_cl</i>	10	3,75%
<i>vanY_in_vanA_cl</i>	10	3,75%
<i>vanX_in_vanA_cl</i>	10	3,75%
<i>vanA</i>	10	3,75%
<i>vanH_in_vanA_cl</i>	9	3,37%
<i>vanS_in_vanA_cl</i>	10	3,75%
<i>vanR_in_vanA_cl</i>	9	3,37%
<i>tet(O)</i>	1	0,37%
<i>tet(S)</i>	9	3,37%
<i>fexB</i>	13	4,87%
<i>lnuE</i>	4	1,50%
<i>qacH</i>	3	1,12%
<i>clcD</i>	2	0,75%
<i>FosB3</i>	3	1,12%

(continua)

<i>tet(O/W/32/O)</i>	5	1,87%
<i>patA</i>	2	0,75%
<i>dfrD</i>	1	0,37%
<i>vatE</i>	1	0,37%
ANT(6)-Ib	1	0,37%
<i>apmA</i>	1	0,37%
<i>mef(H)</i>	1	0,37%
<i>vanX_in_vanD_cl</i>	1	0,37%
<i>vanD</i>	1	0,37%
<i>vanH_in_vanD_cl</i>	1	0,37%
<i>vanR_in_vanD_cl</i>	1	0,37%
<i>tet(32)</i>	1	0,37%
<i>lmuC</i>	1	0,37%
<i>lmrD</i>	1	0,37%

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

APÊNDICE C

Tabela C.1 - Frequência absoluta e relativa dos 48 genes de virulência identificados nas 267 amostras avaliadas com critério de mínimo de 70% de identidade

Gene	Frequência absoluta (n/267)	Frequência relativa (%)
<i>bopD</i>	267	100,00
<i>clpP</i>	267	100,00
<i>cpsA/uppS</i>	267	100,00
<i>cpsB/cdsA</i>	267	100,00
<i>ebpA</i>	267	100,00
<i>ebpB</i>	267	100,00
<i>ebpC</i>	267	100,00
<i>efaA</i>	267	100,00
<i>gndA</i>	267	100,00
<i>hasC</i>	267	100,00
<i>srtC</i>	267	100,00
<i>tufA</i>	267	100,00
<i>ace</i>	262	98,13
EF3023	220	82,40
<i>gelE</i>	219	82,02
<i>sprE</i>	219	82,02
<i>fsrC</i>	218	81,65
<i>lap</i>	210	78,65
EF0818	170	63,67
<i>bsh</i>	162	60,67
<i>fsrA</i>	162	60,67
<i>fsrB</i>	162	60,67
<i>cpsC</i>	126	47,19
<i>cpsD</i>	126	47,19
<i>cpsE</i>	126	47,19
<i>cpsG</i>	126	47,19
<i>cpsH</i>	126	47,19
<i>cpsI</i>	126	47,19
<i>cpsJ</i>	126	47,19
<i>cpsK</i>	126	47,19
<i>psaA</i>	109	40,82
<i>prgB/asc10</i>	98	36,70

(continua)

<i>esp</i>	96	35,96
<i>cpsF</i>	90	33,71
<i>ecbA/fss3</i>	89	33,33
<i>cylI</i>	88	32,96
EF0485	87	32,58
<i>cylB</i>	84	31,46
<i>cylM</i>	84	31,46
<i>cylS</i>	83	31,09
<i>cylL</i>	82	30,71
<i>cylR1</i>	82	30,71
<i>cylR2</i>	80	29,96
<i>cylA</i>	78	29,21
<i>asa1</i>	52	19,48
EF0149	26	9,74
<i>cap8E</i>	7	2,62
<i>ctrA</i>	1	0,37

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

APÊNDICE D

Tabela D.1 - Presença ou ausência de genes de virulência baseada no limite mínimo de 70% de identidade

Gene	S77_1	S77_2	S61_2
<i>efaA</i>	✓	✓	✓
<i>cpsB/cdsA</i>	✓	✓	✓
<i>cpsA/uppS</i>	✓	✓	✓
<i>clpP</i>	✓	✓	✓
<i>fsrA</i>	✓	✓	✓
<i>fsrB</i>	✓	✓	✓
<i>fsrC</i>	✓	✓	✓
<i>gelE</i>	✓	✓	✓
<i>sprE</i>	✓	✓	✓
<i>hasC</i>	✓	✓	✓
<i>tufA</i>	✓	✓	✓
<i>Ace</i>	✓	✓	✓
<i>srtC</i>	✓	✓	✓
<i>ebpC</i>	✓	✓	✓
<i>ebpB</i>	✓	✓	✓
<i>ebpA</i>	✓	✓	✓
<i>bopD</i>	✓	✓	✓
<i>gndA</i>	✓	✓	✓
EF3023	✓	✓	✓
<i>lap</i>	✓	✓	✓
EF0818	✓	✓	✓
<i>asa1</i>	✓	x	✓

Nota: A presença do gene está marcada com um ✓ e a ausência com um x.

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

ANEXO A

Tabela Anx.A.1 - Testes bioquímicos e morfológicos das três amostras deste trabalho

Identificação da amostra				Testes morfológicos			Testes bioquímicos						
ID	Família	Espécie	Local de Coleta	Meio	Mucoide/seca	Gram	Catalase	Oxidase	GOF	SIM	SIM motilidade	SIM indol	TSI
S61_2	Roedor	<i>Galea spixii</i>	otológico	MacConkey	Mucoide	Positiva	Positiva	Negativa	Oxidativa	Vermelho	-	+	Ac-Ac
S77_1	Marsupial	<i>Didelphis albiventris</i>	retal	XLD	Mucoide	Positiva	Positiva	Negativa	Oxidativa	Amarelo	+	-	Ac-Ac S/h2s
S77_2	Marsupial	<i>Didelphis albiventris</i>	retal	MacConkey	Mucoide	Negativa	Negativa	Negativa	Fermentativo	Amarelo	+	-	Ac-Ac S/h2s

Nota: GOF - Glicose-Oxidação-Fermentação; SIM - Sulfureto-Indol-Motilidade; TSI - *Triple Sugar Iron*.

Fonte: Adaptado pela autora a partir de dados fornecidos pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, comunicação pessoal, 2023.