

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Samir de Deus Elian Andrade

TESE DE DOUTORADO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA
DE AMOSTRAS CLÍNICAS E INDÍGENAS DE *Enterococcus*
ISOLADAS DE SERES HUMANOS: DIVERSIDADE, VIRULÊNCIA E
RESISTÊNCIA A DROGAS ANTIMICROBIANAS**

**Belo Horizonte
2018**

Samir de Deus Elian Andrade

TESE DE DOUTORADO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA
DE AMOSTRAS CLÍNICAS E INDÍGENAS DE *Enterococcus*
ISOLADAS DE SERES HUMANOS: DIVERSIDADE, VIRULÊNCIA E
RESISTÊNCIA A DROGAS ANTIMICROBIANAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia)

ORIENTADORA

Prof.a Paula Prazeres Magalhães

COORIENTADORES

Prof. Luiz de Macêdo Farias
Prof.a Simone Gonçalves dos Santos

**Belo Horizonte
2018**

COLABORAÇÃO

Natália Rocha Guimarães, M.Sc.

Sílvia Helena Pietra Pedroso, M.Sc.

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG

Prof.a Ana Lúcia da Costa Darini

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP

Prof.a Lúcia Martins Teixeira

Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde, UFRJ

Prof. Álvaro Cantini Nunes

Sávio Henrique de Cicco Sandes, M.Sc.

Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG

Prof. José Carlos Serufo

Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, UFMG

APOIO FINANCEIRO



À Paula

Ao Matheus

*– sem o apoio de vocês,
eu não teria conseguido.*

À Nati

*– não tenho palavras para
te agradecer por tudo.*

AGRADECIMENTOS

E foram quatro anos... Quatro anos difíceis e bastante puxados... Quatro anos cheios de reviravoltas... Quatro anos que me fizeram chorar e rir muito... Quatro anos de aprendizagem... aprendizagem profissional e de vida...

E para conseguir passar por esses altos e baixos, aprender tudo que aprendi eu precisei de ajuda, muita ajuda. Pessoas que embarcaram nessa jornada louca comigo. Pessoas que me apoiaram e me confortaram quando precisei. Pessoas que acreditaram em mim quando eu mesmo não acreditava. Pessoas que me fizeram ver o mundo de um jeito diferente. Pessoas que me deixaram com os olhos cheios de lágrimas (mas de felicidade).

É a todos vocês que eu agradeço agora – e sei, que sempre que fazemos isso nominalmente, incorremos no risco de omitir alguém, ainda que não intencionalmente. Mesmo assim eu vou me arriscar:

Primeiramente quero agradecer à banca. Começando de pertinho, **Prof. Jacques Nicoli** e **Profa. Regina Nardi**, é com muito carinho e felicidade que recebo as críticas e sugestões! Vocês foram meus primeiros orientadores, me ensinaram muito! Acompanharam minha trajetória desde o início, quando, em 2007, iniciei minha iniciação científica, até agora, na defesa do meu doutorado! **Profa. Márcia Lana** e **Dr. Ricardo Dias** muito obrigado pela disponibilidade de avaliarem esse trabalho e contribuírem com toda a experiência que vocês têm na área de microbiologia! **Dra. Mireille Sousa**, obrigado pela participação na banca do projeto e da qualificação que originaram este trabalho; sua experiência na área de microbiologia clínica e suas considerações foram muito importantes!

Cheguei no MOA bem tímido, ainda escrevendo meu projeto, no segundo semestre de 2013. Eu não imaginava que seria tão bem recebido, que encontraria tanta gente legal, tanta gente disposta a ajudar. O MOA é uma família... Eu vi, ao longo desses anos, que a gente chamar nossos orientadores de mãe e pai (científicos) e nossos ICs de filhos (científicos) não é algo leviano: é sincero!

Agradeço a você, **Profa. Paula Magalhães**, por ter me aceitado como aluno quando a procurei em meados de 2013 para iniciar o doutorado. O carinho com o qual fui recebido naquele momento é o mesmo que sinto até hoje. Ainda me recordo, hoje achando engraçado, o medo eu sentia quando precisava ir até sua sala para te perguntar alguma coisa – medo injustificado que até hoje não consigo explicar. Obrigado também pelos abraços acolhedores, por ouvir minhas lamentações e pelo conforto quando as lágrimas não quiseram ficar guardadas. Obrigado pelo apoio! Obrigado pela confiança e obrigado por compartilhar seu conhecimento, seu tempo e sua experiência comigo. Você é um exemplo que eu quero seguir na minha vida profissional. =)

Prof. Luiz Macêdo, você me acolheu junto com a Paula, com muito carinho no lab. Escutar suas histórias é sempre um momento para aprendermos um pouco mais, seja sobre a história do nosso laboratório, do nosso departamento, da própria microbiologia. Seus ensinamentos e sugestões (e você sempre tem algo a contribuir!) com certeza fizeram de mim um profissional melhor. Muito obrigado!

Profa. Simone Santos, obrigado por compartilhar sua experiência, pelos ensinamentos, pelo carinho e por ceder parte das amostras que utilizamos para realizar este trabalho.

Família MOA (atuais e ex-MOAs – incluindo os ex-MOAs que já eram ex-MOAs quando eu entrei no lab.) eu tenho muito a agradecer a vocês. A lista é grande, mas merece ser citada: André Leal, Anna Gabriella Guimarães, Augusto Sette Dias (obrigado pelas conversas, pelas caronas e pelo armário

gigante que eu herdei), Carolina Peconick, Cássia Lopes, Cristina Vieira, Débora Calefi, Deborah Leroy, Desielle Matos (minha afilhada!), Diego Marquioli, Gabriel, Giselle Andrade, Jade Scarpelli, Jaqueline Moreira, Jéssica Távora, João Fernando, Kelly Grillo, Luciana Nery, Marcela Braga, Marcela Menezes, Marcella de Paula, Mariana Nunes, Maria Gabriela, Mariana Moreira, Matheus Ramalho, Mirna Moreira, Patrícia Campos, Priscila Costa, Rafaela França, Renata Fonseca, Silvia Pietra, Síntia Evangelista, Thaysa Tagliaferri e Vanessa Guimarães!!

Ainda não acabou...

Tive dois filhos no MOA... duas pessoas que me encheram de orgulho e que me ajudaram muito! **Amanda Borges**, minha filha preferida, e **Gustavo Antunes**, meu filho preferido, espero que o período que vocês passaram como meus ICs tenha sido um período de grande ajuda e que tenha contribuído para que vocês alcancem sonhos maiores!

Acho que palavras não serão nunca suficientes para agradecer à **Natalia Guimarães**. Nati, muito, muito, MUITO obrigado por toda a ajuda (que não foi pouca!) com as PCRs, pelo carinho (dentro e fora do MOA) e pela disponibilidade que você sempre teve! Espero poder retribuir à altura – conte comigo!

Patrícia Oliveira... que me recebeu de braços abertos no lab., que me ensinou quase tudo o que sei de PCR, que me deu um ombro amigo quando precisava chorar, que me escutou quando precisei (seja para discutir assuntos do lab., do meu projeto, da vida e do trabalho), que é minha irmãzinha de lab. e da vida! Obrigado, irmãzinha pela amizade e o carinho de sempre!!!

Mariana Vaz, como eu sinto saudades dos nossos lanches na FACE, nossas caminhadas, conversas e saídas, que além de terem servido para aliviar os momentos de tensão, foram muito importantes para nos mantermos firme e aguentarmos tudo!

Nesses 10 anos no departamento de microbiologia, muita gente passou na minha vida. **Marliete Carvalho, Vanessa Vieira e Rafael Bastos**, vocês foram e são pessoas muito importantes para mim. Vocês sabem disso! Obrigado imensamente!

Nos últimos dois anos do doutorado, minha vida mudou completamente quando consegui um emprego. Tenho que agradecer às pessoas que estiveram ao meu lado no **departamento de fisiologia e biofísica** (profa. Sílvia Guatimosim, profa. Maristela Poletini, Silvio, Claudiomar, Rodner, Cintya, Bruno, Kelly, Vanessa, Nayara, Cássio, Zezé, Taquinho, Carmen, Carol, Fernanda Luiza, Gi, Mônica, Elaine e Alessa). E, também, às pessoas queridas dos **diferentes setores do ICB** (Fernanda Barroso, Ludmila Mendonça, Samuel Rocha, Kayla Veruska, Janaína Edwiges, Rinaldo, Natalia Katley, Nayane, Sumara, Creuza Carvalhaes, Jacque, Gilvânia, Tânia Mara). **Cláudia Cunha** e **Simone Pio**, obrigado pelo carinho, por me acolherem e me escutarem e por me aconselharem; obrigado por terem entrado na minha vida e dividirem comigo não só a salinha, mas momentos de vida!

Aos amigos da graduação, mas que estão comigo até hoje, acompanhando e compartilhando alegrias, angústias, dúvidas e muito carinho. **Vanessa Cappelle, Sarah Siqueira, Marianna Kunrath, Uschi Wischhoff e Bruno Ferreira**, muito obrigado!

Agradeço aos **cidadãos brasileiros** que com seus impostos nos fornecem, por meio das **agências financiadoras** (CAPES, FAPEMIG e CNPq), condições para realizarmos esse trabalho e à CAPES pela bolsa que recebi durante parte do meu doutorado.

Aos amigos do peito e longa data, **Alice, Vinicius, Jéssica e Amanda**: a rotina da vida adulta chegou, levou cada um de nós para um caminho diferente. Hoje moramos longe, temos uma vida corrida e

quase não conseguimos nos encontrar, mas meu carinho por vocês continua o mesmo. Obrigado por estarem sempre aí quando eu precisei!

Aos **amigos “refugiados”**, que eu sei que sempre posso contar minhas angústias e receber conselhos sinceros, sem ser julgado por isso. Bárbara Miranda, Franciele Koehler Alves, Henrique Inoue, Julia Meira, Luan Henriques, Tauana Nagy e Diego Matioli, obrigado por me acolherem e me ajudarem a ver as coisas de um outro jeito – e desculpa por não estar tão presente como eu gostaria.

Matheus Silva, você surgiu do nada na minha vida e em muito pouco tempo deixou uma marca tão grande que não tem mais jeito de apagar. Nesses quase quatro anos, seu apoio foi sempre fundamental. Obrigado! Muito obrigado! Sem você eu teria desistido e não teria conseguido chegar aonde cheguei.

Samuel Andrade, apesar das diferenças, eu sei sempre posso contar com você! Obrigado pelo carinho e o apoio constantes!

Deixo, por fim, o meu agradecimento às pessoas que são as mais importantes na minha vida:

Mamãe (Eliana) e Papai (Juarez), vocês são meu exemplo de vida. Vocês não só me deram a vida, mas me ensinaram a trilhar meu próprio caminho. Vocês sempre e incondicionalmente me apoiaram, mesmo quando a minha decisão não era exatamente a que vocês julgavam a mais acertada. Esses momentos e o apoio de vocês sempre foram muito importantes para eu aprender e ser uma pessoa melhor. Obrigado, também, por festejarem meus momentos de alegria, por compreenderem os momentos de desânimo, por estarem sempre com um colo disponível e por colocarem as minhas prioridades muitas vezes na frente das de vocês. Agradecimentos nunca serão suficientes!

Sim... muita gente me ajudou a conseguir apresentar este trabalho finalizado. Foram vários tipos de ajuda e todas elas muito importantes! É por isso que guardei este lugarzinho aqui, com muito carinho, para agradecer a vocês por tudo!

Obrigado!

Muito obrigado!

*“O que sabemos é uma gota;
o que ignoramos é um oceano.”*

Isaac Newton

RESUMO

Os representantes do gênero *Enterococcus* são membros da microbiota intestinal indígena de seres humanos e outros animais, mas têm emergido como patógenos nosocomiais de crescente importância, devido a diversas propriedades como persistência no ambiente, fácil disseminação e resistência a antimicrobianos. São intrinsecamente resistentes a diversas classes de drogas antimicrobianas e possuem capacidade notável para adquirir marcadores adicionais de resistência. Nos últimos anos, a frequência de infecções da corrente sanguínea (ICS) vem aumentando, sendo as maiores taxas de mortalidade associadas à participação de espécies de *Enterococcus*. Além disso, o grupo é frequentemente associado a infecções do trato urinário (ITU) comunitárias. Assim, o estudo da patogenicidade e do perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobianas pode contribuir para o controle do microrganismo. Neste trabalho, identificamos no nível de espécie, avaliamos fenotípica e genotipicamente traços de virulência e suscetibilidade a drogas antimicrobianas de 103 amostras de *Enterococcus* isoladas de indivíduos saudáveis (n=33), com ITU comunitária (n=35) e de pacientes hospitalizados com ICS (n=35). Observamos, nas amostras indígenas (indivíduos saudáveis) a predominância da espécie *E. faecium*, enquanto nos grupos ITU e ICS, *E. faecalis* foi predominante. Por meio da tipagem por (GTG)5-PCR, as amostras foram agrupadas em cinco diferentes clusters (similaridade de 90%), com relativa eficiência em agrupar as amostras de acordo com a origem. Cerca de 40% das amostras clínicas (ITU e ICS) foram capazes de produzir a enzima gelatinase e cerca de 30% (ITU) e 40% (ICS) de produzir citolisina - apenas oito das 103 amostras do estudo expressaram ambas as enzimas. A produção de biofilme foi avaliada e a maioria das amostras foi classificada como não produtora, mas, observou-se que as amostras do grupo ITU apresentaram as maiores taxas de produção (cerca de 50%). A suscetibilidade a diferentes antimicrobianos foi avaliada e considerando-se todas as amostras do estudo, cerca de 70% dos testes de antibiograma identificaram amostras sensíveis; o grupo ICS, no entanto, apresentou resistência em quase 50% de seus testes. As maiores taxas de sensibilidade (> 90%) foram observadas para ampicilina (AMP), linezolina (LZD) e penicilina G (PEN). Já as maiores taxas de resistência foram detectadas para ciprofloxacino (CIP, 62%), eritromicina (ERI, 77%) e tetraciclina (TET, 45%). Das 103 amostras, cinco foram classificadas como sensíveis, 24 amostras como VRE e 46 como multidroga-resistentes. Não observamos a presença de *integrons* de classe 1 ou 2 nas amostras. Dessa forma, concluímos que há uma diferença clara na prevalência das espécies, perfil de patogenicidade e resistência entre os grupos de amostras de *Enterococcus* analisados. Além disso, detectamos a predominância de sensibilidade à AMP, LZD e PEN, bem como de resistência CIP, ERI e TET em todos os grupos.

Palavras-chave: *Enterococcus*, virulência, resistência a antimicrobianos.

ABSTRACT

Enterococci are members of the indigenous intestinal microbiota of human beings and other animals but have been emerged as nosocomial pathogens of growing relevance due to several properties such as persistence in hospital environment, easy dissemination, and resistance to several antimicrobial agents. They are intrinsically resistant to several antimicrobial drugs and demonstrate prowess to acquire additional resistance markers. In the last years, increasing frequency of bloodstream infections (BSI) has been observed and those associated with *Enterococcus* spp. seem to display higher mortality rates. They are also associated to community urinary tract infection (UTI). Thus, data generated from the analysis of pathogenicity and antimicrobial susceptibility profile may support the control of the microorganism spread. In this investigation, we addressed the identification and evaluated phenotypically and genotypically pathogenicity traits and the susceptibility profile to antimicrobial drugs of 103 enterococci strains isolated from 3 groups: healthy individuals (HI; n=33), UTI (n=35), and BSI (n=35). We observed the predominance of *E. faecium* in HI, although in UTI and BSI groups, *E. faecalis* was the predominant species. Typing the isolates by (GTG)₅-PCR and using 90% similarity generated five different clusters, with relative efficiency in grouping the isolates according to their origin. Almost 40% of the clinical isolates (UTI and BSI) were able to produce gelatinase and almost 30% (UTI) e 40% (BSI) produced citolysin - only eight of the 103 samples expressed both enzymes. Biofilm production was assessed, and the majority of the strains were classified as non-producers, but the UTI group showed approximately 50% of producer isolates. Susceptibility test to different antimicrobial drugs were performed and considering all the studied isolates, almost 70% of the tests were classified as susceptible; it should be highlighted that in the BSI group, almost 50% of the tests showed resistance. The higher susceptibility rates (>90%) were observed to ampicillin (AMP), linezolid (LZD), and penicillin G (PEN) and the higher resistance rates were observed to ciprofloxacin (CIP, 62%), erythromycin (ERI, 77%), and tetracycline (TET, 45%). We also observed that, five among the 103 studied isolates were classified as susceptible, 24 as VRE, and 46 as multidrug-resistant. We did not observe the presence of class 1 or 2 *integrons* in the studied strains. Therefore, the result showed a notable difference in the prevalence of enterococci species, pathogenicity and resistance profile among the three studied groups. Furthermore, we detected a predominance of susceptibility to AMP, LZD, and PEN, as well as resistance to CIP, ERI, and TET in all groups.

Keywords: *Enterococcus*, virulence, antimicrobial resistance.

LISTA DE FIGURAS

	p.
Figura 1 - Efeitos da administração de drogas antimicrobianas na microbiota intestinal e emergência de VRE (<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina).	21
Figura 2 - Principais rotas de transmissão nosocomial de VRE (<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina).	22
Figura 3 - Modelo de expressão, maturação, secreção e ativação da citolisina em <i>Enterococcus faecalis</i> .	28
Figura 4 - Comunicação mediada por feromônio sexual entre células doadora e receptora de plasmídeo	32
Figura 5 - Estrutura básica de um <i>integron</i> de classe 1.	34
Figura 6 - Identificação genotípica de <i>Enterococcus</i> no nível de espécie.	53
Figura 7 - Prevalência das espécies de <i>Enterococcus</i> .	54
Figura 8 - Exemplos representativos da presença e ausência de produção da enzima gelatinase em ágar nutriente acrescido de 3% de gelatina.	55
Figura 9 - Exemplos representativos de amostras α -, β - e não hemolíticas identificadas em ágar sangue (TSA + 5% de sangue de cavalo).	55
Figura 10 - Distribuição das amostras de <i>Enterococcus</i> de acordo com a habilidade de produção da enzima gelatinase.	57
Figura 11 - Distribuição das amostras de <i>Enterococcus</i> como não-hemolíticas ou como amostras capazes de produzir α - ou β -hemólise.	57
Figura 12 - Distribuição da classificação das espécies de <i>Enterococcus</i> em relação à capacidade de produção de biofilme.	58
Figura 13 - Frequência da distribuição dos genes de patogenicidade nas amostras de <i>Enterococcus</i> .	59
Figura 14 - Frequência da distribuição da quantidade de genes de patogenicidade identificado nas amostras.	60
Figura 15 - Frequências relativas e total dos diferentes perfis de suscetibilidade das amostras de <i>Enterococcus</i> frente aos antimicrobianos testados.	63
Figura 16 - Frequência de resistência, resistência intermediária ou suscetibilidade das amostras de <i>Enterococcus</i> a cada um dos antimicrobianos testados.	64
Figura 17 - Distribuição das amostras de <i>Enterococcus</i> de acordo com a presença ou ausência dos genes de resistência avaliados.	72
Figura 18 - Dendrograma apresentando a correlação genética entre as amostras de <i>Enterococcus</i> por meio da técnica de rep-PCR (GTG) ₅ .	74

LISTA DE QUADROS

	p.
Quadro 1 - <i>Primers</i> empregados na reação de amplificação para identificação genotípica de <i>Enterococcus</i> no nível de espécie.	45
Quadro 2 - Lista de <i>primers</i> utilizados nas reações de amplificação para a pesquisa dos genes associados à virulência das amostras de <i>Enterococcus</i> .	48
Quadro 3 - Antimicrobianos, concentrações e padrão de interpretação para <i>Enterococcus</i> spp., segundo protocolo do CLSI (2015).	49
Quadro 4 - Lista de <i>primers</i> utilizados na reação de amplificação para pesquisa dos genes <i>intl1</i> e <i>intl2</i> (genes que codificam integrases).	50
Quadro 5 - Reações de amplificação para pesquisa de genes que codificam resistência a drogas antimicrobianas em <i>Enterococcus</i> .	51

LISTA DE TABELAS

	p.
Tabela 1 - Frequências relativas e totais dos diferentes perfis de suscetibilidade das amostras de <i>Enterococcus</i> frente aos antimicrobianos testados.	62
Tabela 2 - Frequência de resistência, resistência intermediária ou suscetibilidade das amostras de <i>Enterococcus</i> para cada um dos antimicrobianos testados.	65
Tabela 3A - Padrões de resistência a antimicrobianos observados por grupo de amostras de <i>Enterococcus</i> .	68
Tabela 3B - Padrões de resistência a antimicrobianos observados por grupo de amostras de <i>Enterococcus</i> .	69
Tabela 4 - Distribuição dos perfis e padrões de resistência observados nas amostras de <i>Enterococcus</i> .	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP: Ampicilina

AS: substância de agregação (*aggregation substance*)

CIM: concentração inibitória mínima

CIP: Ciprofloxacino

CLO: Cloranfenicol

ERI: Eritromicina

ICS: infecção de corrente sanguínea

IRAS: infecções relacionadas à assistência à saúde

LVX: Levofloxacino

LZD: Linezolida

MDR: multidroga-resistente

MLST: Tipagem por sequenciamento de multilocus (*multilocus sequencing typing*)

ORF: fase aberta de leitura (*open reading frame*)

PCR: reação de polimerização em cadeia

PEN: Penicilina G

rep-PCR (GTG)₅: reação de polimerização em cadeia baseada em sequências de elementos repetitivos utilizando o iniciador (GTG)₅

TET: Tetraciclina

TSA: *Tryptic Soy Agar*

TSBg: *Tryptic Soy Broth* acrescido de glicose 2 %

VAN: Vancomicina

VRE: *Enterococcus* resistente à vancomicina

VRE_{fm}: *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina

VRE_{fs}: *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina

SUMÁRIO

	p.	
1	INTRODUÇÃO	16
1.1	O gênero <i>Enterococcus</i> - de membros da microbiota a patógenos potenciais	16
1.1.1	<i>Enterococcus como membro da microbiota</i>	16
1.1.2	<i>Enterococcus como probióticos</i>	17
1.1.3	<i>O gênero Enterococcus como patógenos potenciais</i>	18
1.2	Resistência a antimicrobianos e emergência de VRE	19
1.2.1	<i>Considerações acerca dos fenótipos de resistência à vancomicina</i>	23
1.2.2	<i>Considerações epidemiológicas sobre VRE no Brasil</i>	24
1.3	Propriedades patogênicas de <i>Enterococcus</i>	25
1.3.1	<i>Principais fatores de virulência secretados</i>	26
1.3.1.1	<i>Gelatinase</i>	26
1.3.1.2	<i>Citolisina</i>	27
1.3.2	<i>Principais fatores de virulência associados à adesão (adesinas)</i>	28
1.3.2.1	<i>Substância agregativa/de agregação</i>	28
1.3.2.2	<i>Proteína enterocócica de superfície</i>	30
1.3.2.3	<i>Proteínas ligadoras de colágeno</i>	30
1.3.3	<i>Formação de biofilme como fator de virulência</i>	30
1.3.4	<i>O sistema de feromônios sexuais em Enterococcus</i>	31
1.4	<i>Integrans, cassetes gênicos e sua participação na resistência a antimicrobianos</i>	32
1.5	A participação dos <i>Enterococcus</i> nas infecções da corrente sanguíneas (ICS) e do trato urinário (ITU)	36
1.5.1	<i>Infecções da corrente sanguínea (ICS)</i>	36
1.5.2	<i>Infecções do trato urinário (ITU)</i>	37
2	JUSTIFICATIVA	39
3	OBJETIVOS	40
3.1	Objetivo geral	40
3.2	Objetivos específicos	40

4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	Amostras bacterianas: isolamento, identificação e aspectos éticos	41
4.2	Extração do DNA bacteriano	42
4.3	Identificação fenotípica de <i>Enterococcus</i> no nível de espécie pelo sistema automatizado VITEK®2	44
4.4	Identificação genética de <i>Enterococcus</i> por PCR <i>multiplex</i>	44
4.5	Avaliação da produção de gelatinase e citolisina/hemolisina	45
4.6	Avaliação da produção de biofilme	46
4.7	Estudo genético da virulência das amostras de <i>Enterococcus</i> do grupo ICS	46
4.8	Avaliação do perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobianas das amostras	48
4.9	Pesquisa de <i>integrons</i> nas amostras de <i>Enterococcus</i>	49
4.10	Estudo genético da resistência a antimicrobianos das amostras de <i>Enterococcus</i>	50
4.11	Correlação genética entre as amostras bacterianas avaliada pela metodologia (GTG) ₅ -PCR	51
4.12	Construção dos gráficos	52
5	RESULTADOS	53
5.1	Identificação fenotípica das amostras de <i>Enterococcus</i> grupo ICS no nível de espécie pelo sistema automatizado VITEK®2 e confirmação genotípica por PCR <i>multiplex</i>	53
5.2	Identificação genotípica das amostras de <i>Enterococcus</i> no nível de espécie por PCR <i>multiplex</i>	54
5.3	Avaliação da produção de gelatinase e citolisina	55
5.4	Avaliação da produção de biofilme	58
5.5	Estudo genético da virulência das amostras de <i>Enterococcus</i> do grupo ICS	59
5.6	Avaliação do perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobianas das amostras de <i>Enterococcus</i>	60
5.7	Pesquisa de <i>integrons</i> nas amostras de <i>Enterococcus</i>	71
5.8	Estudo genético da resistência a antimicrobianos pelas amostras de <i>Enterococcus</i>	71
5.9	Correlação genética entre as amostras bacterianas pela metodologia rep-PCR (GTG) ₅	72

6	DISCUSSÃO	75
6.1	O processo de seleção da metodologia para a identificação das espécies e a diversidade das espécies encontradas nos três grupos de amostras	75
6.2	Correlação genética entre as amostras de <i>Enterococcus</i>	78
6.3	Avaliação de fatores de patogenicidade nas amostras de <i>Enterococcus</i> do grupo ICS	80
6.3.1	<i>Avaliação fenotípica de fatores de patogenicidade das amostras de Enterococcus</i>	81
6.3.2	<i>Avaliação de fatores de patogenicidade nas amostras de Enterococcus do grupo ICS</i>	83
6.4	A resistência a antimicrobianos pelas amostras de <i>Enterococcus</i>	87
6.5	Ausência de integrons nas amostras de <i>Enterococcus</i> do estudo	92
6.6	Considerações finais	93
7	SÍNTESE DOS RESULTADOS, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	94
7.1	Síntese dos resultados e conclusões	94
7.2	Perspectivas	95
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
	ANEXO 1 – TABELA DE RESULTADOS: GRUPO COMUNIDADE	114
	ANEXO 2 – TABELA DE RESULTADOS: GRUPO ITU	115
	ANEXO 3A – TABELA DE RESULTADOS: GRUPO ICS – VIRULÊNCIA	116
	ANEXO 3B – TABELA DE RESULTADOS: GRUPO ICS – RESISTÊNCIA	117
	ANEXO 4 – ARTIGO PUBLICADO	118

1 INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Enterococcus* - de membros da microbiota a patógenos potenciais

O gênero *Enterococcus* está incluído no Filo Firmicutes, Classe Bacilli, Ordem Lactobacillales, Família Enterococcaceae e inclui, pelo menos, 60 espécies descritas (Taxonomy Browser, 2018). É membro da microbiota intestinal indígena de seres humanos e outros animais, além de ser frequentemente encontrado no solo, lixo, água e alimentos, especialmente, devido à contaminação fecal (Paulsen *et al.*, 2003; Arias & Murray, 2012).

Os representantes do gênero *Enterococcus* são cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos, capazes de formar cadeias de diferentes tamanhos. São caracterizados por tolerar amplas variações de temperatura (10 °C a > 45 °C) e valores extremos de pH, pela habilidade de hidrolisar esculina e L-pirrolidonil-β-naftilamida (PYR) e por possuírem elevada resistência endógena à salinidade (concentrações superiores a 6,5% de NaCl), sais biliares, detergentes e drogas antimicrobianas (Murray, 1990; Paulsen *et al.*, 2003; Arias & Murray 2012). A princípio, foram considerados membros do gênero *Streptococcus*, incluídos no grupo D de Lancefield. Porém, estudos de homologia de DNA demonstraram a necessidade de criação de um gênero distinto para albergar o microrganismo (Murray, 1990; Hollenbeck & Rice, 2012).

1.1.1 *Enterococcus* como membro da microbiota

Os membros do gênero *Enterococcus* são habitantes do intestino de seres humanos e outros mamíferos, bem como de insetos (Arias & Murray, 2012; Martin & Mundt, 1972). Esse padrão de distribuição sugere que a colonização ocorreu no início do período Devoniano (há aproximadamente 412 milhões de anos), quando os ancestrais dos insetos e dos vertebrados divergiram (Selden, 2007). Isso faz dos enterococos um dos mais antigos membros do consórcio de microrganismos que constituem a microbiota indígena do trato gastrointestinal (Gilmore *et al.*, 2013).

A comunidade bacteriana (microbiota) dos intestinos humanos contém, predominantemente, representantes de quatro filos: Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes - sendo, os dois últimos, os filos dominantes numericamente em adultos. A microbiota intestinal é autorregulada e isso permite que seja mantida uma estabilidade ao longo do tempo - essa estabilidade é observada, principalmente, nas proporções dos grupos filogenéticos e sob condições nas quais os indivíduos estão saudáveis (Tannock, 2010).

Nos seres humanos, os enterococos são encontrados, principalmente, nos intestinos delgado e grosso (Hayashi *et al.*, 2005), sendo, ainda, detectados comumente na cavidade oral (Smyth *et al.*, 1987). As espécies mais corriqueiramente isoladas de espécimes fecais de seres humanos são *E. faecalis* e *E. faecium*. Com menores taxas de prevalência, espécies como *E. durans*, *E. avium*, *E. ceccae* e *E. hirae*, também são descritas (Finegold *et al.*, 1983; Tannock & Cook, 2002; Carvalho *et al.*, 2006; Layton *et al.*, 2010). Outras bactérias do gênero *Enterococcus* são raramente descritas como parte da microbiota intestinal humana, mas podem estar presentes na microbiota de outros animais ou em plantas (Lebreton *et al.*, 2014).

1.1.2 Enterococcus como probióticos

De acordo com a recomendação da Junta de Avaliação de Probióticos em Alimentos da Organização Mundial de Saúde (OMS), a definição sugerida diz que “probiótico é um microrganismo vivo que, quando administrado em quantidades adequadas, confere benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO 2002).

Probióticos atuam por meio de diferentes mecanismos que remetem às propriedades intrínsecas da própria microbiota. Atuam como barreira, pela colonização do epitélio intestinal e pela inibição competitiva, impedindo, assim, que outras bactérias do lúmen intestinal atinjam a lâmina própria. Eles promovem o aumento da produção e alteram a consistência da camada de muco - o que protege contra bactérias invasivas. São capazes de produzir substâncias que inibem a multiplicação de patógenos (ácidos orgânicos e bacteriocinas, entre outras) e induzem uma maior secreção, pelo hospedeiro, de defensinas e imunoglobulinas protetoras, como a imunoglobulina A secretada (sIgA). Finalmente, os probióticos atuam regulando as funções do sistema imune de mucosa, tornando-o mais anti-

inflamatório e menos pró-inflamatório - especificamente, probióticos podem estimular as células dendríticas que sejam menos reativas e responsivas às bactérias luminais - o que é denominado imunomodulação (Fedorak 2010).

Espécies de *Enterococcus*, como dito anteriormente, são componentes da microbiota humana e, portanto, candidatos potenciais a probióticos. De fato, foram realizados diversos testes buscando avaliar a eficácia e a segurança dessas bactérias como promotoras da saúde, mas, considerando os resultados obtidos, nem o FDA (Food and Drug Administration) nem o EFSA (European Food Safety Authority) aprovaram os medicamentos ou segurança do microrganismo para ser utilizado como probiótico. Isso se deve ao fato da emergência dos enterococos como agentes etiológicos de doenças infecciosas em seres humanos e sua habilidade em adquirir e expressar múltiplos genes de resistência a antimicrobianos (Lebreton *et al.*, 2014; Franz *et al.*, 2011).

1.1.3 O gênero *Enterococcus* como patógenos potenciais

Os membros da microbiota podem atuar como patógenos oportunistas ao ultrapassarem a barreira da mucosa intestinal e translocarem para outros sítios corporais, causando infecções sistêmicas, principalmente, em hospedeiros imunocomprometidos (Berg, 1996; Donskey, 2004). A primeira descrição de infecção enterocócica, um quadro de endocardite infectiva, data de 1899 (MacCallum & Hastings, 1899).

Inicialmente, acreditava-se que os enterococos possuíam relevância relativamente baixa na clínica médica. Eles emergiram, nos últimos anos, como patógenos de destaque, envolvido na etiopatogenia de doenças importantes, como endocardite infectiva e infecções pélvicas, neonatais e do trato urinário (Arias & Murray, 2012; Hollenbeck & Rice, 2012). Segundo Hidron e colaboradores (2008), as bactérias do gênero *Enterococcus* são o terceiro patógeno nosocomial mais frequentemente isolado (12% de todas as infecções hospitalares) nos Estados Unidos, atrás apenas de *Staphylococcus* coagulase negativo e *Staphylococcus aureus*.

As amostras de *Enterococcus* são exemplos claros de patógenos *problemáticos*, uma vez que expressam, frequentemente, resistência, tanto intrínseca como adquirida, a diversas classes de drogas antimicrobianas. De fato, *E. faecium* tem sido destacado pela *Infectious*

Diseases Society of America como uma das *bactérias-problema* (*key problem bacteria*). A espécie está incluída entre os patógenos ESKAPE (*E. faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.), que requerem o desenvolvimento de novas drogas que ampliem o arsenal terapêutico, possibilitando o emprego de esquemas de tratamento mais eficazes contra o grupo. Relata-se, ainda, aumento notável da prevalência de *E. faecium* associado a infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (Howden *et al.*, 2013).

Embora os representantes do gênero *Enterococcus*, geralmente, exibam baixo grau de virulência, o grupo possui potencial patogênico (Arias & Murray, 2012). Assim, Lebreton e colaboradores (2014) sugerem que, para que possam ser considerados como potenciais probióticos, as linhagens de enterococos devem ter perdido seus traços de patogenicidade (por exemplo: citolisina/hemolisina, gelatinase, serina protease, substância de agregação, polissacáride capsular, habilidade de produção de biofilme, produção extracelular de superóxido, proteína enterocócica de superfície, dentre outros), ser incapazes de se translocarem através da mucosa intestinal, permanecer suscetíveis à fagocitose e, como todas as linhagens probióticas, ter habilidade reduzida em realizar transferência de DNA *in vivo*.

1.2 Resistência a antimicrobianos e emergência de VRE

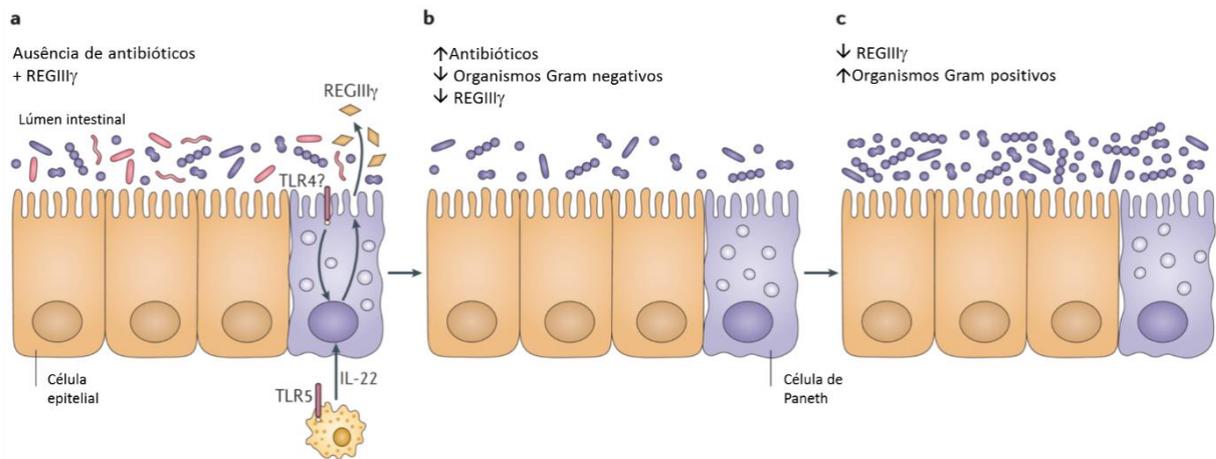
A resistência intrínseca das amostras de *Enterococcus* a diversos antimicrobianos e a aquisição de resistência a outros, particularmente, à vancomicina, frequentemente empregada no tratamento de pacientes com infecções graves por bactérias Gram positivas, levou à emergência de *E. faecalis* como um patógeno nosocomial relevante. Algumas amostram exibem, inclusive, resistência à maioria das terapias antimicrobianas disponíveis, há mais de uma década (Paulsen *et al.*, 2003). Assim como *E. faecalis*, a importância de *E. faecium* na clínica médica é crescente. A bactéria está associada, predominantemente, a infecções resistentes à antibioticoterapia em pacientes hospitalizados. Ainda que grandes investimentos venham sendo feitos na tentativa de controle de bactérias resistentes a drogas antimicrobianas em hospitais de todo o mundo, a prevalência de IRAS relacionadas a VREfm é crescente (Howden *et al.*, 2013).

Nos Estados Unidos, IRAS causadas por *Enterococcus* emergiram em dois momentos. O primeiro, iniciado no final da década de 1970, está associado à introdução das cefalosporinas de terceira geração na prática clínica. Durante este período, *E. faecalis* representava 90-95% das amostras de *Enterococcus* recuperadas. O segundo momento é marcado por linhagens de *E. faecium* que apresentam resistência à vancomicina e ampicilina mais frequentemente que *E. faecalis*. Esse segundo período está em curso atualmente, tendo sido iniciado nos primeiros anos da década de 1990. O processo está associado ao uso crescente de vancomicina e outros antimicrobianos de amplo espectro e é disseminado por várias partes do globo. A emergência destas amostras de *E. faecium* tem grande importância clínica, uma vez que o controle das mesmas é mais complicado do que o de *E. faecalis* (Arias & Murray, 2012).

Um estudo publicado em 2010 mostrou que, em quatro países da América Latina (Colômbia, Equador, Peru e Venezuela), a maioria (aproximadamente 78%) das infecções por *Enterococcus* ainda é causada por amostras de *E. faecalis* suscetíveis a ampicilina e vancomicina. Os cerca de 20% casos restantes estão associados a linhagens de *E. faecium* multirresistentes, que se assemelham geneticamente às linhagem observadas nos Estados Unidos (Panesso *et al.*, 2010).

A princípio, amostras de *Enterococcus* representam uma pequena proporção da microbiota indígena. Entretanto, em determinadas situações, observa-se o aumento da densidade de colonização do intestino, o que parece estar relacionado à emergência de IRAS causadas por *Enterococcus*. Além disto, são causa de infecções urinárias e intra-abdominais, endocardite e sepse. A exposição de pacientes hospitalizados a determinados antimicrobianos (cefalosporinas e algumas penicilinas, como piperacilina-tazobactan, que possuem atividade contra bactérias Gram negativas e algumas espécies Gram positivas, mas não *E. faecium*) resulta em alterações significativas na microbiota intestinal, o que facilita a colonização do intestino por amostras VRE, como ilustrado na Figura 1 (Arias & Murray, 2012).

Figura 1 - Efeitos da administração de drogas antimicrobianas na microbiota intestinal e emergência de VRE (*Enterococcus* resistente à vancomicina).



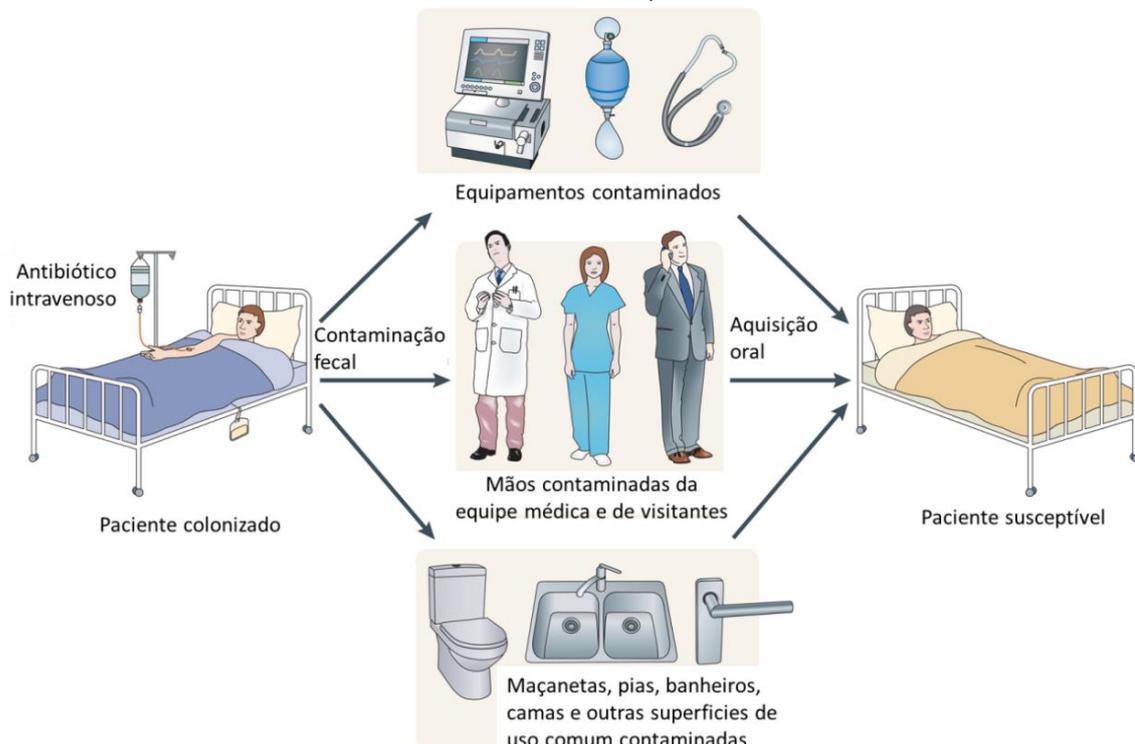
a) Na ausência de antimicrobianos, células de Paneth presentes no intestino de camundongos produzem REGIII γ (uma lecitina do tipo C), que possui atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas (roxo). A produção de REGIII γ é desencadeada pela presença de bactérias Gram negativas, que têm alguns padrões moleculares, como LPS e flagelina, reconhecidos por receptores TLR (*Toll-like receptors*), como TLR4 e TLR5, respectivamente. b) A administração de antimicrobianos reduz a concentração de bactérias Gram negativas e, conseqüentemente, a produção de REGIII γ pelas células de Paneth e do epitélio intestinal. c) Amostras de *Enterococcus* aproveitam-se da redução de REGIII γ e tornam-se membros dominantes da microbiota intestinal (Traduzido de Arias & Murray, 2012).

As amostras de *Enterococcus* sobrevivem por longos períodos em superfícies, como equipamentos médicos, trilhos de cama, maçanetas, pias e vasos sanitários, e são tolerantes a calor, cloro e algumas preparações alcoólicas, o que pode ajudar a explicar sua disseminação no ambiente hospitalar. Vários fatores de riscos que facilitam a disseminação da infecção por VRE podem ser identificados, como mostrado na Figura 2. O conhecimento destes fatores e das rotas de contaminação são importantes para o controle eficaz da infecção no ambiente hospitalar (Arias & Murray, 2012).

Como mencionado anteriormente, o gênero *Enterococcus* é descrito como causa de pelo menos 10% das infecções hospitalares. As principais espécies associadas a infecção no ser humano, *E. faecalis* (85-90 %) e *E. faecium*, apresentam resistência intrínseca a diversos antimicrobianos, como β -lactâmicos (penicilina e cefalosporinas), aminoglicosídeos (estreptomina), lincosamidas (clindamicina, em *E. faecalis*), estreptograminas (a combinação B/A, quinupristin-dalfopristin, em *E. faecalis*) e sulfametoxazol-trimetoprima. A aquisição de resistência por *Enterococcus* também foi descrita para diversos antimicrobianos, dentre eles aminoglicosídeos (gentamicina), glicopeptídeos (vancomicina), estreptograminas

(quinupristin-dalfopristin, em *E. faecium*), linezolida, daptomicina e tigeciclina. A resistência a outras drogas, como macrolídios, tetraciclina, cloranfenicol, fosfomicina, rifampicina e quinolonas, é amplamente disseminada e, por isso, as mesmas raramente são utilizadas no tratamento de pacientes com infecções enterocócicas (Hollenbeck & Rice, 2012).

Figura 2 - Principais rotas de transmissão nosocomial de VRE (*Enterococcus* resistente à vancomicina).



Os principais fatores de risco para a colonização e subsequente infecção nosocomial por VRE incluem proximidade física a pacientes infectados ou colonizados por VRE; períodos longos de internação; internação envolvendo cuidados intensivos, unidades cirúrgicas ou UTIs (Unidades de Terapia Intensiva); presença de cateter urinário e administração de múltiplos antimicrobianos. Diversas drogas antimicrobianas levam ao aumento da densidade de VRE no intestino, o que, por sua vez, facilita a dispersão do organismo por meio de contaminação fecal do ambiente hospitalar, incluindo objetos inanimados e mãos de cuidadores e visitantes. As amostras de *Enterococcus* podem sobreviver por longos períodos em superfícies e são tolerantes a calor, cloro e algumas preparações alcoólicas (Traduzido de Arias & Murray, 2012).

Classicamente, pacientes com infecções associadas a *Enterococcus* são tratados com a associação de um β -lactâmico e um aminoglicosídeo em elevadas concentrações (geralmente ampicilina e gentamicina ou estreptomicina), considerando a ação sinérgica das drogas, devido à penetração dos aminoglicosídeos pela parede celular defeituosa em decorrência da ação da ampicilina (Tavares, 2000; Hollenbeck & Rice, 2012). O tratamento de

pacientes infectados por VRE representa um desafio para o clínico, visto que estas amostras são tipicamente resistentes a outras classes de antimicrobianos. Apesar de apenas linezolid e quinupristin-dalfopristin terem sido aprovados pela *Food and Drug Administration* para o tratamento de indivíduos infectados por amostras de *Enterococcus* resistentes a aminoglicosídeos, outros agentes antimicrobianos (daptomicina, tigeciclina, fosfomicina, quinolonas, tetraciclina e cefalosporinas de quinta geração) têm sido utilizados com sucesso em casos individuais. Deve-se, ainda, ressaltar o fato de que quinupristin-dalfopristin é eficaz apenas contra VRE_{fm}, uma vez que as amostras de VRE_{fs} expressam resistência a esse antimicrobiano, pela expressão do gene *isa*, que é relacionado estruturalmente a uma bomba de efluxo do tipo ABC (Hollenbeck & Rice, 2012).

Milhões de dólares são gastos, anualmente, pelos sistemas de saúde, objetivando conter a disseminação de bactérias resistentes a drogas antimicrobianas e prevenir a transmissão cruzada. Como discutido, surtos nosocomiais de infecção por VRE parecem ocorrer quando a bactéria se dissemina a partir de um paciente carreador do microrganismo em seu intestino via membros da equipe médica ou pelo próprio ambiente hospitalar. Este modelo prediz que intervenções baseadas no *screening* e isolamento dos pacientes colonizados por VRE, no aperfeiçoamento dos procedimentos empregados para a higienização das mãos dos profissionais e no aprimoramento da higiene hospitalar irão limitar o processo de transmissão cruzada (Howden *et al.*, 2013). A circulação de amostras VRE apresenta graves implicações econômicas e sociais. Estima-se que o tratamento de um paciente infectado por VRE seja 10 vezes mais caro do que de um indivíduo com infecção por outras amostras de *Enterococcus*. Ainda, a infecção por VRE está associada a taxas de mortalidade bem mais elevadas (Oliveira & Bettcher, 2010).

1.2.1 Considerações acerca dos fenótipos de resistência à vancomicina

Um total de nove óperons que codificam a resistência à vancomicina foram descritos, sendo que oito medeiam resistência adquirida ao antimicrobiano [determinados pelos genes *vanA*, *vanB* (variantes B1-3), *vanD* (variantes D1-5), *vanE*, *vanG* (variantes G1-2), *vanL*, *vanM* e *vanN*] e um é responsável pela resistência intrínseca (*vanC*, com suas variantes C1-3, que são encontrados nos enterococos móveis, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. flavescens*). Os

mecanismos codificados são distintos genotípica e fenotipicamente, permitindo que a bactéria adquira uma complexa maquinaria enzimática responsável por: a) detectar a presença de glicopeptídeos no entorno; b) alterar o precursor normal do pentapeptídeo (sensível ao glicopeptídeo) pelo alternativo (resistente): nos fenótipos VanA, VanB, VanD e VanM, o precursor alternativo é D-Ala-D-Lac, enquanto em VanC, VanE, VanG, VanL e VanN é D-Ala-D-Ser e c) eliminar os precursores normais do peptideoglicano, de modo que a célula utilize quase exclusivamente os precursores resistentes (Cercenado, 2011; Hollenbeck & Rice, 2012).

O fenótipo VanA é caracterizado pela resistência induzível de alto nível à vancomicina e à teicoplanina e é adquirido, geralmente, por meio do transpóson Tn1546 ou da família Tn3. O óperon *vanB* produz resistência induzível de baixo ou alto nível à vancomicina, mas não à teicoplanina e é adquirido, geralmente, por meio do transpóson Tn1547. VanA e VanB são os fenótipos mais comuns. Como dito anteriormente, *vanC* é intrínseco das espécies móveis de enterococos, sendo codificado pelo cromossomo e expresso constitutivamente. Caracteriza baixo nível de resistência à vancomicina e sensibilidade à teicoplanina. VanD é caracterizado por resistência moderada à vancomicina e à teicoplanina; o óperon está localizado no cromossomo e não é transferível. VanE e VanG apresentam baixo nível de resistência à vancomicina e sensibilidade à teicoplanina, são adquiridos e induzíveis. O funcionamento bioquímico e a organização do óperon VanE assemelha-se a VanC, enquanto a organização genética de VanG é diferente de todos os descritos anteriormente. Os fenótipos VanL e VanN apresentam baixo nível de resistência à vancomicina e sensibilidade à teicoplanina, enquanto VanM apresenta altos níveis de resistência a ambos os antimicrobianos (Cercenado, 2011; Hollenbeck & Rice, 2012).

1.2.2 Considerações epidemiológicas sobre VRE no Brasil

O primeiro relato de VRE no Brasil foi feito em 1996, no Paraná, 16 anos após a primeira identificação deste grupo nos Estados Unidos. Tratava-se de uma menina de 9 anos de idade, com anemia aplástica, que evoluiu para óbito em decorrência de sepse associada a uma amostra VREfm com fenótipo VanA (Dalla Costa *et al.*, 1998). Em Minas Gerais, o primeiro caso foi registrado em 2003, em uma paciente de 30 anos, vítima de um acidente

automobilístico, internada no Hospital da Universidade Federal de Uberlândia (Ribas *et al.*, 2007). Posteriormente, diversos surtos de VRE foram observados no País, incluindo relatos de disseminação tanto intra-hospitalar como inter-hospitalar. A maioria das amostras foi identificada como *E. faecalis* e apresentava fenótipo VanA (Pereira *et al.*, 2010).

Estudos epidemiológicos demonstram algumas diferenças na distribuição de *Enterococcus* no Brasil, nos Estados Unidos e na Europa. O gênero é detectado com maior frequência nos Estados Unidos, diferentemente do Brasil e da América Latina, onde a bactéria é a oitava ou nona causa de infecção em seres humanos. Ainda, no Brasil, a resistência à vancomicina é mais comumente observada em *E. faecalis*, enquanto nos EUA e na Europa, é mais frequente em amostras de *E. faecium*. As taxas de detecção de VRE na América Latina elevaram-se de 5,0% em 2003 para 15,5% em 2008 e o aumento mais significativo ocorreu no Brasil. Grande parte das amostras de VREfm isoladas no Brasil não compartilham a mesma história evolutiva das amostras de outros continentes, nem demonstram uma ameaça epidemiológica a curto prazo. Porém, o ambiente hospitalar e a disponibilidade de genes de virulência locais influenciam a história evolutiva das mesmas e os diferentes dados epidemiológicos no Brasil ainda carecem de investigação (Rossi, 2011).

1.3 Propriedades patogênicas de *Enterococcus*

A emergência do gênero *Enterococcus* como patógeno nosocomial foi, a princípio, atribuída exclusivamente à sua marcante resistência a drogas antimicrobianas. Entretanto, hoje está claro que existem diversas habilidades de virulência também envolvidas no sucesso evolutivo do organismo. As investigações referentes aos mecanismos pelos quais a bactéria causa doença possibilitaram o esclarecimento de aspectos importantes da sua biologia. Ao contrário de *Staphylococcus* e *Streptococcus*, a maioria das amostras de *Enterococcus* não produz um conjunto de toxinas pró-inflamatórias potentes. Por outro lado, o microrganismo alberga diversos genes que codificam proteínas de adesão, o que é consistente com o padrão das infecções enterocócicas (Arias & Murray, 2012).

Diversos fatores de patogenicidade de *Enterococcus* já foram caracterizados e seus efeitos demonstrados, tanto em modelos animais como em culturas celulares (Eaton & Gasson, 2001). Entre as diversas habilidades de patogenicidade expressas por *Enterococcus*

relevantes para o estabelecimento de infecção em seres humanos merece destaque a capacidade de produção de biofilme. Esta característica tem sido associada a, pelo menos, três genes, *agg*, *esp* e *ace*, que codificam, respectivamente, uma substância de agregação, uma proteína de superfície e uma proteína de parede celular que se liga ao colágeno (López-Salas *et al.*, 2013).

A ampla gama de habilidades de virulência associada ao perfil de resistência a uma grande variedade de drogas antimicrobianas confere aos *Enterococcus*, além da capacidade de emergência em ambientes hospitalares, o potencial para atuarem como reservatório de genes associados a estas características, contribuindo para a disseminação das mesmas (Hollenbeck & Rice 2012; Jahan & Holley, 2014).

1.3.1 Principais fatores de virulência secretados

1.3.1.1 Gelatinase

A gelatinase é uma metaloproteinase extracelular codificada pelo gene *gelE*, sendo cotranscrita com uma serina-protease e regulada por *quorum sensing* (sistema de dois componentes *fsr*, que responde à acumulação extracelular de lactona). Amostras produtoras de gelatinase são isoladas tanto de espécimes clínicos como de indivíduos saudáveis. Essa enzima tem a habilidade de hidrolisar gelatina, colágeno, elastina, caseína, hemoglobina, glucagon, neurotensinas e outros peptídeos bioativos, o que sugere sua participação no processo inflamatório do hospedeiro. GelE atua na degradação tecidual e na modulação do sistema imunológico do hospedeiro, participa da remoção de proteínas deficientes da parede bacteriana mantendo a estabilidade de algumas adesinas, além de ter participação na formação de biofilme devido à sua atividade autolítica (liberando DNA extracelular para compor a matriz do biofilme). Sua atividade enzimática é requerida para a formação de biofilme e sua virulência foi observada em diferentes modelos animais (peritonite murina, infecção em *Caenorhabditis elegans* e endoftalmite em coelhos) (Giridhara Upadhyaya *et al.*, 2009; Sava *et al.*, 2010a; Arias & Murray, 2012).

1.3.1.2 Citolisina

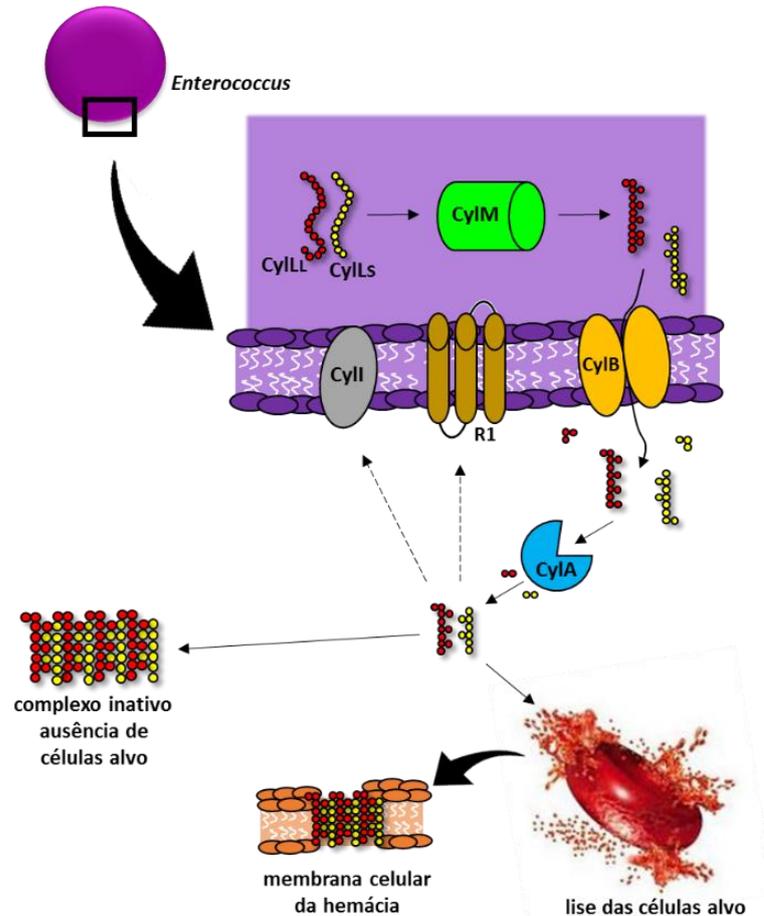
Citolisina (ou hemolisina) é uma bacteriocina de amplo espectro, sendo efetiva contra grande parte das espécies de bactérias Gram positivas. Foi descrita na década de 1930 e classificada na ampla classe dos peptídeos lantibióticos; apresenta habilidade de lisar algumas células eucarióticas, além de bactérias (Van Tyne & Gilmore, 2014).

É encontrada em amostras clínicas e de diversas outras fontes, o que sugere sua evolução como um fator de colonização, provavelmente em um hospedeiro não-humano. Especula-se seu papel na manutenção do nicho do organismo, inclusive para competir e matar parasitas eucarióticos intestinais em um hospedeiro inseto, por exemplo, o que garantiria vantagem seletiva à bactéria e a seu hospedeiro (Van Tyne & Gilmore, 2014).

Citolisina é uma toxina hemolítica produzida por, aproximadamente, 30% das amostras de *E. faecalis* (e 60% das amostras isoladas de infecções em seres humanos). Estudos clínicos demonstram que os casos mais graves estão associados a bactérias produtoras da toxina. Além disso, sua atividade foi evidenciada em todos os modelos animais testados. A atividade citolítica da enzima pode ser observada em eritrócitos de seres humanos, cavalos e coelhos, além de linfócitos (polimorfonucleares e macrófagos); por outro lado, a citolisina não é ativa contra eritrócitos de bovinos e ovinos (Giridhara Upadhyaya *et al.*, 2009; Arias & Murray, 2012).

Seis genes fazem parte do óperon *cyl* (*cylL_L*, *cylL_S*, *cylM*, *cylB*, *cylA* e *cylII*), além dos reguladores *cylR1* e *cylR2*. *CylR1* e *CylR2* fazem parte do sistema de regulação de dois componentes e atuam na repressão do óperon *cyl*. A molécula funcional é heterodimérica, tendo dois domínios: *CylL_L* (região operacional e termoestável) e *CylL_S* (região ativadora e termolábil), subunidades que têm grande afinidade entre si. As enzimas *CylM* e *CylA* são responsáveis pelas modificações pós-traducionais nos estágios intra e extracelular, respectivamente. O transporte do peptídeo para o meio extracelular é realizado pela proteína transmembrânica *CylB*, enquanto a imunidade contra a atividade lítica da toxina é garantida pela proteína *CylII* (Haas *et al.*, 2002; Van Tyne *et al.*, 2013; Figura 3).

Figura 3 - Modelo de expressão, maturação, secreção e ativação da citolisina em *Enterococcus faecalis*.



As subunidades CylL_L (vermelho) e CylL_S (amarelo) são modificadas, no citoplasma da célula de *E. faecalis* (roxo), pela ação de CylIM (verde) e transportada para o meio extracelular pela proteína transmembrânica CylB (laranja). Fora da célula, as subunidades estruturais são ativadas pela enzima CylA (azul), formando moléculas que lisam as células alvo (na figura, uma hemácia). Na ausência de células alvo, as subunidades formam complexos inativos. A proteína CylI (cinza) é uma proteína de imunidade e protege a célula da atividade lítica da toxina por um mecanismo ainda desconhecido. A proteína R1 (marrom) é um regulador de dois componentes que atua na repressão do operon *cyl*. (Modificada e adaptada de Haas *et al.*, 2002 e Van Tyne *et al.*, 2013).

1.3.2 Principais fatores de virulência associados à adesão (adesinas)

1.3.2.1 Substância agregativa/de agregação

Substância de agregação (*aggregation substance*, AS) é uma classe de proteínas de superfície cuja expressão é induzida por feromônio (pequenos peptídeos secretados pela bactéria receptora e detectados pelas células que possuem os plasmídeos responsáveis a feromônios) e que estão inseridas e dispostas na parede celular de forma não uniforme

(Giridhara Upadhyaya *et al.*, 2009; Sava *et al.*, 2010b; Van Tyne & Gilmore, 2014). São codificadas por plasmídeos que codificam resistência a antimicrobianos e alelos adicionais podem ocorrer no cromossomo (Van Tyne & Gilmore, 2014). Dentre as AS mais bem estudadas, estão Agg/Asa I, Asp I e Acs10, que apresentam mais de 90% de identidade (Sava *et al.*, 2010a).

Considerando-se que *Enterococcus* tem, inicialmente, uma natureza mutualística e que o processo infeccioso é um ponto posterior na evolução desses organismos, é provável que, apesar de aumentar o potencial patogênico das amostras hospitalares, AS deriva de sua contribuição para a colonização do trato gastrointestinal, uma vez que a proteína tem capacidade de aumentar a ligação da bactéria a células epiteliais do cólon (Van Tyne & Gilmore, 2014).

A porção N-terminal é responsável pela agregação por meio da ligação ao ácido lipoteicoico da parede celular (Sava *et al.*, 2010a). E, assim, a indução da expressão de AS promove a formação do agregado de conjugação, mediando o contato entre as células doadora e receptora de forma eficiente, a fim de facilitar a transferência do plasmídeo (Giridhara Upadhyaya *et al.*, 2009; Sava *et al.*, 2010a; Van Tyne & Gilmore, 2014).

AS tem participação na adesão entre *E. faecalis* e as células do túbulo renal e a diversas proteínas da matriz extracelular, na sobrevivência da bactéria no interior de células do sistema imunológico (macrófago e polimorfonucleares), na internalização por enterócitos cultivados *in vitro* e na formação de agregados bacterianos na válvula cardíaca (aumentando, assim, a gravidade da endocardite experimental por *E. faecalis*) (Giridhara Upadhyaya *et al.*, 2009; Sava *et al.*, 2010a, Van Tyne & Gilmore, 2014). Por outro lado, AS facilita a internalização *in vitro* da bactéria em diferentes células intestinais, o que pode estar envolvido na translocação do microrganismo pelo epitélio intestinal, favorecendo, assim, a infecção sistêmica (Sava *et al.*, 2010a).

A substância de agregação também contribui para a formação de biofilme, o que resulta em aderência bacteriana e persistência nos tecidos humanos e em dispositivos médicos (Van Tyne & Gilmore, 2014). Além dessa função, a AS tem capacidade de aderir às proteínas de matriz extracelular e de aumentar a hidrofobicidade de superfície (Giridhara Upadhyaya *et al.*, 2009).

1.3.2.2 Proteína enterocócica de superfície

Proteína enterocócica de superfície (*enterococcal surface protein*, Esp) é uma proteína associada à parede celular de diversas amostras de *Enterococcus*, sendo codificada por um grupo de genes que se converteram em ilhas de patogenicidade em linhagens patogênicas (Giridhara Upadhyaya *et al.*, 2009; Sava *et al.*, 2010b; Van Tyne & Gilmore, 2014).

Em *E. faecalis*, sua presença é bem distribuída entre as amostras, enquanto em *E. faecium* é mais frequente em amostras clínicas, o que reforça seu papel na virulência desse microrganismo. É expressa acima de 37 °C e sob anaerobiose (Sava *et al.*, 2010b).

Esp promove a adesão tissular e a formação de biofilme, o que contribui para sua persistência e sobrevivência em sítios de infecção ou de colonização comensal (Van Tyne & Gilmore, 2014). Tem participação na formação de biofilme em superfícies abióticas e papel reconhecido em casos de bacteremia, infecções do trato urinário e endocardite, processos que, inclusive, envolvem a formação de biofilme no sítio da infecção (Giridhara Upadhyaya *et al.*, 2009; Sava *et al.*, 2010b).

1.3.2.3 Proteínas ligadoras de colágeno

A proteína Ace é uma adesina pertencente à família dos componentes de superfície que reconhecem moléculas de adesão da matriz extracelular (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*, MSCRAMM). Dentre as proteínas mais estudadas, estão Ace, Fss, Acm e EcbA, que se ligam a colágenos tipo I e IV, laminina e dentina. São encontradas tanto em amostras indígenas como em amostras clínicas, possuindo participação na patogênese de endocardite experimental (Giridhara Upadhyaya *et al.*, 2009; Sava *et al.*, 2010a).

1.3.3 Formação de biofilme como fator de virulência

Biofilmes são comunidades microbianas que resultam da aderência de organismos planctônicos a uma superfície abiótica ou biótica. Hoje, reconhece-se o fato de que as

bactérias passam grande parte de seu tempo nessas formações e que a forma planctônica está relacionada principalmente à dispersão (Dunny *et al.*, 2014).

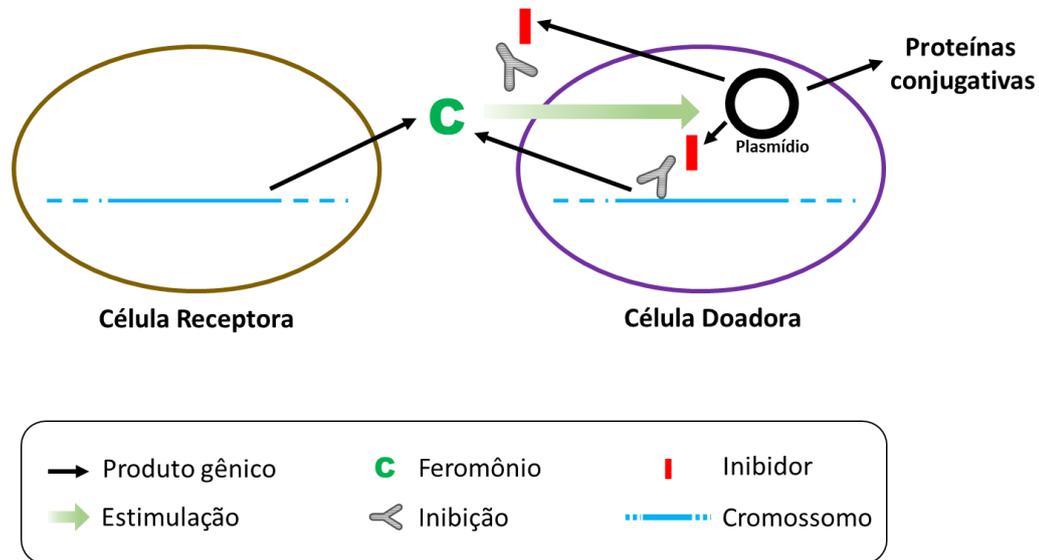
Biofilmes têm grande importância clínica, uma vez que permitem aos microrganismos uma vantagem de sobrevivência aos agentes antimicrobianos, sendo necessário utilizar concentrações até 1000 vezes maiores para o tratamento. Estima-se que 80% das infecções em seres humanos tenham envolvimento de biofilme (como o biofilme dental, fibrose cística e endocardite) e que essa formação microbiana seja a base para a capacidade refratária das IRAS, principalmente, quando associadas a dispositivos invasivos (Pendleton *et al.*, 2013).

1.3.4 O sistema de feromônios sexuais em *Enterococcus*

O principal mecanismo que contribui para plasticidade genômica nos *Enterococcus* é, como apresentado anteriormente, a transferência horizontal de genes. Por meio desse mecanismo esse microrganismo adquire diversos genes de resistência a antimicrobianos, além de diversos elementos genéticos móveis de grande importância para a clínica, dentre os quais estão incluídos plasmídios conjugativos responsivos a feromônios (Hirt *et al.*, 2018).

Feromônios são peptídeos que medeiam um sistema de sinalização intercelular que regula a expressão de plasmídeos conjugativos (Dunny, 2013; Figura 4). Os plasmídios responsivos a feromônios em *E. faecalis* são os plasmídios conjugativos mais bem caracterizados entre as bactérias Gram-positivas e, comumente, carregam genes de resistências e de produção de citolisina, ainda que muitas vezes não apresentem nenhum marcador fenotípico detectável. E, ainda que a resposta aos feromônios seja bem caracterizada *in vitro*, seu papel na comunicação intercelular de *Enterococcus* em seu hábitat natural ainda não está claro. (Dunny, 2013; Hirt *et al.*, 2018).

Figura 4 - Comunicação mediada por feromônio sexual entre células doadora e receptora de plasmídio



Comunicação entre células doadora (roxo) e receptora (marrom). À esquerda, a célula receptora (desprovida de plasmídio, em marrom) secreta o feromônio sexual (C, verde), codificado por um gene localizado no cromossomo (linha em azul). À direita, a célula doadora (em roxo) contém um plasmídio (círculo preto) que codifica um sistema de conjugação eficiente, que é sintetizado em resposta à presença do feromônio C no meio. O plasmídio, por sua vez, codifica proteínas envolvidas no processo de conjugação e proteínas reguladoras negativas (I), que inibem a auto-indução das células doadoras pelo feromônio endógeno e, também, ajuda o sistema a retornar ao estado de não-indução após a indução de um ciclo – esses inibidores podem atuar reduzindo a quantidade de feromônio secretado pela célula doadora ou atuando como inibidor competitivo do feromônio. O sistema descrito é baseado no sistema pCF10 que responde ao feromônio *ccfA*, mas outros sistemas que respondem a outros feromônios funcionam de maneira semelhante. (Dunny, 2013 - adaptado)

1.4 *Integrans*, cassetes gênicos e sua participação na resistência a antimicrobianos

A resistência bacteriana tem sido um empecilho para uma terapia efetiva contra doenças infecciosas desde que os antimicrobianos começaram a ser utilizados. Ao longo do tempo, ficou claro que a emergência de linhagens resistentes não poderia ser atribuída somente a mutações. A partir da década de 1970, as pesquisas passaram a focar na participação de *material genético transferível* e estes estudos culminaram na descoberta dos primeiros *elementos móveis de DNA*, plasmídeos R conjugativos e transpósons. Somente no final da década de 1980, análises mais minuciosas revelaram que, em muitos casos, os determinantes de resistência estavam abrigados em um novo tipo de elemento genético, que foi denominado *integron* (Rowe-Magnus & Mazel, 2002; Mazel, 2006).

Integrans são plataformas de montagem capazes de incorporar fases abertas de leitura (*open reading frames*, ORFs) por meio de recombinação sítio específica, convertendo aquelas ORFs em genes funcionais, ao assegurar sua expressão de forma adequada. Os *integrans* são compostos por três elementos-chave: um gene codificador de integrase (*intl*), um sítio primário de recombinação (*attI*), localizado proximalmente, e um promotor (Pc), que controla a expressão dos genes capturados. O gene *intl* codifica uma integrase da família das tirosina-recombinases, caracterizada pela presença invariável da sequência RHRV de aminoácidos nos motivos conservados, que medeia a recombinação entre os sítio *attI* e um segundo alvo denominado sítio *attC*, também chamado de elemento de 59 bases (Mazel, 2006; Yu *et al.*, 2013; Figura 5).

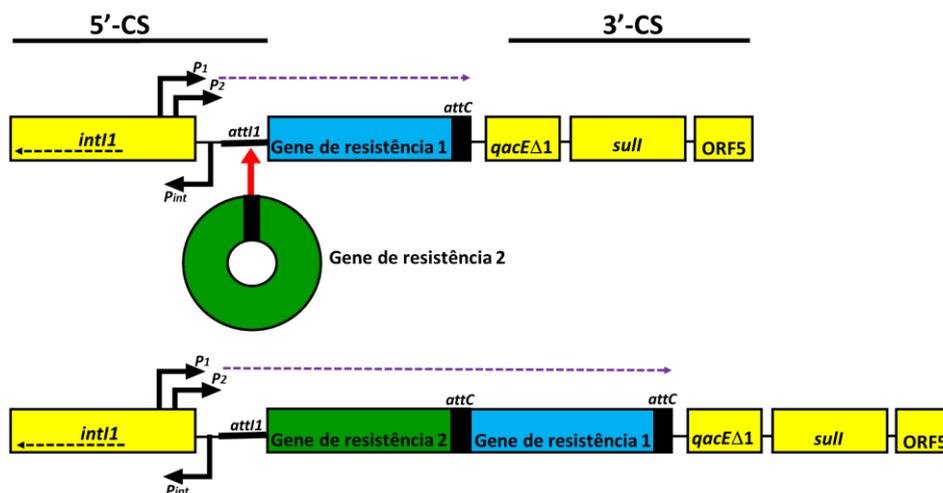
Os *integrans* podem ser subdivididos em duas grandes classes: os *integrans móveis*, relacionados a elementos *móveis* de DNA e envolvidos primariamente na disseminação de genes de resistência a antimicrobianos, e os *super-integrans*. Os *integrans móveis* podem ser incluídos em diferentes subclasses, sendo as subclasses 1, 2 e 3 as mais comumente observadas. Estão fisicamente relacionadas a elementos *móveis* como sequências de inserção, transpósons e plasmídeos conjugativos, elementos que servem como veículos para a transmissão de genes tanto no nível intra- como no nível interespecífico. Os *super-integrans* diferem dos *integrans móveis* por duas principais características: a) um número elevado de cassetes (>20) está associado ao *integron* e b) o *integron* está localizado no cromossomo e não em *elementos móveis* de DNA. Eles são componentes que integram o genoma de Gammaproteobacteria, tendo sido identificados em Vibrionaceae, além de *Xanthomonas* e *Pseudomonas* (Mazel, 2006).

Os *integrans* de classe 1, mais comumente observados, caracterizam-se pela presença de dois segmentos conservados, o 5'-CS e o 3'-CS. O 5'-CS contém o gene *intl*, o sítio *attI* e os promotores, enquanto o 3'-CS codifica os genes *sulI* e *qacE Δ 1*, que conferem resistência a sulfonamidas e a compostos quaternários de amônio, respectivamente. Adicionalmente, o 3'-CS carrega a ORF5, que codifica uma proteína de função desconhecida (Figura 5). Cassetes que contêm genes de resistência a antimicrobianos são integrados entre as regiões 5'-CS e 3'-CS, no sítio receptor *attI*. Mais de um *integron* de classe 1 pode ser observado em uma mesma célula bacteriana (Carattoli, 2001).

São encontrados com grande frequência em amostras clínicas e a maioria dos cassetes de genes de resistência é observada nesta classe de *integrans*. Já foram descritos

mais de 80 cassetes gênicos e, entre os perfis possíveis, existem elementos que conferem resistência a todos os β -lactâmicos e aminoglicosídeos, cloranfenicol, trimetoprima, estreptotricina, rifampicina, eritromicina, fosfomicina, lincomicina e antissépticos da família dos compostos quaternários de amônio (Mazel, 2006). *Integrans* de classe 1 foram identificados como fonte primária de genes de resistência tanto em bactérias Gram negativas, como em Gram positivas (Shi *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007, 2008a e 2008b), porém são descritos frequentemente em bactérias Gram negativas, incluindo *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Vibrio* e em *Mycobacterium* (Yu *et al.*, 2013).

Figura 5 - Estrutura básica de um *integron* de classe 1.



Genes e ORFs nas regiões 5'-CS e 3'-CS estão indicadas por retângulos amarelos. Um *integron* é composto por três elementos básicos na região conservada 5': o gene codificador da integrase (*intI*), o sítio de recombinação (*attI*) e o promotor P_c . Na região 3'-CS, podem ser observados genes que codificam resistência a compostos quaternários de amônio (*qacEΔ1*) e sulfonamidas. O processo pelo qual um cassete gênico circular (gene de resistência 2) é inserido no sítio *attI* no *integron* de classe 1 contendo um cassete residente (gene de resistência 1) está representado na figura (seta vermelha). Cassetes de genes de resistência inseridos no *integron* estão indicados por retângulos azul e verde e a barra vertical preta representa o sítio *attC* de recombinação. P_1 e P_2 são os promotores associados ao *integron*; P_{int} é o promotor do gene da integrase (Adaptado de Carattoli, 2001).

Na classe 2, incluem-se os *integrans* pertencentes à família Tn7 de transpósons (Carattoli, 2001). Apenas seis cassetes de resistência foram descritos para esta classe de *integrans* (Mazel, 2006). Os *integrans* de classe 2 são observados principalmente em microrganismos Gram negativos (van Essen-Zandbergen *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009).

Os *integrons* de classe 3 contêm o cassete *bla*_{IMP}, que confere resistência a β -lactâmicos de amplo espectro (incluindo os carbapenêmicos). Possui, ainda, o gene da integrase (*intI3*) e sítios atípicos de recombinação (Carattoli, 2001). Eles parecem estar localizados em um transpóson inserido em um plasmídeo ainda não caracterizado (Mazel, 2006).

Os cassetes gênicos encontrados nos *integrons* são muito variáveis. Mais de 60 cassetes diferentes, que incluem genes que conferem resistência a uma ampla gama de classes de drogas antimicrobianas e desinfetantes, já foram descritos. A possibilidade de ocorrência de mais de um cassete em um único *integron* está fortemente associada à resistência múltipla a antimicrobianos (Yan *et al.*, 2010). Apesar das diferenças nas sequências da integrase e nos sítios *attI* das diferentes classes de *integrons*, os mesmos cassetes parecem poder ser adquiridos pelos *integrons* das três classes (Carattoli, 2001). Na verdade, *integrons* com arranjos idênticos de cassetes foram identificados em diversas espécies, o que sugere a existência de mecanismos semelhantes de aquisição de multirresistência (Yan *et al.*, 2010).

O estudo de *integrons* e cassetes gênicos associados pode fornecer informações importantes sobre o mecanismo de aquisição de genes de resistência a múltiplas drogas antimicrobianas em amostras clínicas, bem como contribuir para a seleção da terapia antimicrobiana mais adequada (Yan *et al.*, 2010).

A primeira descrição destes elementos genéticos em uma bactéria Gram positiva foi feita para *Corynebacterium glutamicum* (Nesvera *et al.*, 1998), enquanto, o primeiro relato da presença de *integron* em amostra de *Enterococcus* ocorreu em 1999 (Clark *et al.*, 1999), com a identificação do gene *aadA* em *E. faecalis* W4470. Posteriormente, em 2010, Xu e colaboradores identificaram três diferentes arranjos de cassetes gênicos em *integrons* de onze amostras de *E. faecalis* e, pela primeira vez, relataram a presença de *integron* em *E. faecium* (*dfrA12-orfF-aadA2*, *dfrA17-aadA5* e *aadA2*).

1.5 A participação dos *Enterococcus* nas infecções da corrente sanguíneas (ICS) e do trato urinário (ITU)

1.5.1 Infecções da corrente sanguínea (ICS)

Infecções da corrente sanguínea (ICS) estão associadas a taxas elevadas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Embora os termos bacteremia e infecção da corrente sanguínea sejam, frequentemente, utilizados como sinônimos, existem diferenças importantes no significado dos mesmos (Laupland, 2013). Bacteremia é definida como a presença de bactérias viáveis na corrente sanguínea. Pode ocorrer como consequência de atividades diárias, como escovação de dentes, e de alguns procedimentos simples, médicos ou odontológicos. Neste caso, trata-se de uma condição transiente, benigna, na qual o sistema imunológico do hospedeiro elimina as bactérias da circulação. Por outro lado, na falha destes mecanismos ou na presença de lesões anatômicas, fluxo sanguíneo turbulento ou materiais estranhos, pode ocorrer evolução para um quadro infeccioso e sepse (Christaki & Giamarellos-Bourboulis, 2013). Estes quadros infecciosos são, geralmente, classificados como primários (sem foco definido) ou secundários, quando associados a uma confirmação clínica ou microbiológica de infecção em um sítio corporal determinado (Laupland, 2013).

A incidência das ICS, tanto de origem comunitária como nosocomial, tem aumentado significativamente nos últimos anos. Observa-se predomínio entre homens, principalmente mais velhos, e entre pacientes muito jovens ou idosos. Destacam-se, como origem de bacteremia, infecções intra-abdominais e dos sistemas respiratório e urinário. Em cerca de 10% dos casos, a origem não pode ser definida (Christaki & Giamarellos-Bourboulis, 2013).

No que se refere à etiologia, existem variações de acordo com idade, localização geográfica, ambiente e comorbidades. Entre os principais agentes da doença, destacam-se *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (Siegman-Igra *et al.*, 2002; Kollef *et al.*, 2011; Vallés *et al.*, 2013).

As taxas de mortalidade associadas a ICS variam amplamente. São relatados valores entre cerca de 4% a mais de 40%, influenciados por fatores como idade, gravidade da doença e presença de sepse ou choque séptico (Siegman-Igra *et al.*, 2002; Vallés *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2010; Kollef *et al.*, 2011; Sogaard *et al.*, 2011; Kanoksil *et al.*, 2013; Laupland *et al.*, 2013;

Vallés *et al.*, 2013). Apesar do aumento da frequência da doença em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (de 9 para 24,4 casos/1000 admissões) entre os anos de 1993 e 2007, a mortalidade associada decaiu aproximadamente 20% no mesmo período - baseado em dados de diferentes países como Tailândia, Dinamarca e Finlândia (Christaki & Giamarellos-Bourboulis, 2013; Vallés *et al.*, 2013;). A evolução da doença também varia de acordo com sua etiologia. Casos relacionados a *Candida* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus* spp. são, frequentemente, fatais (Al Mohajer & Darouiche, 2012).

No Brasil, os enterococos são classificados como o oitavo agente causador de ICS, sendo o terceiro dentre os cocos Gram positivos (Gales *et al.*, 2009). Dessa forma, em recente pesquisa epidemiológica conduzida por Marra e colaboradores (2011), verificou-se que os *Enterococcus* spp. respondem por 4,5% das ICS, resultando numa taxa de mortalidade de 49,5%.

1.5.2 Infecções do trato urinário (ITU)

As ITUs estão entre as doenças infecciosas bacterianas em humanos mais prevalentes em todo o mundo (aproximadamente 150 milhões de casos por ano) e são a forma mais comum de infecção enterocócica (Abat *et al.* 2016, Fallah *et al.*, 2017). Ocorrem, com maior frequência, em mulheres, devido, entre outros fatores, à própria anatomia do trato geniturinário feminino, em que a uretra é mais curta, facilitando a contaminação de origem fecal (Abat *et al.* 2016).

Embora não seja comum, as ITUs podem causar bacteremia, inclusive, evoluindo para óbito (Nielubowicz & Mobley, 2010; Abat *et al.*, 2016). *E. coli* é a bactéria mais predominantemente associada à etiopatogenia de ITU, e *S. saprophyticus* também se destaca neste tipo de infecção. Entretanto, *Enterococcus* spp., principalmente *E. faecalis*, têm emergido como agentes importantes da doença (Jane & Desforges, 1993; Ramakrishnan & Scheid, 2005; Zhanel *et al.*, 2006; John & Carvalho, 2011), sendo que hoje as ITUs são a forma mais comum de doença infecciosa enterocócica (Lebreton *et al.*, 2014).

As ITU podem ter origem comunitária ou nosomial. No que se refere à ITU comunitária, estima-se que a doença acometa cerca de metade da população mundial. No Brasil, aproximadamente 80% das consultas clínicas são relativas a infecções do trato urinário, destacando-se o alto número de casos de cistites em mulheres (Vasco, 2016; Poletto & Reis,

2005; Amadeu *et al.*, 2009). As ITUs nosocomiais são responsáveis por aproximadamente 40% de todas as IRAS, muitas vezes, associadas à resistência antimicrobiana. Devido às limitações terapêuticas, o tratamento dos microrganismos multirresistentes relacionados a essas infecções vem se tornando um grande desafio para a saúde pública em todo mundo (Fallah, 2017; Poletto & Reis, 2005; Amadeu *et al.*, 2009). Os enterococos (*E. faecalis* e *E. faecium*) são responsáveis por um pequeno número de casos de ITU comunitária, porém estão associados a 15% a 30% das infecções do trato urinário relacionadas à assistência à saúde (Hidron *et al.*, 2008; Kline & Lewis, 2016). Pacientes em uso de cateteres urinários são frequentemente infectados por espécies de *Enterococcus* (John & Carvalho, 2011). Além disso, Murray (1990) demonstrou que, quatro em cada nove pacientes com bacteremia associada a *Enterococcus* apresentam ITU (Lebreton *et al.*, 2014).

Infecção devido a linhagens de *Enterococcus* resistentes a múltiplas drogas é, hoje, um problema médico de grande importância (Kline & Lewis, 2016). Não inesperadamente, VRE tornou-se um dos principais agentes patogênicos do sistema urinário associados aos cuidados de saúde entre os pacientes com UTI (Hidron *et al.*, 2008).

2 JUSTIFICATIVA

Enterococcus tem sido considerado um patógeno de importância crescente, principalmente no que se refere às IRAS. Isto se deve não apenas à sua capacidade de sobreviver em condições extremas e à sua resistência intrínseca a diversos antimicrobianos, mas também à sua facilidade em adquirir novos genes de resistência por transferência horizontal. Considerando-se a importância de se conhecer a biologia do microrganismo que se está tentando combater, caracterizar os representantes do gênero *Enterococcus* isolados de amostras clínicas, dos pontos de vista genotípico e fenotípico, em especial, em relação a aspectos da virulência e da resistência a drogas antimicrobianas, é de fundamental importância. A resistência a antimicrobianos possui ainda um fator agravante, que é a capacidade de o microrganismo transmitir os genes associados a esta característica entre bactérias não só da mesma espécie, mas, até mesmo, de grupos taxonomicamente não tão próximos. Nas últimas décadas, os *integrons* foram identificados como unidades genéticas presentes em ampla gama de grupos bacterianos, caracterizados pela sua habilidade de capturar elementos *móveis* pequenos, denominados cassetes gênicos, que, muitas vezes, carregam genes que codificam resistência a antimicrobianos. Estes elementos genéticos constituem um poderoso vetor de multirresistência a antimicrobianos. Apesar de serem mais frequentemente descritos em bactérias Gram negativas, *integrons* também são encontrados em bactérias Gram positivas, inclusive *Enterococcus*. Entretanto, o volume de estudos que relatam a pesquisa e a caracterização de *integrons* e cassetes gênicos no microrganismo é muito tímido, inclusive no Brasil, o que demonstra a necessidade de novas investigações. Assim, com base nos dados expostos, foi proposto este estudo, de caráter epidemiológico, que busca contribuir para o conhecimento relativo a diversidade e aspectos da virulência e resistência a drogas antimicrobianas de amostras clínicas e indígenas de *Enterococcus* isoladas de pacientes com ICS ou ITU e de indivíduos voluntários saudáveis.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Caracterizar amostras de *Enterococcus* isoladas de indivíduos saudáveis (comunidade) e pacientes com ICS ou ITU, no que se refere a diversidade, virulência e resistência a drogas antimicrobianas, empregando-se abordagens fenotípica e genotípica.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar, no nível de espécie, as amostras de *Enterococcus* incluídas no estudo.
- Avaliar a capacidade de produção de gelatinase e citolisina pelas bactérias.
- Avaliar e caracterizar a capacidade de produção de biofilme pelas amostras.
- Caracterizar geneticamente as amostras de *Enterococcus* recuperadas de pacientes com ICS quanto a presença de genes associados à virulência.
- Investigar o perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobianas das amostras de *Enterococcus* incluídas no estudo por abordagens fenotípica e genotípica.
- Investigar a presença de *integrons* nas amostras de *Enterococcus*.
- Estabelecer a correlação genética entre as amostras de *Enterococcus* incluídas no estudo empregando-se a técnica de tipagem por meio de (GTG)₅ rep-PCR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras bacterianas: isolamento, identificação e aspectos éticos

Foram incluídas no estudo 103 amostras de *Enterococcus*, pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios/ICB/UFMG, que vêm sendo mantidas em *freezer* -80 °C.

Estas amostras foram divididas em três grupos, de acordo com a origem:

- Comunidade (n=33): Uma amostra de fezes de indivíduos saudáveis da comunidade da Universidade Federal de Minas Gerais foi inoculada em *Brain Heart Infusion*¹ salgado (BHI + 6,5% de NaCl) e o material foi incubado por 24 h, a 37 °C. Em seguida, uma alíquota foi semeada, por esgotamento, em Ágar Mitis-Salivarius² e incubada por 24 h, a 37 °C. Por fim, foram selecionadas colônias de coloração azul escura ou negra, que foram repicadas em Ágar Bile-Esculina³. As amostras cujas colônias apresentavam aspecto característico de *Enterococcus* foram submetidas a teste para verificação da produção de catalase e coloração de Gram. Amostras coletadas entre abril e junho de 2017.

- ITU (n=35): As amostras de *Enterococcus* foram isoladas em urocultura, de acordo com os procedimentos diagnósticos empregados no Laboratório Hermes Pardini (Belo Horizonte). Amostras coletadas entre março e abril de 2017.

- ICS (n=35): As amostras de *Enterococcus* foram isoladas em hemoculturas de pacientes com ICS internados em diferentes hospitais (Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Hospital Evangélico, Hospital Municipal Odilon Behrens, Hospital João XXIII, Hospital Semper e Santa Casa de Belo Horizonte) de Belo Horizonte. Amostras coletadas durante os anos de 2008 e 2009.

O projeto foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa dos Hospitais participantes e do COEP/UFMG (ETIC 114/08). Não foram identificados pacientes, nem utilizados dados clínicos referentes aos mesmos.

¹ BD, Franklin Lakes, NJ, EUA

² BD

³ BD

Como controle positivo para as reações de amplificação, foram utilizadas as bactérias listadas abaixo, que foram gentilmente cedidas pelas professoras Ana Lúcia Costa Darini (Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo) e Lúcia Martins Teixeira (Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro):

- Identificação de espécie: *E. faecalis* NCTC775, *E. faecium* NCTC717, *E. gallinarum* NCTC12359 e *E. casseliflavus* NCTC1261.
- *Integrans* (Clímaco, 2011): *Klebsiella pneumoniae* 24 (*intI1*) e *P. aeruginosa* 123 (*intI2*).
- Resistência à vancomicina (Silva, 2012): *E. faecalis* HC49 (*vanA*) e *E. faecium* vanB (*vanB*).
- Fatores de patogenicidade (Camargo *et al.*, 2006; Camargo *et al.*, 2008): VREFSiph-11 (*gelE* e *esp*), VSEFSchs-8 (*gelE*; óperon *cyl*) e VREFMiph-17 (*hyl* e *esp*).
- Resistência a antimicrobianos (Santos *et al.*, 2017): *E. faecalis* RS-75 [*ant*-(6')-Ia] e *Streptococcus* grupo B RS-82 [*tet*(M)], RS-83 [*tet*(O)], RS-84 [*tet*(L)], grupo C RS-79 (*ermA*) e grupo G RS-77 (*mefA*), 78 (*ermB*).

4.2 Extração do DNA bacteriano

A extração do DNA das amostras bacterianas foi feita pelo método descrito por Fox *et al.* (1994), com modificações. Após cultivo em meio TSA⁴, por 24 h, a 37 °C, as culturas bacterianas foram dissolvidas em água Milli-Q^{®5} estéril e o material foi centrifugado. O *pellet* celular obtido foi ressuspensionado em 100 µL de tampão STET (Sacarose⁶ 8%, Tris-HCl⁷ 50 mM,

⁴ Difco, Sparks, MD, EUA

⁵ Direct-Q 3; Millipore, Molsheim, França

⁶ Inlab, São Paulo, SP, Brasil

⁷ Promega, Madison, WI, EUA

EDTA⁸ 50 mM, Triton X-100⁹ 0,1%; pH 8,0). A seguir, 60 µL de solução de lisozima¹⁰ 30 mg/mL foi adicionada à suspensão, sendo esta incubada a 37 °C por 12 min. Em seguida, foram adicionados 60 µL de SDS¹¹ 10% e 10 µL de RNase A¹² 0,5 mg/mL, e o material foi incubado a 37 °C por 1 h. Adicionou-se, então, 30 µL de proteinase K¹³ 10 mg/mL e a suspensão foi novamente homogeneizada e incubada *overnight* a 37 °C. À amostra foram adicionados 75 µL de NaCl¹⁴ 5 M e o tubo foi invertido de forma suave para homogeneização. Foram adicionados 60 µL de solução CTAB¹⁵ 5% p/v/NaCl 0,7 M, a solução foi gentilmente agitada e incubada por 10 min a 56 °C. O DNA foi extraído adicionando-se à amostra 350 µL de fenol¹⁶ (equilibrado em Tris-HCl 500 mM, pH 8,0) e 350 µL de clorofórmio¹⁷. A seguir, a mistura foi homogeneizada e centrifugada em baixa rotação por 4 min. A fase superior foi removida e transferida para outro tubo. O procedimento foi repetido por cerca de três vezes. O DNA foi, então, precipitado a - 20 °C, *overnight*, pela adição de 60 µL de acetato de sódio¹⁸ 3 M e 750 µL de etanol absoluto¹⁹. Após este período, a suspensão foi centrifugada a 12000 g, por 75 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e foram acrescentados 750 µL de etanol 70%. A suspensão foi novamente centrifugada a 12000 g, por 25 min, a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e os tubos contendo as amostras de DNA foram mantidos abertos, vertidos sobre papel absorvente, para evaporação do etanol residual. O sedimento de DNA foi diluído em 50 µL de água Milli-Q® estéril. A amostra foi homogeneizada, a concentração de DNA foi medida em espectrofotômetro²⁰, empregando-se comprimento de onda de 260 nm, e a relação DNA/proteína foi estimada utilizando-se, também, a leitura realizada a 280 nm. As amostras

⁸Life, Gairhesburg, MD, EUA

⁹ Calbiochem, La Jolla, CA, EUA

¹⁰Sigma-Aldrich

¹¹ Calbiochem

¹²Sigma-Aldrich

¹³Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

¹⁴Sigma-Aldrich

¹⁵Sigma-Aldrich

¹⁶Invitrogen

¹⁷Merck, Darmstadt, Alemanha

¹⁸Sigma-Aldrich

¹⁹Merck

²⁰ Nanodrop 1000; Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE, EUA

de DNA foram diluídas em água Milli-Q® estéril até concentração de 20 ng/mL. O material foi, então, mantido a -20 °C, até o momento de sua utilização.

4.3 Identificação fenotípica de *Enterococcus* no nível de espécie pelo sistema automatizado VITEK®2

Para a identificação fenotípica pelo sistema automatizado VITEK®2²¹, foram seguidas as instruções do fabricante. As amostras, após cultivo em TSA, por 18 h, a 37 °C, foram ajustadas até turvação correspondente à escala McFarland 0,5 em 3 mL de solução salina fornecida pelo fabricante. A identificação foi realizada utilizando-se os cartões GP, para cocos Gram positivos e bastonetes não esporulantes. A inoculação das suspensões nos cartões de identificação, a incubação e a leitura dos testes foram realizadas pelo aparelho, seguindo-se as instruções do fabricante.

4.4 Identificação genética de *Enterococcus* por PCR multiplex

A reação de amplificação foi feita em volume final de 25 µL, contendo 60 ng de DNA, 1 µM de cada *primer*²² (Quadro 1), 800 µM de dNTP²³, 0,025 U/µL de *Taq* DNA polimerase²⁴, 2 mM de MgCl₂²⁵ e tampão 1X²⁶. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 2 min; 30 ciclos a 94 °C por 60 s, 54 °C por 60 s e 72 °C por 60 s; e um ciclo de extensão final a 72 °C por 10 min (Dutka-Malen *et al.*, 1995). Em todos os lotes de reação, foram incluídos controles positivos (ver seção 4.1) e negativo (*mix* da reação, sem a adição de DNA).

²¹ bioMérieux, França

²² Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EUA

²³ Promega, Madison, WI, EUA

²⁴ Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil

²⁵ Phoneutria

²⁶ Phoneutria

Quadro 1 - *Primers* empregados na reação de amplificação para identificação genotípica de *Enterococcus* no nível de espécie.

GENE	FENÓTIPO/ PRODUTO DO GENE	AMPLICON (PB)	SEQUÊNCIA (5'→3')	REFERÊNCIA*
<i>ddl_{E. faecalis}</i>	D-Ala:D-Ala ligase (<i>E. faecalis</i>)	941	F: ATC AAG TAC AGT TAG TCT T R: ACG ATT CAA AGC TAA CTG	1
<i>ddl_{E. faecium}</i>	D-Ala:D-Ala ligase (<i>E. faecium</i>)	550	F: GCA AGG CTT CTT AGA GA R: CAT CGT GTA AGC TAA CTT C	2
<i>vanC1</i>	Fenótipo Van C1 (<i>E. gallinarum</i>)	822	F: GGT ATC AAG GAA ACC TC R: CTT CCG CCA TCA TAG CT	1
<i>vanC2/ vanC3</i>	Fenótipo VanC2/C3 (<i>E. casseliflavus</i>)	439	F: CTC CTA CGA TTC TCT TG R: CGA GCA AGA CCT TTA AG	1

*, 1 - Dutka-Malen *et al.* (1995); 2 - Silva *et al.* (2012).

4.5 Avaliação da produção de gelatinase e citolisina/hemolisina

Para avaliação da produção de gelatinase, as bactérias foram inoculadas, em estria, em ágar nutriente²⁷ acrescido de 3% de gelatina²⁸ e o material foi incubado a 37 °C, por 18 h. A seguir, as culturas foram armazenadas a 4 °C, por 5 h e, então, foi realizada a leitura, por meio da avaliação da presença de zonas claras ao redor das colônias, indicativas de hidrólise da gelatina, decorrente da ação da gelatinase (Gonçalves *et al.*, 2013).

Para investigação da produção de citolisina/hemolisina, as amostras foram inoculadas, também em estria, em meio TSA acrescido de 5% de sangue de cavalo. Após incubação a 37 °C, por 24 h, foi realizada a leitura, pela verificação da presença de zonas claras ao redor das colônias, indicativas de hemólise, decorrente da ação da hemolisina (Gonçalves *et al.*, 2013).

²⁷ BD

²⁸ Difco

4.6 Avaliação da produção de biofilme

O ensaio de avaliação da produção de biofilme foi realizado segundo protocolo descrito por López-Salas *et al.* (2013), com modificações. Após cultivo em TSA, por 18 h, a 37 °C, as culturas bacterianas foram ajustadas até turvação correspondente à escala McFarland 0,5. Em seguida, as amostras foram diluídas (1:40) em 200 µL de TSBg para, em seguida, serem inoculadas em microplacas de poliestireno de fundo chato com 96 poços e incubadas por 48 h, a 37 °C. As células planctônicas foram, então, removidas por inversão e o material foi processado. Nesse processo, as placas foram lavadas três vezes com solução salina (NaCl 0,9%) e deixadas secar por 15 min. Em seguida, foram coradas com solução de cristal violeta²⁹ por 15 min. O excesso de cristal violeta foi removido e a placa foi novamente lavada três vezes com solução salina. O cristal violeta aderido à microplaca foi solubilizado utilizando-se solução de etanol-acetona (80:20 v/v), por 15 min. Essa solução foi, então, transferida para uma nova microplaca e sua densidade óptica foi medida a 570 nm (OD₅₇₀). As amostras foram classificadas como produtoras de biofilme (absorbância > 0,5) ou não produtoras (absorbância ≤ 0,5). Além disto, a produção foi classificada como alta (absorbância > 2), moderada (absorbância entre > 1 e 2) ou baixa (absorbância entre > 0,5 e 1).

4.7 Estudo genético da virulência das amostras de *Enterococcus* do grupo ICS

A pesquisa de genes que codificam fatores de patogenicidade nas amostras de *Enterococcus* foi realizada por PCR, empregando-se *primers* descritos em estudos anteriores (Quadro 2). Controles positivos (ver seção 4.1) e negativo (*mix* sem adição de DNA) foram empregados em todas as reações.

Para os genes *gelE*, *cylA*, *cylM*, *efaAfs*, *efaAfm*, *cpd*, *cob*, *ccf* e *esp*, a reação de amplificação foi feita em volume final de 25 µL, contendo 60 ng de DNA, 0,4 µM de cada *primer*, 200 µM de dNTP, 0,02 U/µL de *Taq* DNA polimerase, 1,5 mM de MgCl₂ e tampão 1X. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: um ciclo inicial a 94 °C por 2 min, 55

²⁹ NewProv, Pinhais, PR, Brasil

°C por 2 min e 72 °C por 2 min seguido de 29 ciclos a 92 °C por 15 s, 55 °C por 15 s e 72 °C por 15 s (Eaton & Gasson, 2001).

Para o gene *ace*, a reação de amplificação foi feita em volume final de 25 µL, contendo 60 ng de DNA, 0,4 µM de cada *primer*, 800 µM de dNTP, 0,04 U/µL de *Taq* DNA polimerase, 1,5 mM de MgCl₂ e tampão 1X. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: 30 ciclos a 94 °C por 60 s, 56 °C por 60 s e 72 °C por 60 s (Mannu *et al.*, 2003).

Para o gene *hyl*, a reação de amplificação foi feita em volume final de 25 µL, contendo 60 ng de DNA, 0,1 µM de cada *primer*, 200 µM de dNTP, 0,05 U/µL de *Taq* DNA polimerase, 1,5 mM de MgCl₂ e tampão 1X (Vankerckhoven *et al.*, 2004). A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: 30 ciclos a 94 °C por 60 s, 56 °C por 60 s e 72 °C por 60 s (Klare *et al.*, 2005).

Para os genes *cylLI* e *cylLs*, a reação de amplificação foi feita em volume final de 25 µL, contendo 60 ng de DNA, 0,5 µM de cada *primer*, 100 µM de dNTP, 0,05 U/µL de *Taq* DNA polimerase, 2,5 mM de MgCl₂ e tampão 1X. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, 35 ciclos a 94 °C por 60 s, 55°C por 60 s e 72 °C por 2 min, seguido pela extensão final a 72 °C por 7 min (Semedo *et al.*, 2003).

Quadro 2 - Lista de *primers* utilizados nas reações de amplificação para a pesquisa dos genes associados à virulência das amostras de *Enterococcus*.

ALVO	PRODUTO/ FUNÇÃO DO GENE	SEQUÊNCIA (5'→3')	AMPLICON (PB)	REF.*
<i>gelE</i>	Gelatinase	F: ACC CCG TAT CAT TGG TTT R: ACG CAT TGC TTT TCC ATC	419	
<i>cylM</i>	Citolisina (modificador pós-traducional)	F: CTG ATG GAA AGA AGA TAG TAT R: TGA GTT GGT CTG ATT ACA TTT	742	
<i>cylA</i>	Citolisina (componente ativador)	F: TGG ATG ATA GTG ATA GGA AGT R: TCT ACA GTA AAT CTT TCG TCA	517	
<i>esp</i>	Proteína de superfície	F: TTG CTA ATG CTA GTC CAC GAC C R: GCG TCA ACA CTT GCA TTG CCG AA	933	
<i>efaAfs</i>	Proteína de adesão (<i>E. faecalis</i>)	F: GAC AGA CCC TCA CGA ATA R: AGT TCA TCA TGC TGT AGT A	705	1
<i>efaAfm</i>	Proteína de adesão (<i>E. faecium</i>)	F: AAC AGA TCC GCA TGA ATA R: CAT TTC ATC ATC TGA TAG TA	735	
<i>cpd</i>	Feromônio sexual	F: TGG TGG GTT ATT TTT CAA TTC R: TAC GGC TCT GGC TTA CTA	782	
<i>cob</i>	Feromônio sexual	F: AAC ATT CAG CAA ACA AAG C R: TTG TCA TAA AGA GTG GTC AT	1405	
<i>ccf</i>	Feromônio sexual	F: GGG AAT TGA GTA GTG AAG AAG R: AGC CGC TAA AAT CGG TAA AAT	543	
<i>ace</i>	Fator acessório de colonização (adesina de colágeno)	F: AAA GTA GAA TTA GAT CCA CAC R: TCT ATC ACA TTC GGT TGC G	320	2
<i>hyl</i>	Hialuronidase	F: GAG TAG AGG AAT ATC TTA GC R: AGG CTC CAA TTC TGT	661	3
<i>cylI</i>	Citolisina (unidade estrutural)	F: GAT GGA GGG TAA GAA TTA TGG R: GCT TCA CCT CAC TAA GTT TTA TAG	253	4
<i>cylLs</i>	Citolisina (unidade estrutural)	F: GAA GCA CAG TGC TAA ATA AGG R: GTA TAA GAG GGC TAG TTT CAC	240	

*, 1 - Eaton & Gasson (2001); 2 - Mannu *et al.* (2003); 3 - Klare *et al.* (2005); 4 - Smedo *et al.* (2003).

4.8 Avaliação do perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobianas das amostras

A avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das amostras em estudo foi realizada pelo método de difusão em ágar, segundo especificações do CLSI (2015). Colônias de *Enterococcus* obtidas em TSA foram transferidas para tubos contendo solução salina (0,85% NaCl) até turvação correspondente à escala McFarland 0,5. A seguir, as suspensões bacterianas foram semeadas por toda a superfície do Ágar Mueller Hinton³⁰ com auxílio de *swab* estéril. Decorridos cerca de 5 min, discos comerciais impregnados com

³⁰ Difco

antimicrobianos³¹ (Quadro 3) foram depositados na superfície do meio de cultura, mantendo-se distância mínima de 24 mm entre os centros dos discos.

A leitura foi realizada após 16-18 h de incubação (24 h para vancomicina), a 37 °C, por meio da medida dos diâmetros dos halos de inibição das amostras bacterianas e comparação com a classificação preconizada pelo CLSI (Quadro 3). Como controle, foi utilizada a amostra *S. aureus* ATCC 25923.

Quadro 3 - Antimicrobianos, concentrações e padrão de interpretação para *Enterococcus* spp., segundo protocolo do CLSI (2015).

ANTIMICROBIANO	SIGLA	CLASSE	DIÂMETRO DO HALO (mm) ¹		
			SENSÍVEL	INTERMEDIÁRIO	RESISTENTE
Ampicilina 10 µg	AMP	Penicilinas	≥ 17	-	≤ 16
Ciprofloxacino 30 µg	CIP	Fluoroquinolonas	≥ 21	16-20	≤ 15
Cloranfenicol 30 µg	CLO	Fenicol	≥ 18	13-17	≤ 12
Eritromicina 15 µg	ERI	Macrolídeos	≥ 23	14-22	≤ 13
Levofloxacino 5 µg	LVX	Fluoroquinolonas	≥ 17	14-16	≤ 13
Linezolida 30 µg	LZD	Oxazolidinonas	≥ 23	21-22	≤ 20
Penicilina G 10 U.I.	PEN	Penicilinas	≥ 15	-	≤ 14
Tetraciclina 30 µg	TET	Tetraciclina	≥ 19	15-18	≤ 14
Vancomicina 30 µg	VAN	Glicopeptídeo	≥ 17	15-16	≤ 14

¹, Referência: Tabela 2D - CLSI M100-S25, 2015.

Para ser classificada como multidroga-resistente (MDR), a amostra deve apresentar resistência a, pelo menos, três agentes antimicrobianos de, pelo menos, três classes diferentes, como definido por Abamecha *et al.* (2015).

4.9 Pesquisa de *integrans* nas amostras de *Enterococcus*

Para a pesquisa de *integrans* e cassetes gênicos associados à resistência a drogas antimicrobianas, foram empregados os *primers* descritos no Quadro 4.

³¹Cecon, São Paulo, SP, Brasil

Quadro 4 - Lista de *primers* utilizados na reação de amplificação para pesquisa dos genes *int11* e *int12* (genes que codificam integrases).

ALVO	SEQUÊNCIA (5'→3')	AMPLICON (PB)	REFERÊNCIA
<i>int11</i>	F: ACG AGC GCA AGG TTT CGG T R: GAA AGG TCT GGT CAT ACA TG	565	Su <i>et al.</i> , 2006
<i>int12</i>	F: GTG CAA CGC ATT TTG CAG G R: CAA CGG AGT CAT GCA GAT G	403	

A reação de amplificação foi feita em volume final de 25 μ L, contendo 60 ng de DNA, *primer* (4 μ M para os *primers int11*; 3 μ M para os *primers int12*), 800 μ M de dNTP, 0,025 U/ μ L de *Taq* DNA polimerase, 1,5 mM de MgCl₂ e tampão 1X. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; 30 ciclos a 94 °C por 30 s, 52 °C por 30 s e 72 °C por 2 min e um ciclo de extensão final a 72 °C por 7 min (Su *et al.*, 2006). Em todos os lotes de reação foram incluídos controles positivos (ver seção 4.1) e negativo (*mix* da reação, sem a adição de DNA).

4.10 Estudo genético da resistência a antimicrobianos das amostras de *Enterococcus*

A pesquisa de genes que codificam resistência a drogas antimicrobianas e fatores de patogenicidade nas amostras de *Enterococcus* foi realizada por PCR, empregando-se *primers* e condições descritos em estudos anteriores (Quadro 5). Controles positivos e negativo (*mix* sem adição de DNA) serão empregados em todas as reações.

Quadro 5 - Reações de amplificação para pesquisa de genes que codificam resistência a drogas antimicrobianas em *Enterococcus*.

ALVO*	SEQUÊNCIA (5'→3')	COMPOSIÇÃO DO MIX	CONDIÇÕES DA REAÇÃO	AMPLICON (pb)	REF.
<i>TetM</i>	F: GTG GAC AAA GGT ACA ACG AG R: CGG TAA AGT TCG TCA CAC AC	<i>primer</i>		406	
<i>TetO</i>	F: AAC TTA GGC ATT CTG GCT CAC R: TCC CAC TGT TCC ATA TCG TCA	<i>erm(A)</i> : 0,5 µM <i>erm(B)</i> : 0,5 µM <i>mef (A/E)</i> : 0,2 µM	93 °C, 3 min	515	
<i>TetL</i>	F: TGG TGG AAT GAT AGC CCA TT R: CAG GAA TGA CAG CAC GCT AA	<i>tet(M)</i> : 0,4 µM <i>tet(O)</i> : 0,3 µM <i>tet(L)</i> : 0,4 µM	30 x 93 °C, 1 min 62 °C, 1 min 65 °C, 4 min	229	Malhotra-Kuma <i>et al.</i> , 2005
<i>ErmA</i>	F: CCC GAA AAT ACG CAA AAT TTC AT R: CCC TTT TAC CCA TTT ATA AAC G	dNTP: 0,2 mM MgCl ₂ : 1,5 mM <i>Taq</i> DNA polimerase: 2 U	65 °C, 3 min	590	
<i>ErmB</i>	F: TGG TAT TCC AAA TGC GTA ATG R: CTG TGG TAT GGC GGG TAA GT			745	
<i>mefA/E</i>	F: CAA TAT GGG CAG GGC AAG R: AAG CTG TTC CAA TGC TAC GG			317	
<i>ant(4')-la</i>	F: CTG CTA AAT CGG TAG AAG C R: CAG ACC AAT CAA CAT GGC ACC	<i>primer</i> : 6,5 mg/mL dNTP: 0,2 mM MgCl ₂ : 1,5 mM <i>Taq</i> DNA polimerase: 0,25 U/µL	35 x 94 °C, 1 min, 55 °C, 1 min, 72 °C, 1 min	294	Fluit <i>et al.</i> , 2003
<i>vanA</i>	F: GGG AAA ACG ACA ATT GC R: GTA CAA TGC GGC CGT TA	<i>primer</i> : 0,4 µM dNTP: 0,2 mM MgCl ₂ : 1,5 mM	94 °C, 2min, 52 °C, 2min, 72 °C, 2min, 29 x	732	Dutka-Malen <i>et al.</i> , 1995
<i>vanB</i>	F: ATG GGA AGC CGA TAG TC R: GAT TTC GTT CCT CGA CC	<i>Taq</i> DNA polimerase: 0,4 U	94 °C, 25 s, 52 °C, 40 s, 72 °C, 50 s	635	

*Alvos: *tetM/O/L*, tetraciclina; *ermA/B*, eritromicina; *mefA/E*, eritromicina; *ant(4')-la*, aminoglicosídeos; *vanA/B*, vancomicina)

4.11 Correlação genética entre as amostras bacterianas avaliada pela metodologia (GTG)₅-PCR

O *rep-PCR fingerprinting* foi realizado utilizando-se o iniciador (5'-GTGGTGGTGGTGGT-3') e condições previamente descritas (Svec *et al.*, 2005), com modificações. O mix de PCR (25 µL) continha 60 ng de DNA, 1 µM do iniciador (GTG)₅, 2,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 2 U de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria) e tampão. A reação consistiu em um ciclo inicial de desnaturação (94 °C, 7 min), seguido por 30 ciclos de desnaturação (94 °C, 1 min), anelamento de iniciadores (40 °C, 1 min) e extensão (65 °C, 8 min). O último ciclo foi seguido por uma etapa final de extensão (65 °C, 16 min). Os *amplicons* obtidos foram separados por 16 h a 1,55 Vcm⁻¹ em gel de agarose 1,5% (p/v) (20 × 25 cm) contendo brometo de etídio (0,5 g mL⁻¹). Um

marcador de peso molecular de 1 Kb (Ludwig Biotec, Brasil) foi utilizado para permitir a normalização das imagens dos géis. Os géis foram fotodocumentados sob luz UV (302 nm) e analisados utilizando-se o *software* GelJ. Foi construído um dendrograma utilizando-se Coeficiente de Correlação de Pearson e, para a formação dos *clusters*, foi utilizada a metodologia UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*).

4.12 Construção dos gráficos

Os gráficos foram feitos no programa GraphPad Prism versão 6.00 para Windows (*GraphPad Software, San Diego, California, EUA*).

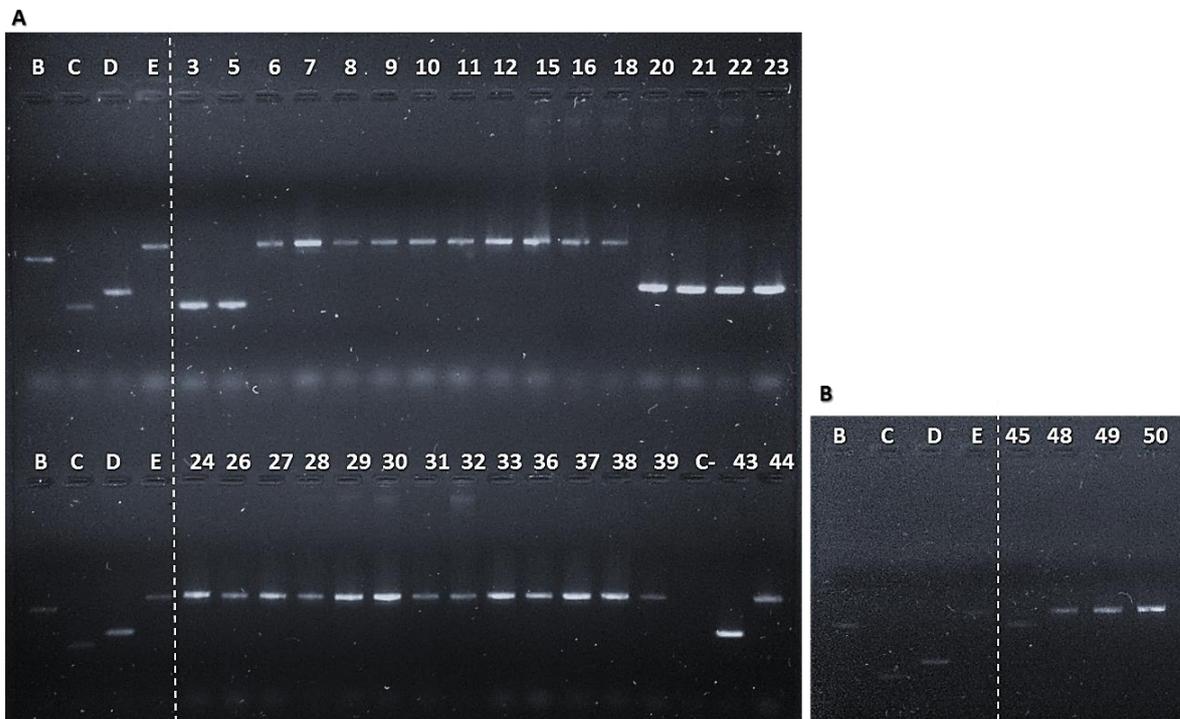
5 RESULTADOS

5.1 Identificação fenotípica das amostras de *Enterococcus* grupo ICS no nível de espécie pelo sistema automatizado VITEK®2 e confirmação genotípica por PCR *multiplex*

A identificação fenotípica das 35 amostras de *Enterococcus* recuperadas de pacientes com ICS pelo método automatizado VITEK®2 nos forneceu a seguinte distribuição: 27 amostras identificadas como *E. faecalis* (77,14%), cinco como *E. faecium* (14,29%) e três como *E. casseliflavus* (8,57%).

A confirmação da identificação foi, então, realizada por método genotípico (Figura 6) e mostrou que uma das amostras identificadas como *E. casseliflavus* correspondia à espécie *E. gallinarum* (amostra 45, figura 6B). As demais amostras foram identificadas similarmente pelas duas técnicas utilizadas. Houve, portanto, concordância de 97,14% (34/35) na identificação, no nível de espécie, entre as duas técnicas empregadas.

Figura 6 - Identificação genotípica de *Enterococcus* no nível de espécie.



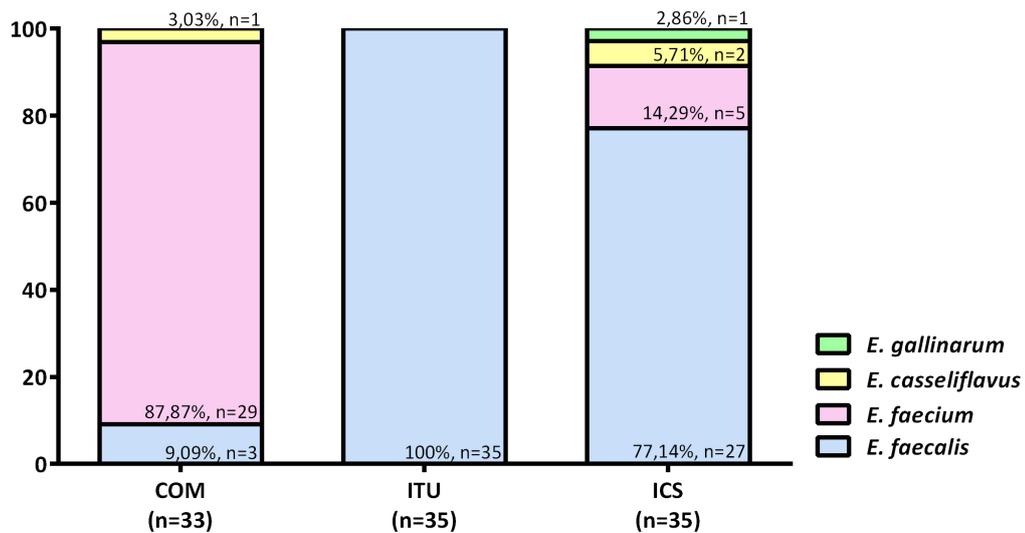
Legenda: B: *E. gallinarum*, 822 pb; C: *E. casseliflavus*, 439 pb; D: *E. faecium*, 550 pb; E: *E. faecalis*, 941 pb; C-: controle negativo da reação.

5.2 Identificação genotípica das amostras de *Enterococcus* no nível de espécie por PCR multiplex

A distribuição das espécies de *Enterococcus* para cada um dos grupos do estudo (Figura 7), considerando-se a metodologia de identificação genotípica foi:

- Grupo Comunidade: *E. faecium* - 29 amostras (87,87%), *E. faecalis* – três amostras (9,09%), *E. casseliflavus* - uma amostra (3,03%).
- Grupo ITU: *E. faecalis*- 35 amostras (100,00% .
- Grupo ICS: *E. faecalis* - 27 amostras (77,14%), *E. faecium* - cinco amostras (14,29%), *E. casseliflavus* - duas amostras (5,71%) e *E. gallinarum* - uma amostra (2,86%).

Figura 7 - Prevalência das espécies de *Enterococcus*.

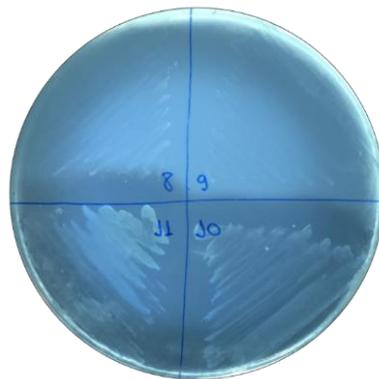


Considerando-se o panorama global das amostras, percebe-se uma predominância na recuperação da espécie *E. faecium* da coprocultura de indivíduos saudáveis da comunidade, enquanto nos grupos ICS e ITU, que incluía amostras associadas à etiopatogenia das doenças, a predominância foi da espécie *E. faecalis*.

5.3 Avaliação da produção de gelatinase e citolisina

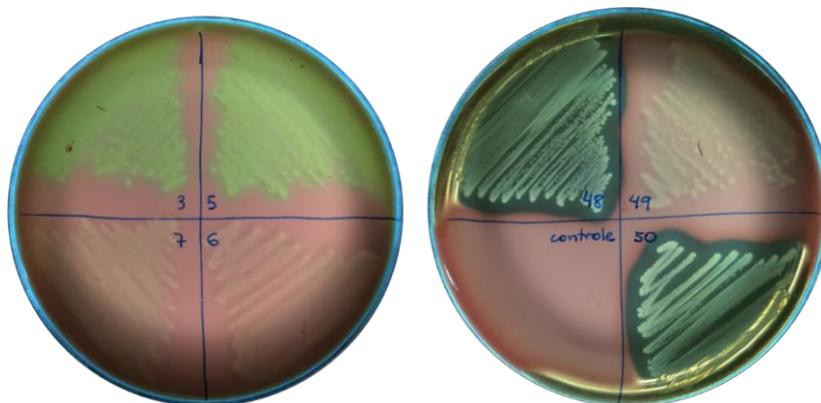
Abaixo são mostrados exemplos representativos dos resultados dos testes para a avaliação da capacidade de produção de gelatinase (figura 8) e de citolisina (figura 9).

Figura 8 - Exemplos representativos da presença e ausência de produção da enzima gelatinase em ágar nutriente acrescido de 3% de gelatina.



A turbidez das seções 8 e 9, indica a ausência de atividade da enzima gelatinase. As seções 10 e 11 apresentam áreas límpidas em torno do inóculos, indicando a degradação da gelatina pela enzima gelatinase produzida pelas amostras.

Figura 9 - Exemplos representativos de amostras α -, β - e não hemolíticas identificadas em ágar sangue (TSA + 5% de sangue de cavalo).



Há ausência de hemólise nas seções 6, 7 e 49 (comparar com a seção controle, na qual não houve inoculação de microorganismo). As amostras das seções 3 e 5 apresentaram hemólise parcial (α -hemólise), enquanto as das seções 48 e 50 apresentaram atividade hemolítica total (β -hemólise).

No grupo Comunidade, observamos taxas muito pequenas de produção das enzimas estudadas. A gelatinase foi expressa por duas amostras (6,06%; Figura 10A) e atividade hemolítica foi observada em três (9,09%; figura 11A) amostras. Apenas uma amostra de *E. faecium* foi capaz de produzir as duas enzimas.

No grupo ITU, observou-se a produção da enzima gelatinase em 15 (42,86%, Figura 10B) amostras e de citolisina em 11 (30,43%, Figura 11B) amostras. Apenas duas amostras produziram ambas as enzimas.

No grupo ICS, a capacidade de produção das enzimas gelatinase e citolisina foi detectada em 14 (40,00%) das amostras do estudo e não está distribuída de forma homogênea entre as espécies. Como pode ser observado na Figura 10C, a produção de gelatinase foi detectada em 14 das 27 amostras de *E. faecalis*. Na Figura 11C, observa-se que a produção de citolisina foi detectada em *E. gallinarum*, nas duas amostras de *E. casseliflavus*, em duas das quatro amostras de *E. faecium* e em nove das 27 amostras de *E. faecalis*. Além disso, dentre as amostras hemolíticas, apenas duas amostras de *E. faecalis* foram classificadas como β -hemolíticas. Dentre as 35 amostras do grupo, apenas cinco, todas *E. faecalis*, foram capazes de sintetizar ambas as enzimas.

Comparando-se as amostras hemolíticas dos grupos ITU e ICS, observamos a predominância de α -hemólise nas amostras "ICS" e de β -hemólise nas amostras "ITU".

Percebe-se que as amostras de *E. gallinarum* (n=1) e *E. casseliflavus* (n=3) foram capazes de produzir apenas citolisina. Além disso, observa-se que apenas *E. faecium* e *E. faecalis* foram capazes de produzir β -hemólise. Apenas oito (sete *E. faecalis* e uma *E. faecium*), das 103 amostras do estudo foram capazes de expressar ambas as enzimas.

Figura 10 - Distribuição das amostras de *Enterococcus* de acordo com a habilidade de produção da enzima gelatinase.

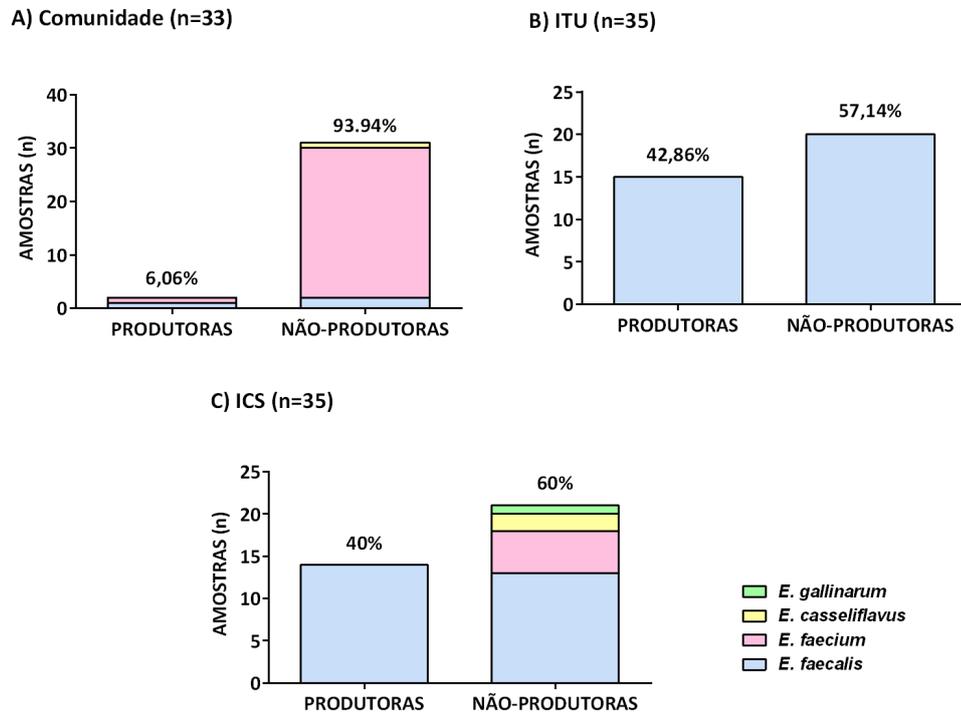
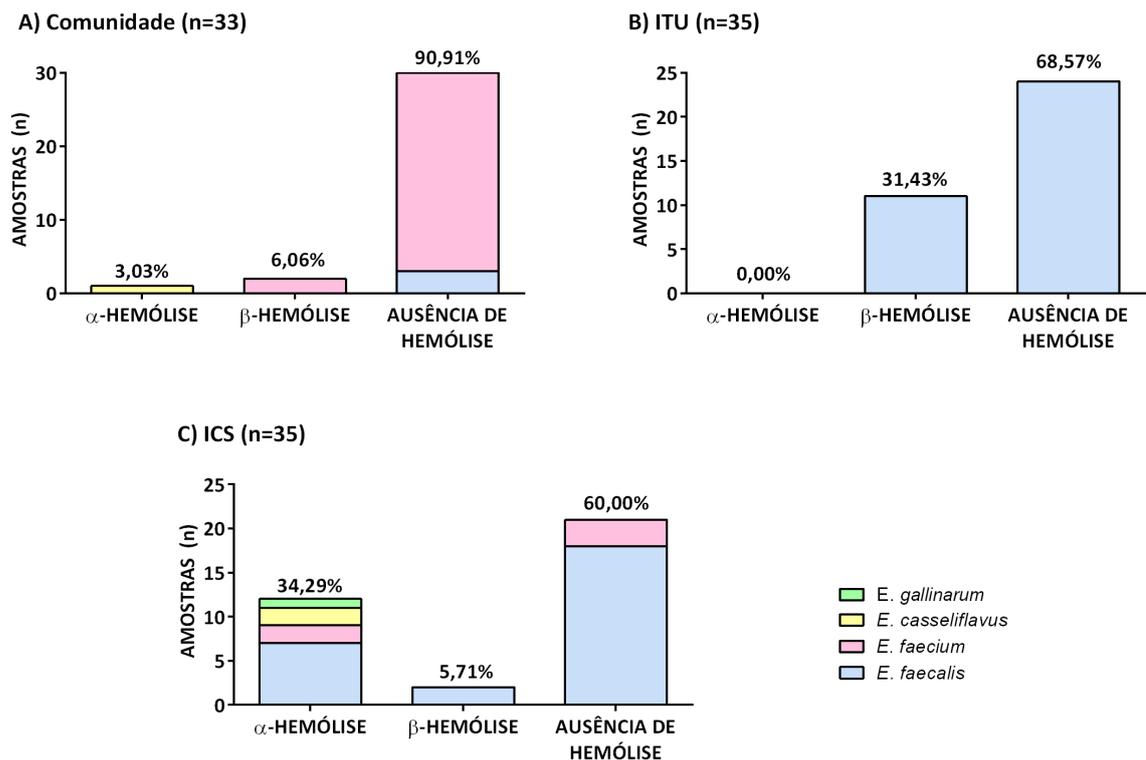


Figura 11 - Distribuição das amostras de *Enterococcus* como não-hemolíticas ou como amostras capazes de produzir α - ou β -hemólise.

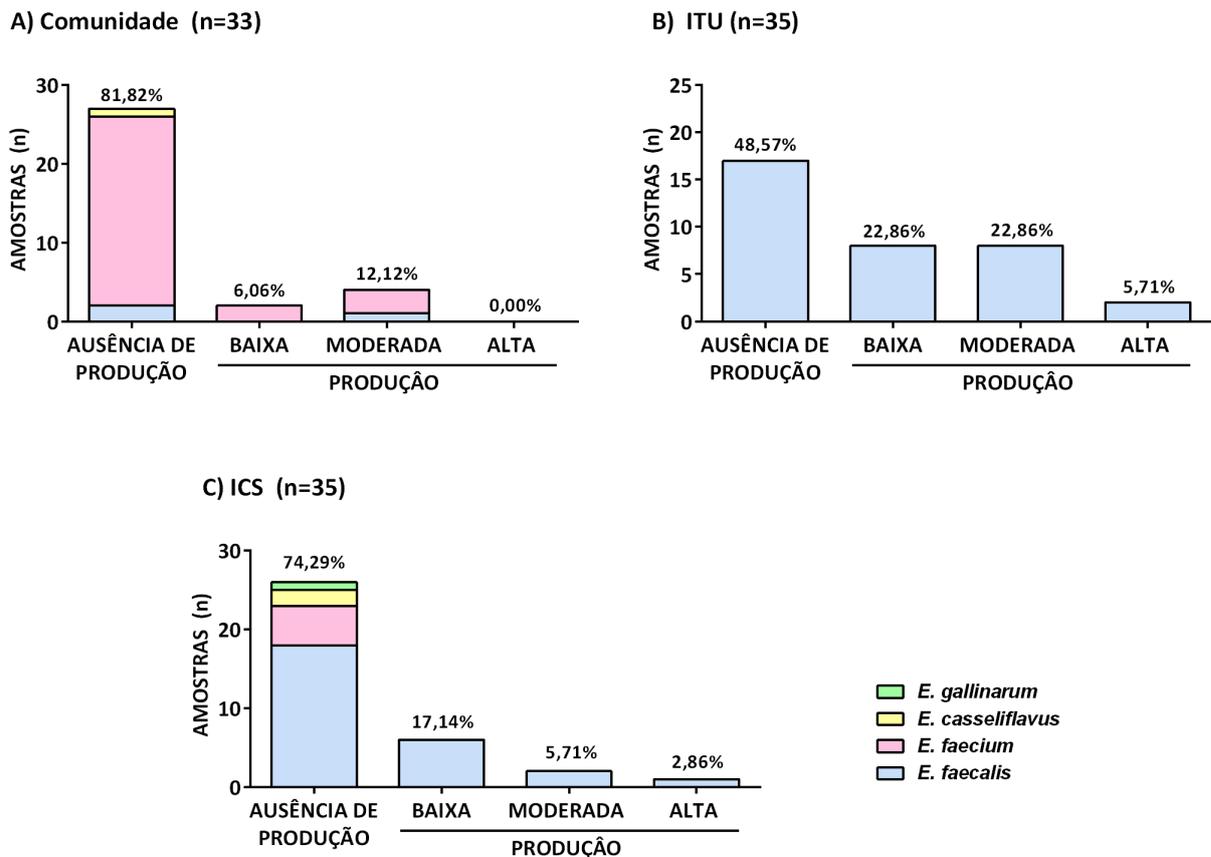


5.4 Avaliação da produção de biofilme

Em todos os grupos observa-se que grande parte das amostras bacterianas não foram capazes de produzir biofilme (Figura 12), apresentando taxas de 48,57% (n = 17) no grupo ITU, 74,29% (n = 26) no grupo ICS, e 81,82% (n = 27) no grupo Comunidade. As amostras do grupo ITU, portanto, foram as que apresentaram mais frequentemente capacidade de formação de biofilme, enquanto as amostras do grupo Comunidade apresentaram o menor percentual de amostras com capacidade de produção.

Dentre as espécies estudadas, *E. faecalis* mostra-se como mais apta a formar biofilme, enquanto *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* não apresentaram a habilidade.

Figura 12 - Distribuição da classificação das espécies de *Enterococcus* em relação à capacidade de produção de biofilme.



5.5 Estudo genético da virulência das amostras de *Enterococcus* do grupo ICS

Os resultados relativos à avaliação da presença dos genes que codificam gelatinase (*gelE*), proteína enterocócica de superfície (*esp*), antígeno A da endocardite (*efaAfs* e *efaAfm*), feromônios (*cpd*, *cob* e *ccf*), proteína ligadora de colágeno (*ace*), hialuronidase (*hyl*) e dos genes do óperon da citolisina (*cyIA/M/LI/Ls*) nas amostras do grupo ICS estão apresentados no Anexo 3A.

Observa-se que nas 35 amostras avaliadas, foram detectados os genes que codificam a gelatinase e o feromônio Ccf. Inversamente, o gene que codifica a hialuronidase (*hyl*) não foi detectado em nenhuma das amostras. O gene *efaAfs* foi detectado em 91,43% das amostras, enquanto o gene *efaAfm* foi detectado em apenas 14,29% das mesmas (Figura 13). A maioria das amostras possui entre cinco e sete dos genes de patogenicidade avaliados nesse estudo (Figura 14). Três amostras (8,57%) possuem nove dos genes e apenas uma (2,86%) possui quatro dos genes estudados.

Figura 13 - Frequência da distribuição dos genes de patogenicidade nas amostras de *Enterococcus*.

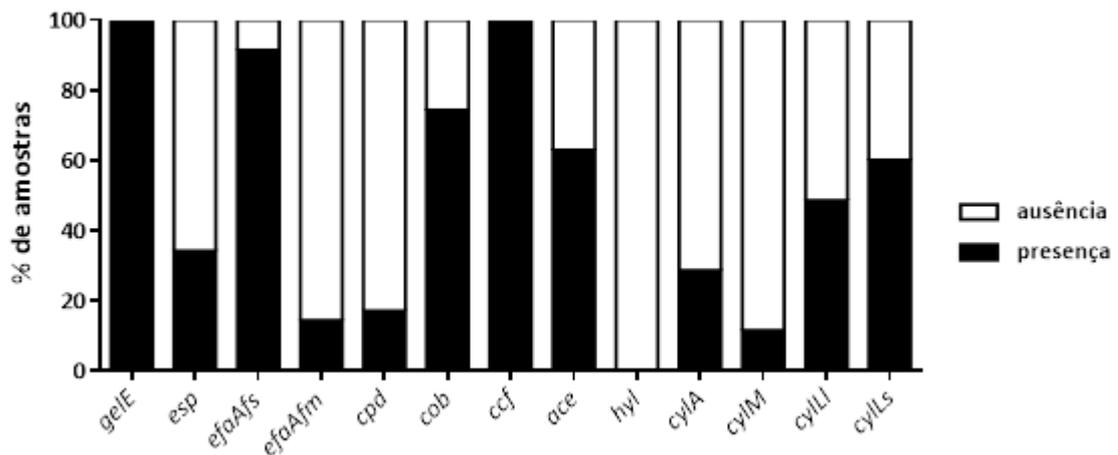
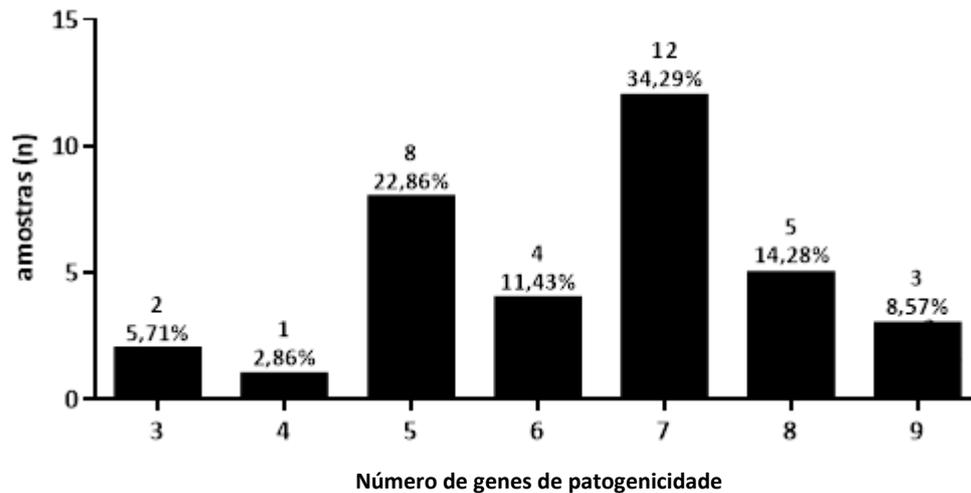


Figura 14 - Frequência da distribuição da quantidade de genes de patogenicidade identificado nas amostras.



5.6 Avaliação do perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobianas das amostras de *Enterococcus*

Considerando-se o total de bactérias (n=103) e o número de antimicrobianos testados (n=9), foram realizados 927 testes de antibiogramas, assim divididos entre os grupos: 297 para o grupo Comunidade e 315 para os grupos ITU e ICS.

Para o grupo Comunidade, 83,84% dos testes identificaram amostras sensíveis, 2,36% identificaram amostras resistentes e amostras com resistência intermediária foram identificadas em 13,80% dos testes realizados (Tabela 1, Figura 15A). Observamos para todas as espécies e no perfil geral do grupo, mais de 80,00% de sensibilidade aos antimicrobianos.

Para o grupo ITU, 71,75% dos testes identificaram amostras sensíveis, 19,37% identificaram amostras resistentes e amostras com resistência intermediária foram identificadas em 8,89% dos testes realizados (Figura 15B).

Para o grupo ICS, 54,60% dos testes identificaram amostras sensíveis, 26,98% identificaram amostras resistentes e amostras com resistência intermediária foram identificadas em 18,41% dos testes realizados (Figura 15C). A espécie *E. gallinarum* apresentou a maior frequência relativa de resistência, sendo 66,66% dos testes indicativos de resistência ou resistência intermediária. A frequência relativa de resistência em *E. faecium*

também foi elevada, atingindo 60,00% dos testes realizados. Com 72,22% dos testes indicando sensibilidade, *E. casseliflavus* foi a espécie que apresentou maior frequência relativa de amostras sensíveis aos antimicrobianos testados (Tabela 1, Figura 15C).

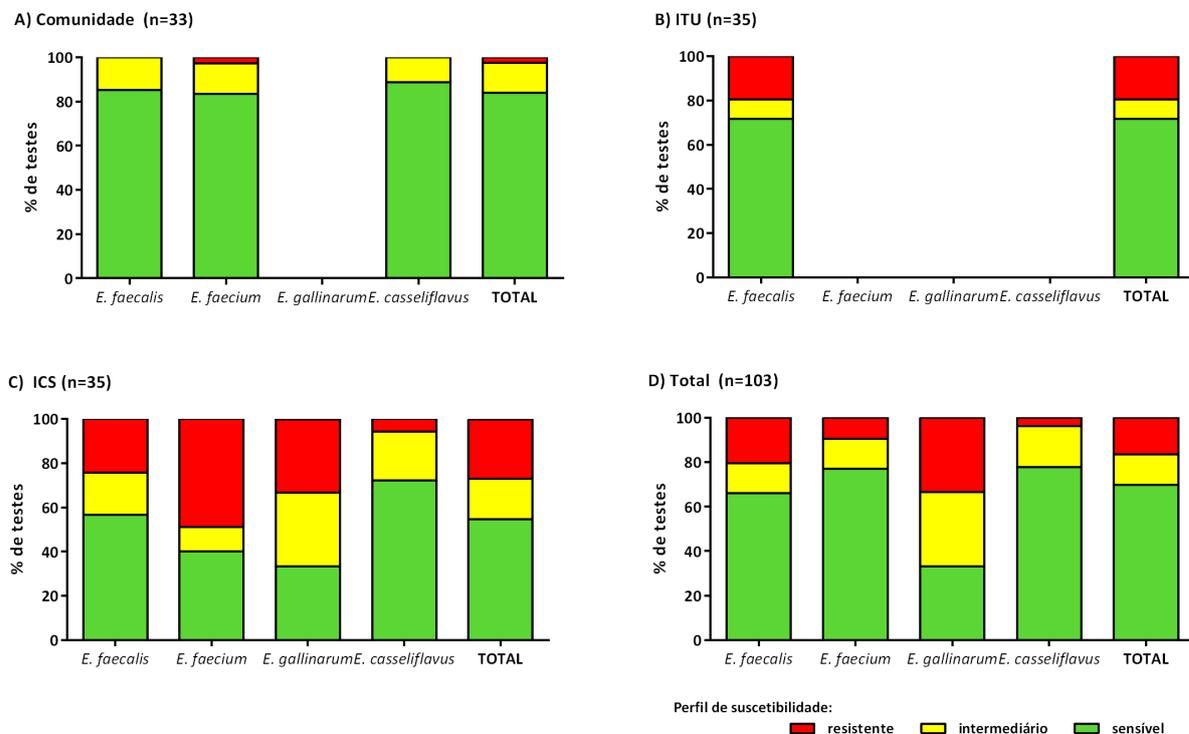
Considerando-se todas as amostras do estudo, 69,80% dos testes identificaram amostras sensíveis, 16,50% identificaram amostras resistentes e amostras com resistência intermediária foram identificadas em 13,70% dos testes realizados (Tabela 1, Figura 15D). A espécie *E. gallinarum* (grupo ICS) apresentou a maior frequência relativa de resistência, enquanto *E. casseliflavus* (grupos ICS e Comunidade) foi a espécie que apresentou maior frequência relativa de amostras sensíveis aos antimicrobianos testados (Tabela 1, Figura 15D).

Tabela 1 - Frequências relativas e totais dos diferentes perfis de suscetibilidade das amostras de *Enterococcus* frente aos antimicrobianos testados.

ESPÉCIE	TESTES (n)	PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DAS AMOSTRAS DE <i>Enterococcus</i>								
		SENSÍVEL			INTERMEDIÁRIO			RESISTENTE		
		N	fr (%)	f (%)	n	fr (%)	f (%)	n	fr (%)	f (%)
ORIGEM: Comunidade (n=33)										
<i>E. faecalis</i>	27	23	85,19	7,74	4	14,81	1,35	0	0	0
<i>E. faecium</i>	261	218	83,52	73,40	36	13,79	12,12	7	2,68	2,36
<i>E. gallinarum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. casseliflavus</i>	9	8	88,89	2,69	1	11,11	0,34	0	0	0
TOTAL	297	249	-	83,84	41	-	13,80	7	-	2,36
ORIGEM: ICS (n=35)										
<i>E. faecalis</i>	243	138	56,79	43,81	46	18,93	14,60	59	24,28	18,73
<i>E. faecium</i>	45	18	40,00	5,71	5	11,11	1,59	22	48,89	6,98
<i>E. gallinarum</i>	9	3	33,33	0,95	3	33,33	0,95	3	33,33	0,95
<i>E. casseliflavus</i>	18	13	72,22	4,13	4	22,22	1,27	1	5,56	0,32
TOTAL	315	172	-	54,60	58	-	18,41	85	-	26,98
ORIGEM: ITU (n=35)										
<i>E. faecalis</i>	315	226	71,75	71,75	28	8,89	8,89	61	19,37	19,37
<i>E. faecium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. gallinarum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. casseliflavus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	315	226	-	71,75	28	-	8,89	61	-	19,37
TODAS AS AMOSTRAS DO ESTUDO (n=103)										
<i>E. faecalis</i>	585	387	66,15	41,75	78	13,33	8,41	120	20,51	12,94
<i>E. faecium</i>	306	236	77,12	25,46	41	13,40	4,42	29	9,48	3,13
<i>E. gallinarum</i>	9	3	33,33	0,32	3	33,33	0,32	3	33,33	0,32
<i>E. casseliflavus</i>	27	21	77,78	2,27	5	18,52	0,54	1	3,70	0,11
TOTAL	927	647	-	69,80	127	-	13,70	153	-	16,50

Legenda: n, número de testes; fr, frequência relativa; f, frequência

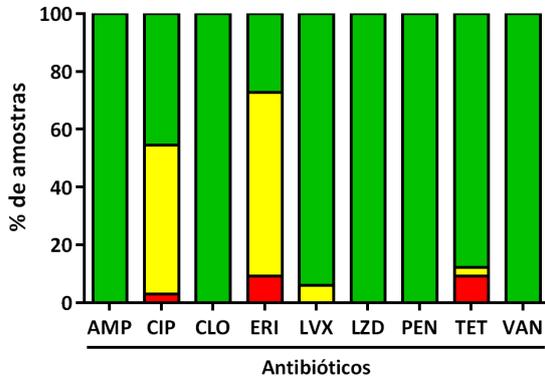
Figura 15 - Frequências relativas e total dos diferentes perfis de suscetibilidade das amostras de *Enterococcus* frente aos antimicrobianos testados.



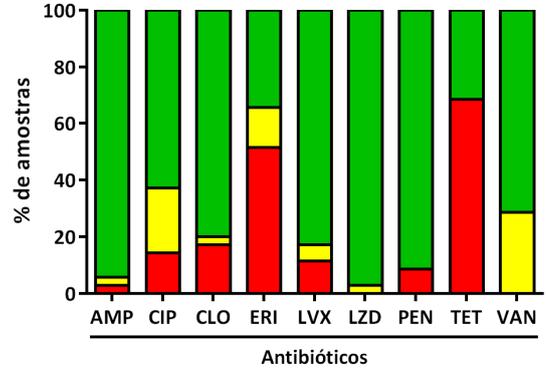
O resultado expresso como percentual de amostras que apresentaram resistência, resistência intermediária ou suscetibilidade para cada um dos antimicrobianos testados é apresentado na Figura 16 e na Tabela 2.

Figura 16 - Frequência de resistência, resistência intermediária ou suscetibilidade das amostras de *Enterococcus* a cada um dos antimicrobianos testados.

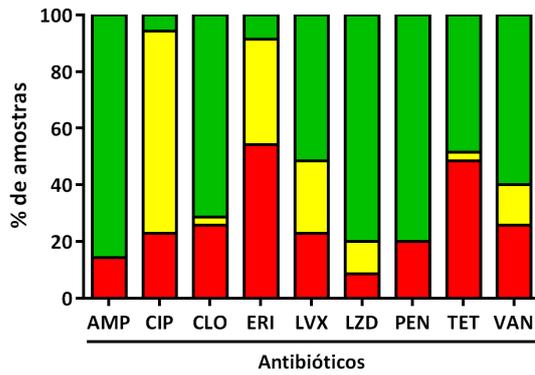
A) Comunidade (n=33)



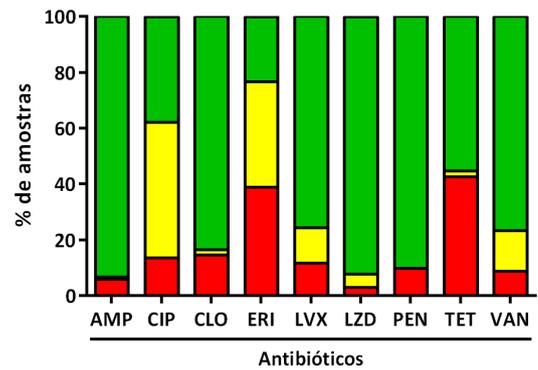
B) ITU (n=35)



C) ICS (n=35)



D) Total (n=103)



Perfil de suscetibilidade:

■ Sensível ■ Intermediário ■ Resistente

Legenda: AMP (Ampicilina); CIP (Ciprofloxacino); CLO (Cloranfenicol); ERI (Eritromicina); LVX (Levofloxacino); LZD (Linezolida); PEN (Penicilina G); TET (Tetraciclina) e VAN (Vancomicina).

Tabela 2 - Frequência de resistência, resistência intermediária ou suscetibilidade das amostras de *Enterococcus* para cada um dos antimicrobianos testados.

PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DAS AMOSTRAS						
ANTI-MICROBIANO*	AMOSTRAS (n)			FREQUÊNCIA (%)		
	RESISTENTE	INTERMEDIÁRIO	SENSÍVEL	RESISTENTE	INTERMEDIÁRIO	SENSÍVEL
ORIGEM: Comunidade (n=33)						
AMP	0	0	33	0,00	0,00	100,00
CIP	1	17	15	3,03	51,52	45,45
CLO	0	0	33	0,00	0,00	100,00
ERI	3	21	9	9,09	63,64	27,27
LVX	0	2	31	0,00	6,06	93,94
LZD	0	0	33	0,00	0,00	100,00
PEN	0	0	33	0,00	0,00	100,00
TET	3	1	29	9,09	3,03	87,88
VAN	0	0	33	0,00	0,00	100,00
ORIGEM: ITU (n=35)						
AMP	1	1	33	2,86	2,86	94,28
CIP	5	8	22	14,28	22,86	62,86
CLO	6	1	28	17,14	2,86	80,00
ERI	18	5	12	51,42	14,29	34,29
LVX	4	2	29	11,43	5,71	82,86
LZD	0	1	34	0,00	2,86	97,14
PEN	3	0	32	8,57	0,00	91,43
TET	24	0	11	68,57	0,00	31,43
VAN	0	10	25	0,00	28,57	71,43
ORIGEM: ICS (n=35)						
AMP	5	0	30	14,29	0,00	85,71
CIP	8	25	2	22,86	71,43	5,71
CLO	9	1	25	25,71	2,86	71,43
ERI	19	13	3	54,29	37,14	8,57
LVX	8	9	18	22,86	25,71	51,43
LZD	3	4	28	8,57	11,43	80,00
PEN	7	0	28	20,00	0,00	80,00
TET	17	1	17	48,57	2,86	48,57
VAN	9	5	21	25,71	14,29	60,00
ORIGEM: TODAS AS AMOSTRAS (n=103)						
AMP	6	1	96	5,83	0,97	93,20
CIP	14	50	39	13,59	48,54	37,86
CLO	15	2	86	14,56	1,94	83,50
ERI	40	39	24	38,83	37,86	23,30
LVX	12	13	78	11,65	12,62	75,73
LZD	3	5	95	2,91	4,85	92,23
PEN	10	0	93	9,71	0,00	90,29
TET	44	2	57	42,72	1,94	55,34
VAN	9	15	79	8,74	14,56	76,70

*: AMP (Ampicilina); CIP (Ciprofloxacino); CLO (Cloranfenicol); ERI (Eritromicina); LVX (Levofloxacino); LZD (Linezolid); PEN (Penicilina G); TET (Tetraciclina) e VAN (Vancomicina).

Para o grupo Comunidade, as maiores taxas de sensibilidade (100,00%) foram observadas para ampicilina, cloranfenicol, linezolida, penicilina G e vancomicina (Figura 16A, tabela 2). As maiores taxas de resistência foram detectadas para eritromicina (72,73%) e ciprofloxacino (54,55%); para ambos, grande parte das amostras resistentes exibiram perfil de resistência intermediária (63,64% e 51,52%, respectivamente).

Para o grupo ITU, a maiores taxas de sensibilidade foram observadas para ampicilina (94,28%), linezolida (82,86%) e penicilina G (91,43%) (Figura 16B, tabela 2). As maiores taxas de resistência foram detectadas para ciprofloxacino (37,14%), eritromicina (65,71%) e tetraciclina (68,57%). No que se refere a resistência intermediária, as taxas foram de 14,28% para ciprofloxacino e 51,42% para levofloxacino. A presença de VRE foi detectada, sendo observada como resistência intermediária em 10 (28,57%) das amostras.

Para o grupo ICS, as maiores taxas de sensibilidade foram observadas para ampicilina (85,71%), linezolida (80,00%) e penicilina G (80,00%) (Figura 16C, tabela 2). As maiores taxas de resistência foram detectadas para ciprofloxacino (94,29%) e eritromicina (91,43%); para ambos, grande parte das amostras resistentes exibiram perfil de resistência intermediária (71,43% e 37,14%, respectivamente). A presença de VRE foi detectada, sendo observada em 14 (40,00%) das amostras do estudo, sendo que cinco amostras apresentaram resistência intermediária (*E. gallinarum* e quatro amostras de *E. faecalis*) e nove foram classificadas como resistentes (sete amostras de *E. faecalis* e duas de *E. faecium*). Nenhuma das duas amostras de *E. casseliflavus* apresentou resistência à vancomicina.

Ao considerarmos todas as amostras do estudo, a maiores taxas de sensibilidade foram observadas para ampicilina (93,20%), linezolida (92,23%) e penicilina G (90,29%) (Figura 16D, tabela 2). As maiores taxas de resistência foram detectadas para ciprofloxacino (62,14%), eritromicina (76,70%) e tetraciclina (44,66%), para o primeiro antimicrobiano, 48,54% dos testes indicaram resistência intermediária, enquanto para o último a resistência intermediária foi de apenas 1,94%; eritromicina apresentou taxas semelhantes de amostras classificadas com resistência ou resistência intermediária à droga. No estudo, observamos um total de 24 (23,30%) amostras classificadas como VRE; 15 amostras (14,56%) exibiram resistência intermediária e nove foram classificadas como resistentes (já citadas acima).

O perfil da suscetibilidade aos antimicrobianos por amostra é mostrado nas Tabelas 3A e 3B e a análise mostra-nos que existe uma diversidade muito grande de padrões de resistência entre as amostras: são 40 padrões diferentes de resistência, que são mostrados na

Tabela 4. Aqui, consideramos a definição de bactérias multidroga-resistentes (MDR) na qual, para ser incluída na categoria, a amostra deve se apresentar resistente a pelo menos três agentes antimicrobianos de pelo menos três categorias diferentes (Abamecha *et al.*, 2015).

As amostras do grupo Comunidade apresentaram os menores perfis de resistência do estudo, a saber: S, 2 amostras; R1, 16 amostras; R2, 13 amostras e R3, 2 amostras. Por sua vez, os grupos ITU e ICS apresentaram uma maior variedade de perfis, incluindo perfis de resistência. As amostras ITU apresentam os seguintes perfis de resistência: S, 3 amostras; R1, 8 amostras; R2, 10 amostras; R3, 6 amostras; R4, 3 amostras; R5, 1 amostra; R6, 3 amostras e R7, 1 amostras. Já o grupo ICS apresentou a seguinte distribuição: R1, 7; R2, 3; R3, 11; R4, 8; R5, 2; R6, 5; R7, 3 e R9, 1 - aqui, destacamos a ausência de bactérias com perfil “sensível” dentre as amostras deste grupo.

Ao considerarmos todas as amostras do estudo, observamos que apenas cinco foram classificadas como sensíveis e que a maioria das amostras (68,93%) se enquadra nos perfis R1, R2 e R3; enquanto os padrões mais frequentes são: ERI, 14 amostras; CIP-ERI, 12 amostras e CIP, ERI-TET e CIP-ERI-TET, seis amostras cada.

Das 103 amostras, 46 (44,66%) foram classificadas como MDR e estão distribuídas em 27 dos 40 padrões de resistência observados. Dentre as amostras classificadas entre os perfis R3 a R9, apenas duas, com o padrão CIP-ERI-LVX, não foram classificadas como MDR - trata-se de um *E. faecium* do grupo Comunidade e um *E. casseliflavus* do grupo ICS.

Tabela 3A - Padrões de resistência a antimicrobianos observados por grupo de amostras de *Enterococcus*.

PERFIL DE RESISTÊNCIA*	PADRÃO DE RESISTÊNCIA*	MDR*	ESPÉCIES
ORIGEM: COMUNIDADE			
S	-	Não	<i>E. faecium</i> – 2
R1	CIP	Não	<i>E. faecium</i> – 2 <i>E. faecalis</i> – 1 <i>E. casseliflavus</i> – 1
	ERI	Não	<i>E. faecium</i> – 10 <i>E. faecalis</i> – 1
	TET	Não	<i>E. faecium</i> – 1
R2	CIP-ERI	Não	<i>E. faecium</i> – 9 <i>E. faecalis</i> – 1
	CIP-TET	Não	<i>E. faecium</i> – 2
	ERI-LVX	Não	<i>E. faecium</i> – 1
R3	CIP-ERI-LVX	Não	<i>E. faecium</i> – 1
	CIP-ERI-TET	Sim	<i>E. faecium</i> – 1
ORIGEM: ICS			
S	-	Não	<i>E. faecalis</i> – 3
R1	CIP	Não	<i>E. faecalis</i> – 1
	ERI	Não	<i>E. faecalis</i> – 2
	TET	Não	<i>E. faecalis</i> – 4
	VAN	Não	<i>E. faecalis</i> – 1
R2	CIP-ERI	Não	<i>E. faecalis</i> – 1
	CIP-TET	Não	<i>E. faecalis</i> – 1
	ERI-TET	Não	<i>E. faecalis</i> – 6
	ERI-VAN	Não	<i>E. faecalis</i> – 1
	LVX-TET	Não	<i>E. faecalis</i> – 1
R3	CIP-ERI-TET	Sim	<i>E. faecalis</i> – 2
	CIP-PEN-TET	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1
	CLO-ERI-TET	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1
	ERI-TET-VAN	Sim	<i>E. faecalis</i> – 2
R4	CIP-CLO-ERI-VAN	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1
	CIP-ERI-LVX-TET	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1
	CLO-ERI-TET-VAN	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1
R5	CIP-CLO-ERI-LVX-TET	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1
R6	AMP-CIP-CLO-ERI-LVX-LZD	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1
	CIP-CLO-ERI-LVX-TET-VAN	Sim	<i>E. faecalis</i> – 2
R7	AMP-CIP-ERI-LVX-PEN-TET-VAN	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1

Antimicrobianos: AMP (Ampicilina); CIP (Ciprofloxacino); CLO (Cloranfenicol); ERI (Eritromicina); LVX (Levofloxacino); LZD (Linezolida); PEN (Penicilina G); TET (Tetraciclina) e VAN (Vancomicina).

Tabela 3B - Padrões de resistência a antimicrobianos observados por grupo de amostras de *Enterococcus*.

PERFIL DE RESISTÊNCIA*	PADRÃO DE RESISTÊNCIA*	MDR*	ESPÉCIES
ORIGEM: ICS			
R1	CIP	Não	<i>E. faecalis</i> – 1
	ERI	Não	<i>E. faecalis</i> – 1
R2	CIP-ERI	Não	<i>E. faecalis</i> – 1
	CIP-LVX	Não	<i>E. casseliflavus</i> – 1
	CIP-VAN	Não	<i>E. faecalis</i> – 1
R3	CIP-CLO-ERI	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1
	CIP-ERI-LVX	Não	<i>E. casseliflavus</i> – 1
	CIP-ERI-LZD	Sim	<i>E. faecalis</i> – 2
	CIP-ERI-TET	Sim	<i>E. faecalis</i> – 4
	CIP-ERI-VAN	Sim	<i>E. faecalis</i> – 2
	CLO-ERI-TET	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1
R4	CIP-CLO-ERI-TET	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1
	CIP-ERI-LVX-PEN	Sim	<i>E. faecium</i> – 2
	CIP-ERI-LVX-TET	Sim	<i>E. faecalis</i> – 3
	CIP-ERI-LVX-VAN	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1
	CIP-ERI-TET-VAN	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1
R5	AMP-CIP-ERI-LVX-PEN	Sim	<i>E. faecium</i> – 1
	CIP-ERI-LVX-TET-VAN	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1
R6	CIP-CLO-ERI-LVX-TET-VAN	Sim	<i>E. faecalis</i> – 4 <i>E. gallinarum</i> – 1
R7	AMP-CIP-CLO-ERI-LVX-PEN-TET	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1 <i>E. faecium</i> – 1
	AMP-CIP-ERI-LVX-LZD-PEN-VAN	Sim	<i>E. faecium</i> – 1
R9	AMP-CIP-CLO-ERI-LVX-LZD-PEN-TET-VAN	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1

Antimicrobianos: AMP (Ampicilina); CIP (Ciprofloxacino); CLO (Cloranfenicol); ERI (Eritromicina); LVX (Levofloxacino); LZD (Linezolida); PEN (Penicilina G); TET (Tetraciclina) e VAN (Vancomicina).

Tabela 4 - Distribuição dos perfis e padrões de resistência observados nas amostras de *Enterococcus*.

Perfil de resistência*	Padrão de resistência*	MDR*	Espécies	Bactérias por padrão (%)	Bactérias por perfil (%)		
S	-	Não	<i>E. faecalis</i> – 3 <i>E. faecium</i> – 2	5 (4,85%)	5 (4,85%)		
R1	CIP	Não	<i>E. faecalis</i> – 3 <i>E. faecium</i> – 2 <i>E. casseliflavus</i> - 1	6 (5,83%)	26 (25,24%)		
	ERI	Não	<i>E. faecalis</i> – 4 <i>E. faecium</i> – 10	14 (15,59%)			
	TET	Não	<i>E. faecalis</i> – 4 <i>E. faecium</i> – 1	5 (4,85%)			
	VAN	Não	<i>E. faecalis</i> – 1	1 (0,97%)			
R2	CIP-ERI	Não	<i>E. faecalis</i> – 3 <i>E. faecium</i> – 9	12 (11,65%)	26 (25,24%)		
	CIP-LVX	Não	<i>E. casseliflavus</i> – 1	1 (0,97%)			
	CIP-TET	Não	<i>E. faecalis</i> – 1 <i>E. faecium</i> – 2	3 (2,91%)			
	CIP-VAN	Não	<i>E. faecalis</i> – 1	1 (0,97%)			
	ERI-LVX	Não	<i>E. faecium</i> – 1	1 (0,97%)			
	ERI-TET	Não	<i>E. faecalis</i> – 6	6 (5,83%)			
	ERI-VAN	Não	<i>E. faecalis</i> – 1	1 (0,97%)			
	LVX-TET	Não	<i>E. faecalis</i> – 1	1 (0,97%)			
R3	CIP-CLO-ERI	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1	1 (0,97%)	19 (18,45%)		
	CIP-ERI-LVX	Não	<i>E. faecium</i> – 1 <i>E. casseliflavus</i> - 1	2 (1,94%)			
	CIP-ERI-LZD	Sim	<i>E. faecalis</i> – 2	2 (1,94%)			
	CIP-ERI-TET	Sim	<i>E. faecalis</i> – 6 <i>E. faecium</i> – 1	7 (6,80%)			
	CIP-ERI-VAN	Sim	<i>E. faecalis</i> – 2	2 (1,94%)			
	CIP-PEN-TET	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1	1 (0,97%)			
	CLO-ERI-TET	Sim	<i>E. faecalis</i> – 2	2 (1,94%)			
	ERI-TET-VAN	Sim	<i>E. faecalis</i> – 2	2 (1,94%)			
	R4	CIP-CLO-ERI-TET	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1		1 (0,97%)	11 (10,68%)
		CIP-CLO-ERI-VAN	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1		1 (0,97%)	
CIP-ERI-LVX-PEN		Sim	<i>E. faecium</i> – 2	2 (1,94%)			
CIP-ERI-LVX-TET		Sim	<i>E. faecalis</i> – 4	4 (3,88%)			
CIP-ERI-LVX-VAN		Sim	<i>E. faecalis</i> – 1	1 (0,97%)			
CIP-ERI-TET-VAN		Sim	<i>E. faecalis</i> – 1	1 (0,97%)			
CLO-ERI-TET-VAN		Sim	<i>E. faecalis</i> – 1	1 (0,97%)			
R5	AMP-CIP-ERI-LVX-PEN	Sim	<i>E. faecium</i> – 1	1 (0,97%)	3 (2,91%)		
	CIP-CLO-ERI-LVX-TET	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1	1 (0,97%)			
	CIP-ERI-LVX-TET-VAN	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1	1 (0,97%)			
R6	AMP-CIP-CLO-ERI-LVX-LZD	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1	1 (0,97%)	8 (7,77%)		
	CIP-CLO-ERI-LVX-TET-VAN	Sim	<i>E. faecalis</i> – 3	3 (2,91%)			
	CIP-CLO-ERI-LZD-TET-VAN	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1 <i>E. gallinarum</i> – 1	2 (1,94%)			
	CIP-CLO-ERI-PEN-TET-VAN	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1	1 (0,97%)			
	CIP-ERI-LVX-LZD-TET-VAN	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1	1 (0,97%)			
R7	AMP-CIP-CLO-ERI-LVX-PEN-TET	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1	1 (0,97%)	4 (3,88%)		
	AMP-CIP-CLO-ERI-LVX-PEN-VAN	Sim	<i>E. faecium</i> – 1	1 (0,97%)			
	AMP-CIP-ERI-LVX-LZD-PEN-VAN	Sim	<i>E. faecium</i> – 1	1 (0,97%)			
	AMP-CIP-ERI-LVX-PEN-TET-VAN	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1	1 (0,97%)			
R9	AMP-CIP-CLO-ERI-LVX-LZD-PEN-TET-VAN	Sim	<i>E. faecalis</i> – 1	1 (0,97%)	1 (0,97%)		

*, Número de antimicrobianos: S, sensibilidade a todos os antimicrobianos testados; R1-9, resistência a 1-9 antimicrobianos diferentes; Antimicrobianos: AMP (Ampicilina); CIP (Ciprofloxacino); CLO (Cloranfenicol); ERI (Eritromicina); LVX (Levofloxacino); LZD (Linezolida); PEN (Penicilina G); TET (Tetraciclina) e VAN (Vancomicina). MDR: perfil multidroga-resistente.

5.7 Pesquisa de *integrons* nas amostras de *Enterococcus*

A pesquisa por *integrons* mostrou a ausência desses elementos genéticos nas 103 amostras de *Enterococcus* spp. avaliadas neste estudo.

5.8 Estudo genético da resistência a antimicrobianos pelas amostras de *Enterococcus*

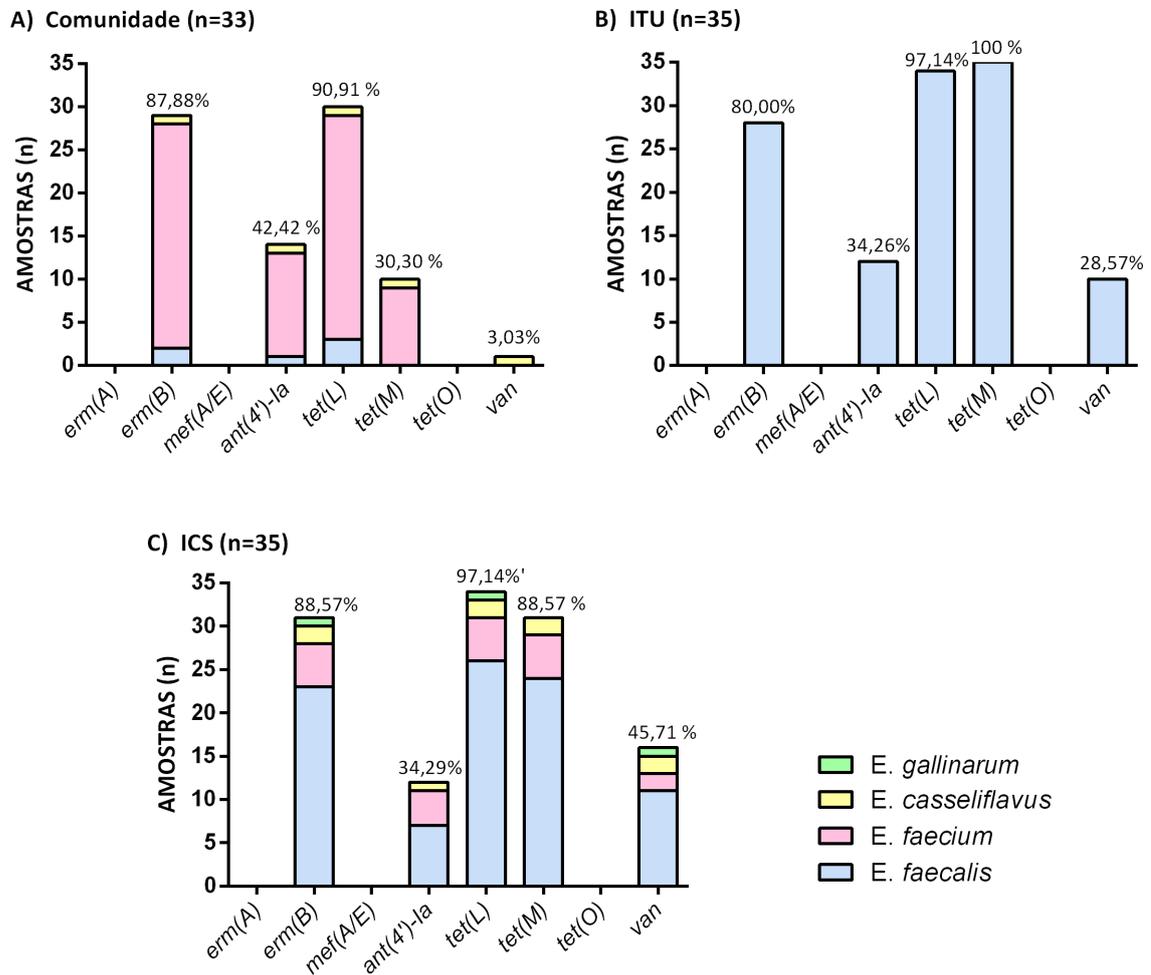
Os resultados apresentados na figura 17 mostram que os genes *erm(A)*, *mef (A/E)* e *tet(O)* não foram identificados em nenhuma das amostras do estudo (Figura 16D). Os genes *erm(B)*, *tet(L)* e *tet(M)* foram observados com maior frequência de detecção, atingindo valores que variaram de 80% a 100% das amostras. Em relação às 17 amostras que apresentaram os genes *van*, com exceção das três amostras de *E. casseliflavus* e da amostra de *E. gallinarum*, que apresentaram, respectivamente, os genes *vanC2/C3* e *vanC1*, todas as demais 13 amostras apresentaram o gene *vanA*.

Como pode ser visto na figura 17A, *erm(B)* foi detectado em 29 amostras (87,88%) do grupo Comunidade, *ant(4')-Ia* em 14 amostras (42,42%); *tet(L)* em 30 amostras (90,91%), *tet(M)* em 10 amostras (30,30%) e *vanC2/C3* em 1 amostra (3,03%).

No grupo ITU, figura 17B, *erm(B)* foi detectado em 28 amostras (80,00%), *ant(4')-Ia* em 12 amostras (34,26%), *tet(L)* em 34 amostras (97,14%), *tet(M)* em todas as 35 amostras (100,00%) e *vanA* em 10 amostras (28,57%).

Das amostras do grupo ICS, figura 17C, *erm(B)* foi detectado em 31 amostras (88,57%), *ant(4')-Ia* em 12 amostras (34,29%), *tet(L)* em 34 amostras (97,14%), *tet(M)* em 31 amostras (88,57%), *vanC1* em uma amostra, *vanC2/C3* em duas amostras e *vanA* em 13 amostras, totalizando 16 amostras albergando o gene *van* (28,57%).

Figura 17 - Distribuição das amostras de *Enterococcus* de acordo com a presença ou ausência dos genes de resistência avaliados.



5.9 Correlação genética entre as amostras bacterianas pela metodologia rep-PCR (GTG)₅

O dendrograma obtido a partir da análise das amostras pelas reações de polimerização em cadeia baseadas em sequências de elementos repetitivos utilizando o iniciador (GTG)₅ é apresentada na figura 18. Utilizando-se como valor de corte a similaridade de 90% (Ribeiro *et al.*, 2011), observa-se que as amostras formam cinco diferentes agrupamentos ou *clusters*.

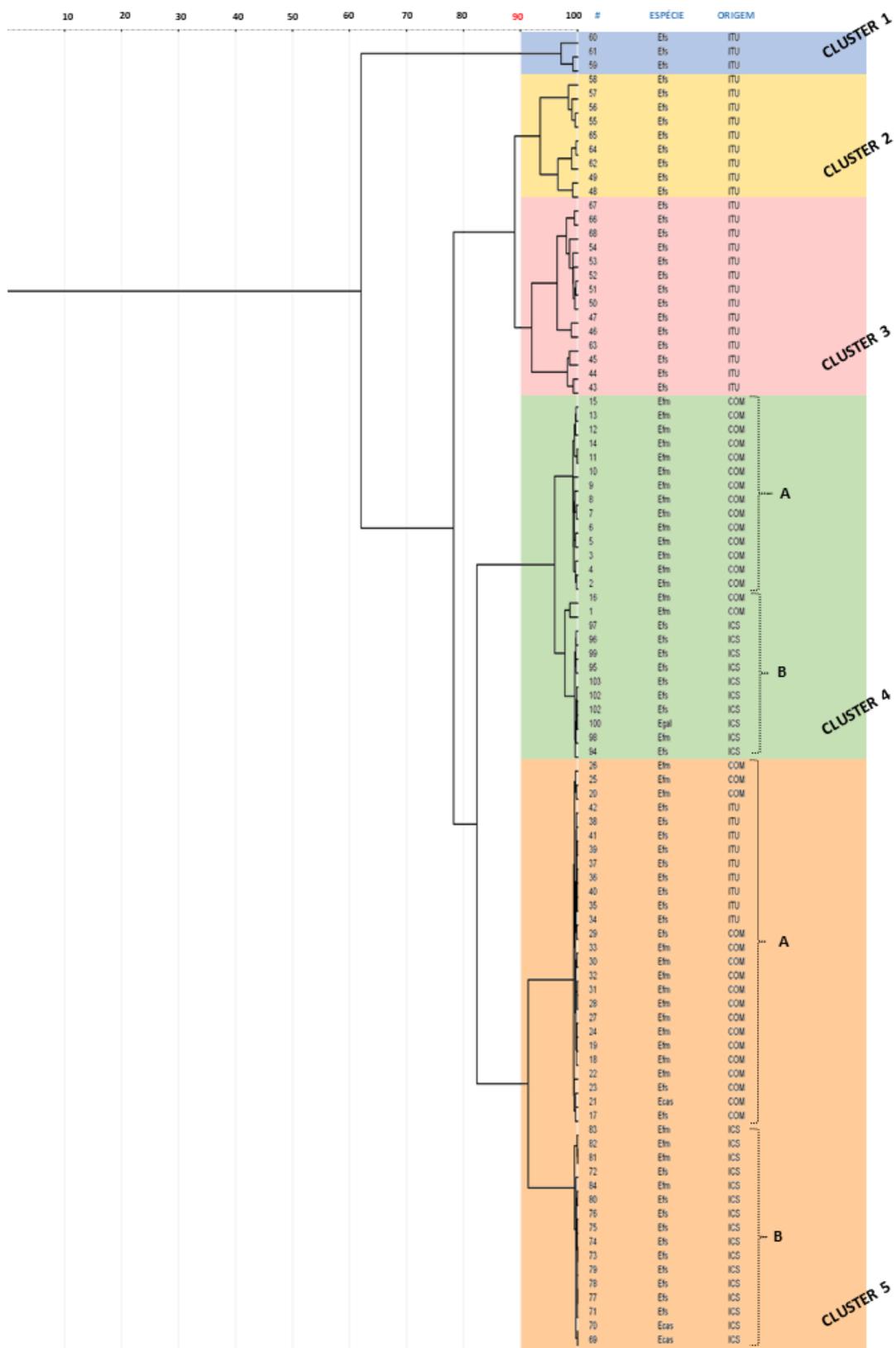
Nota-se que os *clusters* 1, 2 e 3 são formados apenas por amostras do grupo ITU (todas *E. faecalis*), enquanto o *cluster* 4 é formado por amostras dos grupos ITU e Comunidade

e o *cluster* 5 por amostras dos três grupos (ITU, ICS e Comunidade). Os agrupamentos 4 e 5 albergam amostras de diferentes origens e classificadas em diferentes espécies (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*).

Além disso, aumentando-se o valor de corte de similaridade, observamos subgrupos relevantes. O *cluster* 4A é composto apenas por amostras do grupo Comunidade (*E. faecium*), enquanto o 4B por amostras essencialmente do grupo ICS. Além disso, o agrupamento 5A é composto por amostras dos grupos ITU e Comunidade e o *cluster* 5B por amostras do grupo ICS.

Esses agrupamentos sugerem que existe variabilidade entre as amostras e, inclusive, uma origem ecológica semelhante, como, por exemplo, a microbiota intestinal, provável origem dos microrganismos dos grupos estudados.

Figura 18 - Dendrograma apresentando a correlação genética entre as amostras de *Enterococcus* por meio da técnica de rep-PCR (GTG)₅.



Legenda: 90 (em vermelho): ponto de corte de 90% de similaridade; #: numeração da amostra no estudo; Espécies: Ecas - *E. casseliflavus*; Efs - *E. faecalis*; Efm - *E. faecium*; Egal - *E. gallinarum*; COM - comunidade; ICS - infecção da corrente sanguínea; ITU - infecção do trato urinário.

6 DISCUSSÃO

6.1 O processo de seleção da metodologia para a identificação das espécies e a diversidade das espécies encontradas nos três grupos de amostras

As bactérias do gênero *Enterococcus* são microrganismos ubíquos, com grande capacidade de persistência em diversos ambientes, além de possuírem resistência intrínseca a diversos antimicrobianos e habilidade para receber e transferir genes de resistência. Apesar de não possuírem alguns fatores de patogenicidade clássicos, como toxinas potentes, possuem proteínas de adesão e capacidade de formação de biofilme. Essas habilidades parecem ser fundamentais para a emergência desses microrganismos como importantes patógenos nosocomiais, uma vez que colaboram com os processos de colonização do hospedeiro e de desenvolvimento da doença infecciosa.

Com o aumento dos casos de isolamento de microrganismos do gênero *Enterococcus*, o monitoramento da espécie que está causando a doença é importante. Assim, uma rápida e correta identificação é necessária. Até recentemente, a metodologia padrão de identificação de *Enterococcus* era a caracterização fenotípica (Jackson *et al.*, 2004), por meio de testes como: coloração de Gram, morfologia celular, crescimento em ágar bile-esculina com formação do pigmento negro, crescimento na presença de 6,5% de NaCl, ausência de catalase e presença da enzima pirrolidoniil arilamidase (Bender *et al.*, 2009). Esse processo de identificação é dispendioso, uma vez que demanda grande gasto de material, além de tempo para obtenção e interpretação dos resultados (Jackson *et al.*, 2004).

Métodos comerciais, como API e VITEK®2, têm sido amplamente utilizados em laboratórios de microbiologia clínica para a identificação de espécies de *Enterococcus* com mais eficácia que os métodos tradicionais. Esses métodos, porém, não são confiáveis para espécies raramente isoladas na prática clínica. Além disso, a ocorrência de características fenotípicas atípicas em alguns organismos pode acarretar em uma identificação errônea das mesmas (Fang *et al.*, 2012). Para reduzir a possibilidade de erro e manter a velocidade de identificação podem ser utilizados métodos genéticos, como, por exemplo, PCR (Jackson *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2012).

Na primeira etapa deste trabalho (Seção 5.1; anexo 4), identificamos diferentes amostras de *Enterococcus*, isoladas a partir de hemocultura de pacientes com ICS e internados em diferentes hospitais de Belo Horizonte - MG, no nível de espécie, por metodologia de genética molecular (PCR) e fenotípica (VITEK®2). Nossos resultados indicaram maior prevalência da espécie *E. faecalis* (77,14%), seguida por *E. faecium* (14,29%), *E. casseliflavus* (5,71%) e *E. gallinarum* (2,86%). Importante ressaltar que essa identificação foi realizada pelo método automatizado VITEK®2, seguido de confirmação por PCR.

A análise dos resultados indica uma concordância de 97,14% entre os métodos genotípico (PCR) e fenotípico automatizado (VITEK®2), havendo uma única amostra para a qual foi observada divergência. Considerando-se a acurácia elevada da técnica genética empregada, optou-se por considerar a identificação por PCR para definição de espécie. Assim, uma amostra de *E. casseliflavus* foi reidentificada como *E. gallinarum*. A opção pela identificação genotípica para a amostra que gerou resultados divergentes baseou-se em trabalhos que envolvem a comparação de diversas técnicas de identificação de espécies de *Enterococcus* e mostram resultados semelhantes.

Jackson e colaboradores (2004) compararam a identificação de 100 amostras de *Enterococcus* de diferentes origens (suínos, aves domésticas, ambiental e alimentar) por diferentes métodos: identificação fenotípica tradicional, métodos comerciais (VITEK, ID 32 Strep e BBL Crystal kit) e por PCR. Em 69% dos testes, houve concordância entre todos os cinco métodos e em 19% deles houve concordância entre quatro dos cinco testes. Os autores ainda ressaltam o fato de que a PCR é capaz de identificar espécies que os kits comerciais não conseguem. Além disso, os resultados dos testes fenotípicos podem ser variáveis; assim, é possível uma identificação errônea da amostra. As maiores taxas de concordância ocorreram entre a identificação pelo método fenotípico convencional e por PCR (93%) e entre PCR e VITEK (90%).

Fang e colaboradores (2012) utilizaram diferentes metodologias (PCR, MALDI-TOF, VITEK®MS e VITEK®2) para identificar 132 amostras de *Enterococcus* (89 isoladas em hemocultura e 43 diferentes amostras de VRE). O VITEK®2 foi capaz de identificar corretamente 99,2% e 91,7% das amostras quanto ao gênero e à espécie, respectivamente. O método, porém, não foi eficiente em diferenciar as espécies *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*, apresentando uma taxa de 76% (28/37) de identificações corretas. Os autores concluíram que a PCR é um método efetivo para a identificação das espécies e alertam para o fato de que

VITEK®2 possui menor eficiência em detectar outras espécies de *Enterococcus* que não *E. faecalis* e *E. faecium*.

Outros autores encontraram resultados similares. Jin *et al.* (2011) observaram concordância de 92,3% na identificação por VITEK®2, quando comparado aos métodos convencionais. Assim como Garcia-Garrote *et al.* (2000), que avaliaram 150 amostras, das quais 131 foram identificadas corretamente pelo VITEK®2, totalizando 87% de concordância com o método de referência - mas, após a realização de testes complementares de motilidade para algumas amostras, a taxa foi aumentada para 94%).

Considerando-se o exposto, para a identificação da diversidade de espécies das amostras do estudo (apresentada na seção 5.2), optamos pela realização apenas da metodologia de identificação molecular por PCR.

Observamos, dessa forma, a prevalência de 100% de *E. faecalis* nas amostras originadas de ITU, enquanto, entre as amostras indígenas, obtivemos a seguinte distribuição: *E. faecium* (87,87%), como espécie predominante, seguida por *E. faecalis* (9,09%) e *E. casseliflavus* (3,03%). Considerando-se o total de amostras do estudo (n=103), obtivemos uma distribuição na qual *E. faecalis* (n=65; 63,11%) e *E. faecium* (n=34; 33,01%) aparecem como espécies mais frequentes, totalizando mais de 96% das amostras do estudo. *E. casseliflavus* (n=3; 2,91%) e *E. gallinarum* (n=1; 0,97%) aparecem numa proporção muito mais discreta.

Apesar de já terem sido descritas cerca de 60 espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus*, as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são as mais comuns dentre as bactérias do gênero como patógenos envolvidos em infecções em seres humanos (Murray, 2000). As infecções enterocócicas causadas por *E. faecalis* atingem taxas de 85-95% e apenas cerca de 5-10% são causadas por *E. faecium* (Cetinkaya *et al.*, 2000; Murray, 2000; d'Azevedo *et al.*, 2004; Facklam *et al.*, 2007).

De forma similar, no Brasil, outros estudos apresentam resultados semelhantes ao deste trabalho e que condizem com a constatação de Murray (2000). Conceição e colaboradores (2011) identificaram *E. faecalis* (87%) e *E. faecium* (10,8%) como espécies mais prevalentes, sendo as demais raramente identificadas: *E. casseliflavus* (1,2%), *E. gallinarum* (0,3%), *E. hirae* (0,3%) e *E. pseudoavium* (0,3%).

Em um estudo com 203 amostras isoladas de dois hospitais de Porto Alegre - RS, Bender e colaboradores (2009) identificaram cinco espécies de *Enterococcus*: *E. faecalis* (93,6%), *E. faecium* (4,4%), *E. casseliflavus* (1,0%), *E. gallinarum* (0,5%) e *E. hirae* (0,5%).

Em outros países, como, por exemplo, na Etiópia (Abamecha *et al.*, 2015), pode-se observar a manutenção de *E. faecium* e *E. faecalis* como as espécies mais prevalentes, havendo, porém, uma predominância da primeira (prevalência de 35,1% e 29,8%, respectivamente) e aumento na frequência das demais espécies como *E. gallinarum* (17,5%), *E. casseliflavus* (8,8%) e *E. durans* (8,8%).

Em estudo objetivando identificar as espécies mais comuns em indivíduos com ITU (Vranic *et al.*, 2017), os autores identificaram *E. coli* (67.21%), *Proteus spp.* (9.83%), *E. faecalis* (7.37%) e *Enterobacter* (5.73%) como os principais causadores da enfermidade. *E. faecalis* foi a única espécie do gênero relacionada à ITU, dado corroborado pelo resultado deste trabalho.

Os enterococos são frequentemente isolados de fezes de seres humanos, ainda que constituam uma pequena parcela da população da microbiota indígena (cerca de 1%), sendo *E. faecalis* e *E. faecium* as espécies mais comumente isoladas (Lebreton *et al.*, 2014). Layton e colaboradores (2010) avaliaram a presença de enterococos em amostras fecais humanas e identificaram as seguintes espécies: *E. avium* (em 11% das amostras), *E. durans* (33%), *E. faecalis* (78%), *E. faecium* (100%), *E. gallinarum* (33%) e *E. hirae* (11%) em amostras fecais humanas. A maior prevalência da espécie *E. faecium* pode explicar nossos resultados, que mostraram que a maioria das nossas amostras originadas de coprocultura de indivíduos saudáveis (grupo Comunidade) tenha sido desta espécie (n=29; 77,14%).

6.2 Correlação genética entre as amostras de *Enterococcus*

A impressão genética (*DNA fingerprinting*) consiste na comparação de padrões de DNA e permite realizar a análise da relação genômica entre diferentes amostras, bem como tipá-las e classificá-las (Heras *et al.*, 2015). A realização da tipagem de amostras por meio de PCR baseada em sequências de elementos repetitivos (rep-PCR) tem se mostrado uma técnica de fácil execução, que utiliza iniciadores (*primers*) direcionados a sequências repetitivas dispersas no genoma bacteriano.

Existe uma grande variedade dessas sequências, sendo BOX, ERIC, REP e (GTG)₅ as mais frequentemente utilizadas nos ensaios de rep-PCR aplicados a estudos taxonômicos de diferentes grupos bacterianos como, por exemplo, lactobacilos, estafilococos, micobactérias e estreptomicetos (Svec *et al.*, 2005; Svec *et al.*, 2010). A validação da técnica de (GTG)₅-PCR

foi realizada por Svec e colaboradores (2005), com a observação de que esta técnica mostrou as impressões genéticas mais discriminativas e complexas dentre aquelas avaliadas.

O programa utilizado para a análise dos resultados e construção do dendrograma foi o Gell, um programa *open-source*, gratuito e independente de plataforma, apresentado à comunidade científica em 2015 (Heras *et al.*, 2015). O programa realiza a comparação do perfil de bandas entre as amostras do estudo, gera uma matriz de similaridade entre as amostras e realiza a organização das amostras em grupos (*clusters*). O processo ocorre de forma iterativa, ou seja, repete diversas vezes para se chegar a um resultado e a cada vez gera um resultado parcial que será usado na vez seguinte. Assim, a cada etapa, os dois grupos (conjunto de impressões genéticas) mais similares são combinados dentro de um grupamento maior, formando, ao final da análise, o dendrograma de similaridade das amostras (Heras *et al.*, 2015). Para a discriminação das amostras, utilizamos um valor de corte de 90% e, assim, as amostras agrupadas com níveis de similaridade iguais ou maiores do que 90% são consideradas da mesma linhagem ou muito relacionadas (Ribeiro *et al.*, 2011).

Apesar de esta técnica estar validada para *Enterococcus* há mais de uma década (Svec *et al.*, 2005), percebemos que seu uso é, ainda, muito restrito na prática clínica, sendo empregado, principalmente, na área de alimentos (Jurkovic *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2011; Terzić-Vidojević *et al.*, 2015). A razão para isso pode ser o fato de que os resultados obtidos pela técnica do (GTG)₅-PCR são comparáveis apenas dentro de um mesmo estudo, reduzindo, assim, a abrangência epidemiológica da análise. O contrário ocorre na técnica de tipagem por sequenciamento de multilocus (MLST, *multilocus sequencing typing*), que consiste no sequenciamento de múltiplos *loci* de genes constitutivos (*housekeeping*) e utiliza como unidade de comparação os alelos de um gene - desta forma, a comparação pode ser realizada em nível global, estabelecendo-se relações clonais entre amostras de diferentes locais de origens, inclusive cidades ou países (Arias & Murray 2012; Maiden *et al.*, 2013).

Assim como descrito em outros trabalhos (Jurkovic *et al.*, 2006; Svec *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2011; Terzić-Vidojević *et al.*, 2015), foram gerados *amplicons* com comprimentos variando de 0,2 a 4 Kb. Levando em consideração a diversidade da origem das amostras isoladas, uma considerável heterogeneidade genotípica foi observada. Os resultados sugerem que a análise da identidade genética das amostras pelo (GTG)₅ foi relativamente efetiva em agrupar e discriminar amostras, em parte correlacionando-as com as fontes de isolamento, assim como observado em Terzić-Vidojević *et al.* (2015).

Ao contrário dos estudos (Jurkovic *et al.*, 2006; Svec *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2011; Terzić-Vidojević *et al.*, 2015) com *Enterococcus* originados de alimentos (chouriço e diferentes tipos de queijo), não observamos a formação de *clusters* individuais para cada espécie e, assim, amostras de diferentes espécies foram alocadas em um mesmo grupo. Terzić-Vidojević *et al.* (2015) obtiveram resultados similares e sugeriram que esse fato possa ocorrer devido à transferência horizontal de genes entre as bactérias que fazem parte de uma comunidade complexa. No nosso caso, podemos inferir que a microbiota intestinal seja essa origem comum, por ser comunidade altamente complexa.

6.3 Avaliação de fatores de patogenicidade nas amostras de *Enterococcus* do grupo ICS

Virulência é tradicionalmente definida como a medida da patogenicidade (habilidade em causar doença) do microrganismo. Muitas vezes, é vista como um meio para um fim - reforçar a multiplicação e a disseminação para outros hospedeiros (Van Tyne & Gilmore, 2014). Sendo assim, em *Enterococcus*, esses fatores de patogenicidade são responsáveis por contribuírem para o aumento do valor adaptativo e da persistência do patógeno no ambiente, ao facilitar a aderência da bactéria à membrana das células do hospedeiro ou a superfícies ambientais, onde eles podem obter nutrientes e evadir do sistema imunológico do hospedeiro (Heikens *et al.*, 2007; Kafil *et al.*, 2013; Medeiros *et al.*, 2014) - ou seja, aumentam a virulência do organismo.

Mais especificamente, os fatores de patogenicidade enterocócicos são aqueles relacionados à adesão (como a formação de biofilmes, a proteína de superfície enterocócica, a substância de agregação) e enzimas como a gelatinase (GelE) e a citolisina (codificada por um óperon) (Heikens *et al.*, 2007; Kafil *et al.*, 2013).

Estudos focados na patogenicidade de *Enterococcus* são complexos, uma vez que os fatores para o microrganismo ainda não estão muito bem descritos na literatura. Mas, observa-se que o processo patogênico da bactéria pode ser considerado como multifatorial, envolvendo a participação de diversos genes/produtos (Comerlato *et al.*, 2013).

Atualmente, nosso conhecimento sobre as possíveis relações entre a presença de um fator de patogenicidade e sua real implicação nos processos infecciosos enterocócicos em seres humanos ainda é limitado (Strateva *et al.*, 2016). Por isso, diversos estudos têm sido

realizados, na tentativa de correlacionar a virulência enterocócica a diferentes fatores de patogenicidade potenciais (Chuang *et al.* 2009). Ainda, o fato de que se conhecer o padrão de virulência das amostras circulantes de *Enterococcus* pode ajudar a entender o complexo processo patogênico desses microrganismos oportunistas (Sharifi *et al.*, 2012). Nesse contexto, nosso trabalho torna-se ainda mais significativo, uma vez que dados acerca da patogenicidade das linhagens de *Enterococcus* em circulação no Brasil ainda são escassos (Ruzon *et al.*, 2010).

6.3.1 Avaliação fenotípica de fatores de patogenicidade das amostras de *Enterococcus*

Biofilmes bacterianos têm grande importância na saúde pública devido ao seu papel no estabelecimento da infecção e na resistência a antimicrobianos (Fallah *et al.*, 2017), além de contribuir para a transferência horizontal de genes e consequente disseminação dos determinantes de patogenicidade e resistência antimicrobiana (Garg *et al.*, 2017). Essa característica é considerada um fator de patogenicidade de grande importância em amostras clínicas, uma vez que essas estruturas podem se formar em dispositivos médicos, como cateteres e próteses cirúrgicas. O tratamento de pacientes com infecções causadas por biofilmes, geralmente, envolve a remoção do implante, o que aumenta o trauma causado ao paciente, bem como o custo do tratamento (Baldassarri *et al.*, 2001; Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Rosa *et al.*, 2006).

O ensaio em placas de microtitulação para avaliar a formação de biofilmes bacterianos tem se mostrado uma ferramenta adequada para realizar o *screening* e a classificação da habilidade de produzir biofilme, bem como comparar essa habilidade entre diferentes amostras de *Enterococcus* de origem clínica (Stepanovic *et al.*, 2000; Al-Ahmad *et al.*, 2014; Fallah *et al.*, 2017). Deve-se ressaltar, entretanto, que as amostras podem demonstrar atividade de formação de biofilme *in vivo* superior à apresentada no ensaio (Anderson *et al.*, 2016).

A correlação entre fatores de patogenicidade e formação de biofilme é um consenso e muitos pesquisadores afirmam que a formação de biofilme é uma característica comum do gênero *Enterococcus* (Mohamed *et al.*, 2004; Rosa *et al.*, 2006). Apesar disso, há relatos de que a prevalência da produção de biofilme por amostras de *Enterococcus* varia em diferentes

estudos, com taxas de 0% a 100% e parece ser dependente da espécie, do hospedeiro e de fatores ambientais (Garg *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2017a,b). Assim, as diferenças nas taxas de produção *in vitro* de biofilme apresentadas por amostras de *Enterococcus* podem ser explicadas por diferentes possíveis razões, como apresentado por Zheng e colaboradores (2017b): 1) Diferenças entre as linhagens dos diferentes estudos; 2) A técnica de formação de biofilme em microplacas com coloração pelo cristal violeta é um método semiquantitativo e possui intrinsecamente a possibilidade de erro do manipulador e 3) Não há, ainda, um critério consistente para a determinação do que seja um biofilme positivo, inclusive, há uma grande variedade de pontos de corte em relação à densidade óptica do cristal violeta.

Em nosso trabalho, observamos habilidade de formação de biofilme em cerca de 30% das amostras (Figura 12); do total, cerca de 16% demonstraram produção moderada ou alta. Observamos, ainda, que o grupo ITU foi aquele que apresentou maior percentual de amostras produtoras (aproximadamente 51%).

Em relação a amostras provenientes de hemocultura, Cafini e colaboradores (2015) observaram a formação de biofilme em 81,8%, enquanto outros estudos indicam 100% das amostras clínicas como produtoras de biofilme (Medeiros *et al.*, 2014). Zheng *et al.* (2017b) identificaram uma prevalência de amostras produtoras de biofilme em 40,0% entre aquelas isoladas de hemocultura., valor inferior ao relatado em outros estudos, mas, ainda, superior ao encontrado no nosso estudo.

Relatos de percentuais de produção de biofilme por amostras de ITU semelhantes aos deste trabalho foram descritos na literatura como, por exemplo, Zheng e colaboradores (2017a) identificaram 50,40% dos *E. faecalis* como amostras produtoras de biofilme (23,90% baixa produção e 26,5% alta produção). Fallah e colaboradores (2017) identificaram 26,5% das amostras de *E. faecalis* e 75% das amostras de *E. faecium* como produtoras de biofilme - e, para ambas as espécies, nenhuma foi classificada como apresentando produção alta e a maioria das amostras apresentou baixa produção. Em outros estudos realizados no Japão e na Índia, encontraram maior incidência (100% e 80%, respectivamente) de amostras produtoras (Seno *et al.*, 2005; Garg *et al.*, 2017), sugerindo que há uma variação, provavelmente, devido às linhagens circulantes nos locais de realização dos estudos.

Apesar da diferença existente entre todos os valores já descritos, todos eles indicam o quanto a produção de biofilme é uma propriedade frequente entre as bactérias do gênero. Além disso, *E. faecalis* tem se tornado um patógeno comum nas ITU e, apesar das taxas de

resistência antimicrobiana encontradas na espécie serem menores do que em *E. faecium* (Zheng *et al.* 2017a), sua habilidade de produção de biofilme é, geralmente, descrita como maior do que nesta última (Fallah *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2017). Porém essa “contradição” pode estar relacionada ao pequeno número de amostras de *E. faecium* e a diferenças geográficas (Fallah *et al.*, 2017a).

De acordo com Upadhyaya *et al.* (2011) e Di Rosa *et al.* (2006), a produção de biofilme parece estar mais comumente associada a amostras isoladas de doenças do que indígenas ou ambientais. Por outro lado, Garg *et al.* (2017) não encontraram diferença na formação de biofilmes em *Enterococcus* isolados do trato urinário de pacientes sintomáticos e pacientes assintomáticos - no entanto, em pacientes sintomáticos, a produção de biofilmes pode aumentar o estabelecimento do processo infeccioso e emergência de manifestações da doença.

Por fim, a maior taxa de produção de biofilme detectada nas amostras do grupo ITU poderia ser explicada como uma adaptação dessas bactérias para a adesão bacteriana ao trato urinário frente ao fluxo de urina. Esta adaptação desempenharia, possivelmente, um papel menor nas infecções de corrente sanguínea.

6.3.2 Avaliação genotípica de fatores de patogenicidade nas amostras de *Enterococcus* do grupo ICS

Considerando o exposto, neste trabalho, selecionamos diversos fatores de patogenicidade enterocócicos para avaliação. A gelatinase, codificada pelo gene *gelE*, possui participação na formação do biofilme, além de hidrolisar colágeno, caseína e hemoglobina (Shankar *et al.*, 1999; Hancock & Perego, 2004; Giridhara *et al.*, 2009) e a substância de agregação (Agg/Asa1) medeia a formação de agregados conjugativos, favorecendo processos de transferência horizontal de genes, contribuindo para a patogênese do organismo (Gilmore *et al.*, 2002; Koch *et al.* 2004; Fisher & Phillips, 2009; Chuang-Smith *et al.*, 2010). Ainda, foram incluídos fatores de patogenicidade como a proteína ligadora de colágeno (Ace), que possui papel importante na formação extracelular da matrix microbiana (Nallapareddy *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2004) e o óperon da citolisina (CylA/B/M/LI/Ls), uma toxina bacteriana com atividade hemolítica contra células eucarióticas, contribuindo para o aumento da gravidade

da infecção (Ike *et al.*, 1987; Van Tyne *et al.*, 2013). Todos estes fatores participam do processo de invasão e colonização, além de contribuir para a formação do biofilme (Jahan & Holley, 2014).

Neste estudo, observamos diferentes padrões de virulência entre as amostras do grupo ICS, sendo que, a maioria delas possuía, simultaneamente, de cinco a sete dos genes avaliados (Figura 14).

Observamos que todas as amostras do grupo ICS albergavam o gene *gelE*, que codifica a gelatinase (Figura 13), apesar de que apenas 40% delas expressaram a enzima no teste fenotípico (Figura 10). O gene da gelatinase é frequentemente detectado em amostras clínicas de *E. faecalis* (Creti *et al.*, 2004; Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006), mesmo que nem sempre esse gene seja expresso (Comerlato *et al.*, 2013; Anderson *et al.*, 2016). Anderson e colaboradores (2016) relataram a presença do gene em 99% das amostras estudadas. O percentual de amostras que expressam o gene varia entre diversos estudos, oscilando entre valores mais modestos como 13% (Anderson *et al.*, 2016) a valores mais elevados de atividade como 77,2% (Medeiros *et al.*, 2014) e 82,2% (Strateva *et al.*, 2016). Valores medianos, próximos ao do nosso trabalho, também já foram descritos como 42,6% (Soares *et al.*, 2014), 45,3% (Bittencourt de Marques & Suzart, 2004) e 54% (Coque *et al.*, 1995; Medeiros *et al.*, 2014).

É sabido que a adaptação bacteriana às condições laboratoriais pode modificar o fenótipo do organismo. Uma das características que pode ser perdida durante essas condições padronizadas de multiplicação é a virulência bacteriana. Assim, a ausência de pressão seletiva *in vitro* pode reduzir a expressão dos fatores necessários para a sobrevivência *in vivo* (Somerville *et al.*, 2002; Fux *et al.*, 2005; Saint-Ruf *et al.*, 2014). Lopes e colaboradores (2006) atribuem a perda da atividade da gelatinase em amostras que possuem o gene a fatores como: manipulação laboratorial do microrganismo, genes silenciosos e baixo nível de expressão ou repressão do gene *gelE*. Ainda, de acordo com Marra e colaboradores (2007), a presença de *gelE* não está necessariamente correlacionada à atividade da enzima gelatinase, podendo outros genes estarem associados ao controle da expressão gênica.

A detecção da presença da citolisina é frequentemente realizada pela pesquisa de *cylA* (Cosentino *et al.*, 2010; Medeiros *et al.*, 2014; Anderson *et al.*, 2016; Strateva *et al.*, 2016), gene do óperon responsável pela codificação da proteína ativadora extracelular da citolisina (Haas *et al.*, 2002). Neste trabalho, porém, optamos por identificar todos os genes do óperon:

cyIA/B/M/L_L/L_S (Eaton & Gasson, 2001; Semedo *et al.*, 2003), além de avaliar a expressão fenotípica da enzima por meio da presença de hemólise em ágar sangue. Observou-se que 40,00% das amostras do grupo ICS foram capazes de exibir atividade hemolítica (Figura 11). Assim como para a gelatinase, a detecção do gene *cyIA*, por meio de PCR, nem sempre está correlacionada com a expressão da hemolisina (Medeiros *et al.*, 2014). Isto pode ser explicado pela perda de alguns genes do óperon *cyI* ou pela presença de um gene *cyIA* silencioso (Gaspar *et al.*, 2009; Upadhyaya *et al.*, 2009). No nosso trabalho, identificamos a presença dos genes *cyIA*, *cyIM*, *cyLL_L* e *cyLL_S* nas frequências de 28,57%, 11,43%, 48,57% e 60,00%, respectivamente (Figura 13). A baixa frequência do gene que codifica a proteína ativadora CylA e a maior frequência dos genes relativos às subunidades CylL_L e CylL_S, pode nos sugerir que esses dois últimos genes sejam mais adequados para avaliar a presença da citolisina nas amostras de *Enterococcus* spp. Eaton & Gasson (2001) identificaram o percentual de incidência do gene *cyIA* inferior ou igual aos percentuais dos genes *cyIM* e *cyIB*. O mesmo foi observado por Semedo *et al.* (2003), que observaram concordância entre *cyLL* e *cyLS* de, aproximadamente, 90%, enquanto para *cyIM*, *cyIB* e *cyIA*, os valores ficaram entre 40 e 60%. Esses autores ainda sugerem que a melhor forma de avaliar a habilidade hemolítica enterocócica seria o ensaio fenotípico e não a detecção por PCR, inclusive devido à elevada variabilidade dos genes do óperon. Os resultados de alguns trabalhos demonstram a detecção do gene *cyIA* em frequência próxima à encontrada no nosso trabalho, por exemplo, 16,8% (Bittencourt de Marques & Suzart, 2004), 26,4% (Cosentino *et al.*, 2010) e 36,4% (Cafini *et al.*, 2015), ou bem mais altos, como 54,4% (Medeiros *et al.*, 2014) ou 64,9% (Strateva *et al.*, 2016).

A proteína enterocócica de superfície (Esp) é uma adesina de parede encontrada, principalmente, em amostras clínicas do gênero *Enterococcus* (Manu *et al.*, 2003; Medeiros *et al.*, 2014). Apesar de seu papel na infecção enterocócica ainda estar indeterminado, a proteína parece ter papel na adesão tissular, evasão do sistema imunológico do hospedeiro e formação de biofilme (Shankar *et al.*, 2001; Toledo-Arana *et al.*, 2001; Sava *et al.*, 2010b; Medeiros *et al.*, 2014). Observamos frequência de 34,14% de presença do gene *esp* nas amostras do grupo ICS (Figura 13). Esse resultado assemelha-se muito ao valor de 34,8%, relatado por Medeiros *et al.* (2014), e 31,8%, reportado por Cafini *et al.* (2015), sendo este último valor observado em amostras de bacteremia. A maioria dos estudos descreve a presença do gene em mais de 50% das amostras (Bittencourt de Marques & Suzart, 2004;

Cosentino *et al.*, 2010; Strateva *et al.*, 2016;), atingindo valores de até 70% (Soares *et al.*, 2014; Anderson *et al.*, 2016).

O antígeno de endocardite EfaA tem sido fortemente associado a amostras clínicas, especialmente aquelas provenientes de pacientes com endocardite, atingindo prevalências elevadas (Creti *et al.*, 2004; Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006). Em nosso estudo, avaliamos a presença de duas variantes de EfaA (EfaAfs e EfaAfm, esta última mais prevalente em *E. faecium*) nas amostras do grupo ICS (Eaton & Gasson, 2001). Encontramos prevalência de 91,43% para *efaAfs* e de 14,29% para *efaAfm* (Figura 13). A presença do gene *efaAfm* foi detectada apenas em *E. faecium*, enquanto *efaAfs* foi detectado em amostras de todas as espécies no estudo. É curioso ressaltar que, das 35 amostras, apenas três, de *E. faecalis*, não possuíam o gene *efaAfs*, sendo as duas amostras β -hemolíticas incluídas entre elas. Os trabalhos avaliam a presença de *efaA* com grande frequência, mas não fazem diferenciação entre as duas variantes. Assim, nosso estudo alinha-se com a detecção do gene *efaAfs* de diversos outros que apresentam frequência como: 100% (Medeiros *et al.*, 2014; Anderson *et al.*, 2016) e 96,7% (Cosentino *et al.*, 2010). Alguns estudos apresentaram frequências um pouco mais baixas como 85% (Strateva *et al.*, 2016) ou 72,7% (Cafini *et al.*, 2015).

Em nosso estudo, identificamos que 62,86% das amostras do grupo ICS possuíam o gene *ace* (Figura 13). Este resultado condiz com a literatura recente, em que os autores indicam a prevalência do gene em valores entre 60% e 75%, como: 59,1% (Cafini *et al.*, 2015); 61,1% (Strateva *et al.*, 2016); 67% (Cosentino *et al.*, 2010) e 73,7% (Medeiros *et al.*, 2014).

A presença do gene que codifica a hialuronidase (*hyl*) não foi detectado em nenhuma das amostras do nosso estudo (Figura 13). Observa-se que a presença desse gene é variável, podendo estar ausente nas amostras, como descrito por Anderson e colaboradores (2016), ou presente em até 25,1% das amostras, como descreveram Strateva e colaboradores (2016).

Encontramos genes que codificam os feromônios sexuais Cpd, Cob e Ccf, respectivamente, em 17,14%, 74,29% e 100% das amostras do grupo ICS avaliadas (Figura 13). Eaton e Gasson (2001) identificaram os três feromônios em todas as amostras de *E. faecalis*, porém, para *E. faecium*, notaram a ausência de todos os feromônios. Neste estudo, *ccf* estava presente em todas as amostras, porém *cpd* e *cob* não foram identificados em nenhuma amostra de *E. faecium* (Anexo 2).

Diversos estudos identificam correlação entre as adesinas produzidas por *Enterococcus* e a produção de biofilme, mas essas associações ainda são controversas. Para

gelE, Hancock e Perego (2004), Mohamed *et al.* (2004), Dworniczek *et al.* (2012), Comerlato *et al.* (2013) e Medeiros *et al.* (2014) identificaram papel da gelatinase na patogenicidade e formação de biofilme, sugerindo que a enzima poderia atuar, direta ou indiretamente, na degradação de colágeno e outras proteínas teciduais, o que pode agravar o dano ao hospedeiro. Por outro lado, Ballering *et al.* (2009), Dworniczek *et al.* (2012) e Comerlato *et al.* (2013) demonstraram a ausência de relação entre a presença do gene e a expressão dessas características.

Dworniczek *et al.* (2012) e Comerlato *et al.* (2013) não encontraram relação entre a expressão de *esp* e a formação de biofilme. Por sua vez, Sillanpää *et al.* (2010) mostraram que amostras de *E. faecium* que não albergavam *esp* apresentavam uma produção de biofilme mais eficiente. Heikens *et al.* (2007) e Chuang-Smith *et al.* (2010), por outro lado, sugerem a participação dessa proteína no desenvolvimento do biofilme.

Uma relação positiva entre a produção de biofilme e a presença de *ace* em amostras clínicas já foi observada, sugerindo que Ace possui um papel importante nos estágios iniciais de colonização, mediando a adesão da bactéria ao colágeno exposto após a injúria vascular (Singh *et al.*, 2010; Medeiros *et al.*, 2014).

6.4 A resistência a antimicrobianos pelas amostras de *Enterococcus*

Uma das principais características dos enterococos é a resistência intrínseca ou adquirida a diversos agentes antimicrobianos (Murray, 2000). A resistência adquirida a glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina), penicilinas e aminoglicosídeos estão entre as de maior importância clínica, uma vez que as opções terapêuticas para esses casos são limitadas (Conceição *et al.*, 2011).

Observa-se, assim, a resistência dos enterococos a diversos antimicrobianos comumente utilizados na prática clínica, como ampicilina e vancomicina. Além disso, a resistência a drogas antimicrobianas de última escolha, como a daptomicina e a linezolida também está emergindo (Van Harten *et al.*, 2017). O monitoramento constante da suscetibilidade aos agentes antimicrobianos permite ao médico fazer uma prescrição apropriada e, dessa forma, atuar prevenindo a emergência de resistência a essas drogas (Fallah *et al.*, 2017).

Duas razões principais fazem dos *Enterococcus* organismos com excelente potencial para adquirir e servir de depósito de fatores de resistência a antimicrobianos. O primeiro deles diz respeito ao fato desses microrganismos terem como *habitat* ambientes microbianos complexos, onde entram em contato com uma grande diversidade de potenciais fontes de material genético. O segundo decorre do fato de eles possuírem elevados níveis de resistência intrínseca a antimicrobianos, o que os permite sobreviver em ambientes enriquecidos de elementos de resistência (como hospitais) (Van Tyne & Gilmore, 2014).

As categorias de classificação dos resultados obtidos no teste de suscetibilidade antimicrobiana foram analisadas seguindo-se as recomendações do CLSI (2015). Essa classificação baseia-se na resposta *in vitro* do microrganismo a um agente antimicrobiano nas concentrações séricas ou teciduais que este agente pode alcançar quando as doses habitualmente prescritas do mesmo são utilizadas. Dessa forma, as categorias de sensibilidade são determinadas como:

- **'Sensível'**: A categoria "sensível" indica que a infecção por uma determinada amostra pode ser tratada adequadamente com a dose do agente antimicrobiano recomendada para esse tipo de infecção e patógeno;
- **'Intermediária'**: A categoria "intermediária" inclui amostras para as quais as concentrações inibitórias mínimas do agente antimicrobiano se aproximam de níveis sanguíneos e tissulares atingíveis e para os quais as taxas de resposta podem ser inferiores àquelas apresentadas por amostras sensíveis;
- **'Resistente'**: As amostras consideradas resistentes não são inibidas pelas concentrações geralmente atingíveis a níveis sistêmicos do agente antimicrobiano normalmente prescritas em tratamentos habituais (frequência e dosagem).

Considerando-se o exposto, pode-se notar que, do ponto de vista clínico, as categorias "intermediária" e "resistente" são semelhantes. Dessa forma, optamos por considerar as duas categorias como "não-sensíveis" na comparação das taxas de suscetibilidade e resistência aos antimicrobianos.

Em nosso trabalho, observamos que 69,80% dos testes de antibiograma por disco-difusão indicaram sensibilidade ao antimicrobiano pesquisado (Figura 15D). O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos mostrou-se diferente entre os grupos de estudo. No grupo Comunidade, observou-se sensibilidade de 83,84%, enquanto para os grupos que incluem amostras clínicas, taxas inferiores foram detectadas - 54,60% para ICS e 71,75% para ITU. Além disso, as amostras não-sensíveis do grupo Comunidade (16,16%) apresentaram, quase em sua totalidade, como resistência intermediária (13,80%), enquanto nos grupos

clínicos, a presença de amostras classificadas como resistentes (critério do CLSI) foi significativa.

Considerando-se a espécie, *E. gallinarum* apresentou-se como a mais resistente, por outro lado, foi a espécie com menor representação amostral do estudo completo (0,97%; Figura 7), com apenas 3 espécimes isolados. Considerando então *E. faecalis* e *E. faecium*, as espécies mais representativas do estudo, observamos *E. faecalis* (33,84%) como a espécie com maiores taxas de “não-sensibilidade”, seguida por *E. faecium* (22,88%).

Se considerarmos apenas as amostras clínicas do nosso estudo (n=75, grupos ICS e ITU), observamos que 60% dos testes que incluíam *E. faecium* indicaram resistência, em contraste com 34,77% dos ensaios com *E. faecalis*. Esses valores mostram que as amostras do grupo Comunidade contribuíram para reduzir o percentual global de resistência de *E. faecium*.

Fallah e colaboradores (2017) observaram, entre as amostras recuperadas de ITU, que a espécie *E. faecium* apresentou maior taxa de resistência a antimicrobianos do que *E. faecalis*. Para a primeira espécie, foram observadas taxas de 87,5% de resistência à vancomicina, eritromicina e ciprofloxacino, enquanto para *E. faecalis* as taxas foram superiores a 71% para tetraciclina, quinupristin/dalfopristin e rifampicina. Por outro lado, os antimicrobianos mais efetivos contra as espécies de *Enterococcus* foram linezolid, cloranfenicol e nitrofurantoína.

Observou-se, neste trabalho, baixa resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos testados: 6,8% das amostras foram resistentes à ampicilina e 9,71% à penicilina G (Figura 16D, Tabela 2). Estudos descrevem diferentes percentuais de resistência a esses fármacos. Enquanto Abamecha *et al.* (2015) observaram taxa de resistência de 35,96% para ampicilina e de 74,56% para penicilina G, todas as amostras foram sensíveis à ampicilina no trabalho de Anderson *et al.* (2016).

Detectamos apenas sete amostras resistentes à ampicilina, portanto, a maior taxa de sensibilidade do estudo (93,20%) (Figura 16D, Tabela 2). Essas amostras incluem três das 34 amostras de *E. faecium* e quatro das 65 amostras de *E. faecalis* (Anexos 1, 2 e 3B). Em trabalho publicado em 2008, d'Azevedo e colaboradores identificaram 95% das amostras de *E. faecium* como resistentes à ampicilina, porém, nenhuma amostra de *E. faecalis*, resultado semelhante ao de Abamecha *et al.* (2015). Estes últimos, por sua vez, identificaram resistência à penicilina em todas as amostras de *E. faecalis* e *E. faecium*.

Em relação às fluoroquinolonas, 62,14% das amostras foram resistentes ao ciprofloxacino e 24,27% ao levofloxacino (Figura 16, Tabela 2). Estes valores foram maiores que os encontrados por Abamecha *et al.* (2015) e Anderson *et al.* (2016) para o ciprofloxacino (50% e 33%, respectivamente) e menores que o observado por Anderson *et al.* (2016) para o levofloxacino (33,33%).

A taxa de resistência ao cloranfenicol foi uma das menores, 16,5% (Figura 16, Tabela 2), valor inferior à taxa de resistência de 34,2% encontrada por Abamecha *et al.* (2015).

Eritromicina foi a droga antimicrobiana para a qual se observou a taxa mais elevada de resistência (76,7%) (Figura 16, Tabela 2). Esse valor é relativamente próximo aos 63,2% descritos por Abamecha *et al.* (2015), porém inferior ao encontrado por Anderson *et al.* (2016), que identificaram resistência em 100% das amostras. Dessa forma, apesar da diferença encontrada, confirmamos, neste trabalho, que a resistência a esta droga é bastante difundida entre os enterococos (Murray, 2000; Sader *et al.*, 2001, 2004; Bender *et al.*, 2009).

O percentual de amostras resistentes à tetraciclina foi de 44,66% (Figura 16, Tabela 2), resultados que mostram um perfil diferente dos 64,9% (Abamecha *et al.*, 2015) e dos 86,67% (Anderson *et al.*, 2016) identificados em outros estudos.

A resistência à vancomicina foi detectada em 23,30% das amostras (Figura 16, Tabela 2), resultado muito superior aos descritos recentemente por Abamecha *et al.* (2015), que encontraram 1,75% de resistência, e por Anderson *et al.* (2016), que não identificaram amostras de VRE. Por outro lado, o percentual encontrado no nosso trabalho é inferior ao de 45,7% identificado por d'Azevedo e colaboradores (2008).

Apesar da identificação de *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* ser realizada utilizando-se os genes *vanC1* e *vanC2/vanC3*, respectivamente (Dutka-Malen *et al.*, 1995), genes de resistência intermediária à vancomicina que tornam essas espécies intrinsicamente resistentes a baixos níveis de vancomicina (Courvalin, 2006). Em nosso trabalho, nenhuma das três amostras de *E. casseliflavus* apresentou resistência detectável no teste de disco-difusão (Tabelas 3A e 3B). Resultado semelhante já foi observado; amostras de *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* foram sensíveis à vancomicina quando utilizado o mesmo método que nós, porém apresentaram crescimento em ágar seletivo com 6 µg/mL de vancomicina e a concentração inibitória mínima da droga foi de 8 µg/mL (Conceição *et al.*, 2011).

Ainda sobre a resistência à vancomicina, na última década, a transferência de genes de resistência entre diferentes linhagens de *E. faecium*, bem como a transferência da

resistência à vancomicina de *E. faecalis* para *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) têm sido reportadas (Willems *et al.*, 2001; Lester *et al.*, 2006; Palmer *et al.*, 2010), inclusive no Brasil (Rossi *et al.*, 2014), o que torna esse perfil de resistência ainda mais preocupante.

Em estudo recente, Abamecha *et al.* (2015) identificaram que 89,5% das amostras apresentaram resistência a três ou mais antimicrobianos, sendo 25,4% das amostras classificadas como MDR. Neste estudo, identificamos 40 padrões de resistência (Tabelas 3A e 3B). Destes, 28 perfis consistem na presença de resistência a, pelo menos, três antimicrobianos (44,66% das amostras), sendo que, destes, 27 padrões foram considerados perfis de MDR (42,72% das amostras) (Tabela 4). Nota-se que as amostras do grupo Comunidade reduzem o percentual global de amostras MDR do estudo, por apresentarem menor frequência de multirresistência que a detectada nas amostras clínicas (grupos ITU e ICS).

Foram avaliados os seguintes genes de resistência nas amostras de *Enterococcus* deste estudo: *erm(A)* e *erm(B)* que codificam metilases que alteram o sítio no rRNA 23s no qual se ligam macrolídeos (eritromicina), lincosamidas (lincomicina e clindamicina) e estreptograminas (quinupristin/dalfopristin) (Sutcliffe *et al.*, 1996); *mef(A/E)* que codificam bomba de efluxo de macrolídeos (Sutcliffe *et al.*, 1996); *ant(4')-Ia* que codifica uma enzima modificadora de aminoglicosídeos (estreptomicina e gentamicina) (Kobayashi *et al.*, 2001); *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)* que codificam resistência à tetraciclina por meio de uma bomba de efluxo (TetL) ou proteção ribossomal por meio dos outros dois genes (De Leener *et al.*, 2004) e *vanA*, *vanB*, *vanC1* e *vanC2/C3* que codificam ligases que alteram os peptídeooglicano da parede celular bacteriana (Cetinkaya *et al.*, 2000).

A frequência do gene *erm(A)* em amostras de *Enterococcus* é geralmente descrita como baixa, chegando a níveis de 6% (Schmitz *et al.*, 2000; Emaneini *et al.*, 2008). Neste trabalho, não observamos a presença do gene nas nossas amostras. Assim, como Santos e colaboradores (2017), também não detectamos a presença do gene *mef(A/E)*. Por outro lado, a presença de *erm(B)* em amostras de enterococos é relatada com frequência na literatura (De Leener *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2014; Reyes *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2017). De acordo com Santos *et al.* (2017), apesar de os macrolídeos não serem uma opção terapêutica regular para as infecções enterocócicas devido à grande frequência de resistência descrita e à disseminação do gene *erm(B)* entre os microrganismos do gênero, a pesquisa desses

determinantes genéticos é de grande relevância quando se considera o elevado potencial de transmissão horizontal desses marcadores para microrganismos de outros gêneros.

Observamos a presença dos genes *tet(L)* e *tet(M)* em nossas amostras, porém *tet(O)* não foi detectado. Em estudo conduzido por De Leener *et al.* (2004), os genes *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)* foram observados em 65%, 89% e 0% das amostras, respectivamente. Por sua vez, Santos e colaboradores (2017), observaram um padrão parecido com o nosso, porém em percentuais consideravelmente mais baixos: 35,3% para *tet(M)* e 10,3% para *tet(L)*.

Elevados níveis de resistência aos aminoglicosídeos e aos glicopeptídeos são comuns em amostras brasileiras (Cereda *et al.*, 1997). Na maioria dos casos, a resistência à vancomicina está relacionada à presença dos genes *vanA* ou *vanB*, que conferem diferentes níveis de resistência aos glicopeptídeos (Werner *et al.*, 2008; Papadimitriou-Olivgeris *et al.*, 2016). Em nosso estudo, detectamos a presença de determinante genético (*vanA*, *vanC1* ou *vanC2/C3*) para a resistência à vancomicina em 26% das amostras. Em relação aos glicopeptídeos, a detecção ocorreu em 37% das amostras, contrastando com o trabalho de Kobayashi *et al.* (2001), que identificaram o gene *ant(4')-Ia* em apenas 1,8% das amostras de *E. faecalis*.

6.5 Ausência de *integrons* nas amostras de *Enterococcus* do estudo

Integrons são comumente reportados como uma das principais formas de transmissão de genes codificadores da resistência a antimicrobianos (Mazel, 2006). Os *integrons* de classe 1 são identificados como fonte primária desses genes tanto em bactérias Gram positivas como Gram negativas (Shi *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007, 2008a,b), enquanto os de classe 2, são observados em algumas bactérias Gram negativas (Xu *et al.*, 2009).

Apesar da ampla disseminação dessas estruturas nas bactérias, a descrição de *integrons* em amostras de *Enterococcus* é, ainda, muito tímida - a presença dessas plataformas de resistência em amostras do gênero *Enterococcus* está relatada em dois trabalhos, publicados em 1999 e em 2010. No primeiro relato, Clark *et al.* (1999) identificam a presença da estrutura na amostra *E. faecalis* W4770. Por sua vez, Xu *et al.* (2010) identificaram *integrons* em 15 amostras de *Enterococcus*. Duas amostras de *E. faecalis* possuíam o gene *intI1*, que caracteriza a integrase de classe 1; 9 amostras de *E. faecalis* e duas de *E. faecium* com gene

int11 associado a cassetes gênicos e duas amostras de *E. faecalis* com os genes *int11* e *int12*, além de cassetes gênicos.

Assim, considerando-se a importância dessa estrutura genética para a área da microbiologia clínica e na tentativa de entender os motivos da escassez da presença de trabalhos relatando *integrons* em espécimes de *Enterococcus*, incluímos, em nosso projeto, a busca por estrutura nas bactérias do gênero. Em nossas 103 amostras (tanto as de origem indígena como de origem clínica) não detectamos gene que codifica integrase (foram investigados os genes *int11* e *int12* - os mais comuns). Esses resultados, somados aos raros relatos da estrutura nesse gênero bacteriano, sugerem que os *integrons* ainda são pouco disseminados entre amostras de *Enterococcus*.

6.6 Considerações finais

Nosso trabalho reitera a explicação para a dificuldade em se tratar pacientes com infecções relacionadas a *Enterococcus* spp., uma vez que esse organismo possui capacidade de sobreviver no ambiente hospitalar por longos períodos, resistência intrínseca a diversos antimicrobianos e habilidade marcante em adquirir novos mecanismos de resistência a antimicrobianos estratégicos, por meio de transferência horizontal de genes, inclusive, durante o período de tratamento, além, é claro, dos fatores de patogenicidade (Jett *et al.*, 1994). Porém, nossa contribuição está relacionada à avaliação dessas características em amostras brasileiras, contribuindo para um maior conhecimento acerca dos dados epidemiológicos das amostras do nosso País.

Apesar da semelhança dos dados apresentados com outros estudos nacionais ou de outros países, assim como Soares *et al.* (2014), reconhecemos que o pequeno número de amostras de *E. faecium* é uma limitação do nosso estudo, uma vez que esta espécie tem grande importância clínica, principalmente, por apresentar, com grande frequência, resistência à vancomicina.

Frequentemente, *E. faecalis* tem sido detectado com aumento na virulência, enquanto *E. faecium* comumente exibe características de multirresistência (Sharifi *et al.*, 2012). Assim, este estudo reforça características bem conhecidas de *E. faecalis* e *E. faecium* no que se refere a espécies com grau elevado de virulência e resistência antimicrobiana.

7 SÍNTESE DOS RESULTADOS, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

7.1 Síntese dos resultados e conclusões

Neste trabalho observamos que:

- *E. faecalis* é a espécie predominante nas infecções enterocócicas de corrente sanguínea nos hospitais estudados e infecções do trato urinário comunitárias não-complicadas. Por outro lado, *E. faecium* mostrou-se mais prevalente nas fezes de indivíduos saudáveis.
- Determinantes genéticos para diversos fatores de patogenicidade estão presentes nas amostras avaliadas (grupo ICS) e a expressão desses fatores é variada, como observado, por exemplo, para gelatinase e citolisina.
- A habilidade em produzir biofilme é uma característica observada em *Enterococcus*, havendo grandes variações na intensidade da produção. Observou-se maiores taxas de produção de biofilme nas amostras de *E. faecalis* oriundas de infecção do trato urinário.
- Cerca de 26% das amostras de *Enterococcus* oriundas de indivíduos saudáveis apresentaram resistência, principalmente aos antimicrobianos ciprofloxacino e eritromicina. No grupo ICS, 45% dos testes de suscetibilidade a antimicrobianos revelaram presença de resistência, o maior percentual dentre os grupos do estudo. Quando considerados os diferentes antimicrobianos, a distribuição da resistência foi bastante variada, sendo eritromicina, ciprofloxacino e tetraciclina os antimicrobianos com maior percentual de amostras resistentes e ampicilina, linezolid e penicilina G os antimicrobianos com mais amostras suscetíveis.
- A detecção de resistência à vancomicina chegou a 24 amostras (23,3%) e, destas, 23 apresentaram o determinante genético *vanA* e uma o determinante *vanC1*. As três amostras de *E. casseliflavus*, apesar de carregarem o gene *vanC2/C3*, apresentaram-se sensíveis à vancomicina no teste fenotípico.

- Foram detectados 40 diferentes padrões de resistência, sendo 27 classificados com MDR. Considerando-se o total de amostras, 44,66% foram classificadas como MDR.
- Não foram detectados *integrons* nas amostras deste estudo.

A análise desses resultados mostra o porquê de amostras do gênero *Enterococcus* serem consideradas como um dos principais e mais preocupantes grupos bacterianos emergentes. Traça ainda um panorama inicial e inédito acerca do perfil das infecções enterocócicas que ocorrem na cidade de Belo Horizonte - MG.

Esses dados reforçam a necessidade de um acompanhamento frequente da resistência antimicrobiana de amostras de *Enterococcus* a fim de identificar uma possível alteração no padrão da infecção, principalmente, quanto à emergência da espécie *E. faecium* e do aumento do isolamento de amostras VRE.

7.2 Perspectivas

Como perspectivas de continuidade deste trabalho, para maior esclarecimento dos mecanismos de patogenicidade e resistência antimicrobiana das amostras do grupo, propomos a investigação dos determinantes genéticos de patogenicidade para todos os grupos, além da ampliação da busca de genes de resistência e patogenicidade nas amostras. Experimentos *in vitro* e *in vivo* para avaliação da virulência das amostras também são uma possível perspectiva do estudo. Análise dos *clusters* obtidos pela técnica de (GTG)₅-PCR, a fim de avaliar a dispersão de genes de resistência antimicrobiana e patogenicidade entre as amostras de cada agrupamento. Por fim, a complementação do estudo com a tipagem genética por meio da técnica do MLST (tipagem por sequenciamento de *multilocus*) de algumas amostras, devido à inviabilidade de fazê-lo com todas, poderá fornecer uma melhor percepção acerca dos clones circulantes no Brasil (no nosso caso, em Belo Horizonte, MG), em relação aos clones circulantes globalmente.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abamecha A, Wondafrash B, Abdissa A. (2015). Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* species isolated from intestinal tracts of hospitalized patients in Jimma, Ethiopia. *BMC Research Notes*,8:213.
- Abat C, Huart M, Garcia V, Dubourg G, Raoult D. (2016). *Enterococcus faecalis* urinary-tract infections: Do they have a zoonotic origin? *Journal of Infection*, 9:305-313.
- Al Mohajer M, Darouiche RO. (2012). Sepsis syndrome, bloodstream infections, and device-related infections. *The Medical Clinics of North America*, 96:1203-1223.
- Al-Ahmad A, Ameen H, Pelz K, Karygianni L, Wittmer A, Anderson AC, Spitzmüller B, Hellwig E. (2014). Antibiotic resistance and capacity for biofilm formation of different bacteria isolated from endodontic infections associated with root-filled teeth. *Journal of Endodontics*,40:223–230.
- Amadeu ARORM, Sucupira JS, Jesus RMM, Rocha MLP. (2009). Infecções do Trato Urinário: análise da frequência e do perfil de sensibilidade da *Escherichia coli* como agente causador dessas infecções. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 41:275-277.
- Anderson AC, Jonas D, Huber I, Karygianni L, Wölber J, Hellwig E, Arweiler N, Vach K, Wittmer A, Al-Ahmad A. (2016). *Enterococcus faecalis* from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation. *Frontiers in Microbiology*, 11:1534.
- Arias CA, Murray BE. (2012). The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 10:266-278.
- Baldassarri L, Cecchini R, Bertuccini L, Ammendolia MG, Iosi F, Arciola CR, Montanaro L, Rosa RD, Gherardi G, Dicuonzo G. (2001). *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. *Medical Microbiology and Immunology*,190:113–120.
- Ballering KS, Kristich CJ, Grindle SM, Oromendia A, Beattie DT. (2009). Functional genomics of *Enterococcus faecalis*: multiple novel genetic determinants for biofilm formation in the core genome. *Journal of Bacteriology*, 191: 2806-2814.
- Bender EA, de Freitas AL, Reiter KC, Lutz L, Barth AL. (2009). Identification, antimicrobial resistance and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated in Porto Alegre, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40: 693-700.

- Berg RD. (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology*, 4:430–435.
- Bittencourt de Marques E, Suzart S. (2004). Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina. *Brazilian Journal of Medical Microbiology*, 53:1069–1073.
- Cafini F, Gómez-Aguado F, Corcuera MT, Ramos C, Bas P, Collado L, Gómez-Lus ML, Prieto J. (2015). Genotypic and phenotypic diversity in *Enterococcus faecalis*: is agar invasion a pathogenicity score? *Revista Española de Quimioterapia*. 28:101-108.
- Carattoli A. (2001). Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*, 32:243-259.
- Carvalho MG, Shewmaker PL, Steigerwalt AG, Morey RE, Sampson AJ, Joyce K, Barrett TJ, Teixeira LM, Facklam RR. (2006). *Enterococcus caccae* sp. nov. isolated from human stools. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56:1505–1508.
- Cercenado E. (2011). *Enterococcus*: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Suppl 5:59-65.
- Cereda R, Pignatari AC, Hashimoto A, Sader H. (1997). *In Vitro* Antimicrobial Activity Against Enterococci Isolated in a University Hospital in São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 1:83-90.
- Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. (2000). Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 13:686-707.
- Christaki E, Giamarellos-Bourboulis EJ. (2013). The complex pathogenesis of bacteremia: From antimicrobial clearance mechanisms to the genetic background of the host. *Virulence*, 5:57-65.
- Chuang ON, Schlievert PM, Wells CL, Manias DA, Tripp TJ. (2009). Multiple functional domains of *Enterococcus faecalis* aggregation substance Asc10 contribute to endocarditis virulence. *Infection and Immunity*, 77:539-548.
- Chuang-Smith ON, Wells CL, Henry-Stanley MJ, Dunny GM. (2010). Acceleration of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by aggregation substance expression in an ex vivo model of cardiac valve colonization. *PLoS ONE*, 5:e15798.

- Clark NC, Olsvik Ø, Swenson JM, Carol A, Tenover FC. (1999). Detection of a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43:157-160.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement*. CLSI document M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Comerlato CB, Resende MC, Caierão J, d'Azevedo PA. (2013). Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108:590-595
- Conceição N, Oliveira CDCHB, Silva PR, Ávila BGM, Oliveira AG. (2011). Trends in antimicrobial resistance among clinical isolates of enterococci in a Brazilian tertiary hospital: a 4-year study. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44:177-181.
- Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM, Murray BE. (1995). Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *Journal of Infectious Diseases*, 171:1223–1229.
- Cosentino S, Podda GS, Corda A, Fadda ME, Deplano M, Pisano MB. (2010). Molecular detection of virulence factors and antibiotic resistance pattern in clinical *Enterococcus faecalis* strains in Sardinia. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 51:31–36.
- Courvalin P. (2006). Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases*, 42:Suppl 1:S25-S34.
- Creti R, Imperi M, Bertuccini L, Fabretti F, Orefici G, Di Rosa R, Baldassarri L. (2004). Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *Journal of Medical Microbiology*, 53:13-20
- Dalla Costa LM, Souza DC, Martins LT, Zanella RC, Brandilone MC, Bokermann S, Sader HS, Souza HA. (1998). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2:160-163.
- d'Azevedo PA, Dias CAG, Lemos SK, Bittencourt JAF, Teixeira LM. (2004). Antimicrobial susceptibility among *Enterococcus* isolates from the city of Porto Alegre, RS, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 35:199-204.
- d'Azevedo PA, Furtado GH, Medeiros EA, Santiago KA, Silbert S, Pignatari AC. (2008). Molecular characterization of vancomycin-resistant Enterococci strains eight years apart

from its first isolation in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 50:195-198.

- De Leener E, Martel A, Decostere A, Haesebrouck F. (2004). Distribution of the erm (B) gene, tetracycline resistance genes, and Tn1545-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans. *Microbial Drug Resistance*, 10:341-345.
- Di Rosa R, Creti R, Venditti M, D'Amelio R, Arciola CR, Montanaro L, Baldassarri L. (2006). Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiology Letters*, 256:145-150.
- Donskey CJ. (2004). The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. *Clinical Infectious Diseases*, 39:219–226.
- Dunny GM, Hancock LE, Shankar N. (2014). Enterococcal Biofilm Structure and Role in Colonization and Disease. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N (Ed.). *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. [acesso em 08 fev 2016]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190433/>
- Dunny GM. (2013). Enterococcal sex pheromones: signaling, social behavior and Evolution. *Annual Reviews Genetics*, 47:475-500.
- Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:24-27.
- Dworniczek E, Piwowarczyk J, Bania J, Kowalska-Krochmal B, Wa-lecka E, Seniuk A, Dolna I, Gosciniak G. (2012). *Enterococcus* in wound infections: virulence and antimicrobial resistance. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 59: 263-269.
- Eaton TJ, Gasson MJ. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:1628-1635.
- Emanini M, Aligholi M, Aminshahi M. (2008). Characterization of glycopeptides, aminoglycosides and macrolide resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospitals in Tehran. *Polish Journal of Microbiology*, 57: 173–178.

- Facklam R.R., Carvalho M.G.S., Teixeira L.M. (2007). *Enterococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Landry ML.(editors). Manual of Clinical Microbiology.9th ed. Vol. 1. USA: Washington, American Society for Microbiology.
- Fallah F, Yousefi M, Pourmand MR, Hashemi A, Nazari Alam A, Afshar D. 2017. Phenotypic and genotypic study of biofilm formation in Enterococci isolated from urinary tract infections. *Microbial Pathogenesis*, 108:85-90.
- Fang H, Ohlsson AK, Ullberg M, Ozenci V. (2012). Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and the VITEK 2 system for the identification of clinical *Enterococcus* isolates. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31:3073-3077.
- FAO/WHO. (2002). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food* (pp. 1-11). London, Ontario, Canada.
- Fedorak RN. (2010). Probiotics in the management of ulcerative colitis. *Gastroenterology & Hepatology*, 6:688-690.
- Finegold SM, Sutter VL, Mathisen GE. (1983). Normal indigenous intestinal flora. In D. J. Hentges, *Human intestinal microflora in health and disease* (pp. 3-29). Waltham: Academic Press.
- Fisher K, Phillips C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155:1749-1757
- Fluit A, Florijn A, Verhoef J, Schmitz F-J. (2003). High-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* blood culture isolates from 23 European university hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21:357-359.
- Fox JG, Dewhirst FE, Fraser GJ, Paster BJ, Shames B, Murphy JC. (1994). Intracellular *Campylobacter*-like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a *Desulfovibrio* sp. *Journal of Clinical Microbiology*, 32:1229-1237.
- Franz CM, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Gálvez A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 151:125-40.
- Fux CA, Shirtliff M, Stoodley P, Costerton JW. (2005). Can laboratory reference strains mirror 'real-world' pathogenesis? *Trends in Microbiology*, 13:58-63.

- Gales AC, Sader HS, Ribeiro J, Zoccoli C, Barth A, Pignatari AC. (2009). Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 13:90-98.
- Garcia-Garrote F, Cercenado E, Bouza E. (2000). Evaluation of a new system, VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 38:2108-2111.
- Garg S, Mohan B, Taneja N. (2017). Biofilm formation capability of enterococcal strains causing urinary tract infection vis-a-vis colonisation and correlation with enterococcal surface protein gene. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 35:48-52.
- Gaspar FB, Crespo MTB, Lopes MFS. (2009). Proposal for a reliable enterococcal cytolysin production assay avoiding apparent incongruence between phenotype and genotype. *Journal of Medical Microbiology*, 58:1122-1124.
- Gilmore MS, Coburn PS, Nallapareddy SR, Murray BE. (2002). *Enterococcal Virulence*. In: Gilmore MS. (ed). *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*, 1 ed. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Gilmore MS, Lebreton F, van Schaik W. (2013). Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Current Opinion in Microbiology*, 16:10–16.
- Giridhara Upadhyaya PM, Ravikumar KL, Umaphathy BL. (2009). Review of virulence factors of *Enterococcus*: an emerging nosocomial pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27:301-305.
- Gonçalves A, Igrejas G, Radhouani H, Santos T, Monteiro R, Pacheco R, Alcaide E, Zorrilla I, Serra R, Torres C, Poeta, P. (2013). Detection of antibiotic resistant enterococci and *Escherichia coli* in free range Iberian Lynx (*Lynx pardinus*). *The Science of the Total Environment*, 456-457:115-119.
- Haas W, Shepard BD, Gilmore MS. (2002) Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature*, 415:84-87.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. (2004). Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 95-108.
- Hancock LE, Perego M. (2004). The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *Journal of Bacteriology*, 186:5629–5639.

- Hayashi H, Takahashi R, Nishi T, Sakamoto M, Benno Y. (2005). Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of Medical Microbiology*, 54:1093–1101.
- Heikens E, Bonten MJ, Willems RJ. (2007). Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *Journal of Bacteriology*, 189: 8233-8240.
- Heras J, Domínguez C, Mata E, Pascual V, Lozano C, Torres C, Zarazaga M. 2015. GelJ--a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics*, 16:270.
- Hidron AI, Edwards JR, Parel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK. (2008). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 29:996-1011.
- Hirt H, Greenwood-Quaintance KE, Karau MJ, Till LM, Kashyap PC, Patel R, Dunny GM. (2018). *Enterococcus faecalis* sex pheromone cCF10 enhances conjugative plasmid transfer *in vivo*. *mBio*, 9(1): e00037-18.
- Hollenbeck BL, Rice LB. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. *Virulence*, 3:421-33.
- Howden BP, Holt KE, Lam MMC, Seemann T, Ballard S, Coombs GW, Tong SYC, Grayson ML, Johnson PDR, Stinear TP. (2013). Genomic insights to control the emergence of vancomycin-resistant Enterococci. *mBio*, 4:e00412-13.
- Ike Y, Hashimoto H, Clewell DB. (1987). High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 25:1524-1528.
- Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. (2004). Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 42:3558-3565.
- Jahan M, Holley RA. (2014). Incidence of virulence factors in enterococci from raw and fermented meat and biofilm forming capacity at 25°C and 37°C. *International Journal of Food Microbiology*, 170:65-69.
- Jane F, Desforges MD. (1993). Management of Urinary Tract Infections in Adults. *The New England Journal of Medicine*, 7:1328-1334.

- Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. (1994). Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 7:462-478.
- Jia W, Li G, Wang W. (2014). Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species: a hospital-based study in China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11: 3424–3442.
- Jin WY, Jang SJ, Lee MJ, Park G, Kim MJ, Kook JK, Kim DM, Moon DS, Park YJ. (2011). Evaluation of VITEK 2, MicroScan, and Phoenix for identification of clinical isolates and reference strains. *Diagnostic Microbiology & Infectious Diseases*, 70:442–447.
- Jurkovic D, Krizková L, Sojka M, Belicová A, Dusinský R, Krajcovic J, Snauwaert C, Naser S, Vandamme P, Vancanneyt M. (2006). Molecular identification and diversity of enterococci isolated from Slovak Bryndza cheese. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 52:329-237.
- Kafil HS, Mobarez AM, Moghadam MF. (2013). Adhesion and virulence factor properties of Enterococci isolated from clinical samples in Iran. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*, 56:238-242.
- Kanoksil M, Jatapai A, Peacock SJ, Limmathurotsakul D. (2013) Epidemiology, microbiology and mortality associated with community-acquired bacteremia in northeast Thailand: a multicenter surveillance study. *PLoSOne*, 8:e54714.
- Klare I, Konstabel C, Mueller-Bertling S, Werner G, Strommenger B, Kettlitz C, Borgmann S, Schulte B, Jonas D, Serr A, Fahr AM, Eigner U, Witte W. (2005). Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24:815-825.
- Kline KA, Lewis AL. (2016). Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial Urinary Tract Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract. *Microbiology Spectrum*, 4.
- Kobayashi N, Alam M, Nishimoto Y, Urasawa S, Uehara N, Watanabe N. (2001). Distribution of aminoglycoside resistance genes in recent clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus avium*. *Epidemiology and Infection*, 126:197-204.
- Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. (2004). Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine*, 22:822-830

- Kollef MH, Zilberberg MD, Shorr AF, Vo L, Schein J, Micek ST, Kim M. (2011). Epidemiology, microbiology and outcomes of healthcare-associated and community-acquired bacteremia: a multicenter cohort study. *Journal of Infection*, 62:130-135.
- Laupland KB, Kibsey PC, Gregson DB, Galbraith JC. (2013). Population-based laboratory assessment of the burden of community-onset bloodstream infection in Victoria, Canada. *Epidemiology & Infection*, 141:174-180.
- Laupland KB. (2013). Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies. *Clinical Microbiology and Infection*, 19:492-500.
- Layton BA, Walters SP, Lam LH, Boehm AB. (2010). *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 109:539–547.
- Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. (2014). Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al., editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/>
- Lester CH, Frimodt-Møller N, Sørensen TL, Monnet DL, Hammerum AM. (2006). *In vivo* transfer of the vanA resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:596–599.
- Lopes MFS, Simões AN, Tenreiro R, Marques JJ, Crespo MTB. (2006). Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *International Journal of Food Microbiology*, 112:208-214.
- López-Salas P, Llaca-Díaz J, Morfin-Otero R, Tinoco JC, Rodríguez-Noriega E, Salcido-Gutierrez L, González GM, Mendoza-Olazarán S, Garza-González E. (2013). Virulence and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* clinical isolates recovered from three states of Mexico: detection of linezolid resistance. *Archives of Medical Research*, 44:422-428.
- MacCallum WG, Hastings TW. (1899). A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* (nov. spec.), with a description of the microorganism. *The Journal of Experimental Medicine*, 4:521-534.

- Maiden MCJ, van Rensburg MJJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, McCarthy ND. (2013). MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 11:728-736.
- Mannu L, Paba A, Daga E, Comunian R, Zanetti S, Duprè I, Sechi LA. (2003). Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *International Journal of Food Microbiology*, 88:291-304.
- Marra A, Dib-Hajj F, Lamb L, Kaczmarek F, Shang W, Beckius G, Millici AJ, Medina I, Gootz TD. (2007). Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 58:59-65.
- Marra AR, Camargo LF, Pignatari AC, Sukiennik T, Behar PR, Medeiros EA, Ribeiro J, Girão E, Correa L, Guerra C, Brites C, Pereira CA, Carneiro I, Reis M, de Souza MA, Tranchesini R, Barata CU, Edmond MB; Brazilian SCOPE Study Group. (2011). Nosocomial bloodstream infections in Brazilian Hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Journal of Clinical Microbiology*, 49:1866-1871.
- Martin JD, Mundt JO. (1972). Enterococci in insects. *Applied Microbiology*, 24:575-580.
- Mazel D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 4:608-620.
- Medeiros AW, Pereira RI, Oliveira DV, Martins PD, d'Azevedo PA, Van der Sand S, Frazzon J, Frazzon AP. (2014). Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45:327-332.
- Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. (2004). Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity*, 72:3658-3663.
- Murray BE. (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 3:46-65.
- Murray BE. (2000). Vancomycin-resistant enterococcal infections. *New England Journal of Medicine*, 342:710-721.
- Nallapareddy SR, Weinstock GM, Murray BE. (2003). Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. *Molecular Microbiology*, 47:1733-1747.

- Nesvera J, Hochmannová J, Pátek M. (1998). An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiology Letters*, 169:391-395.
- Nielubowicz GR, Mobley HL. (2010). Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nature Reviews: Urology*, 7:430-441
- Oliveira AC, Bettcher L. (2010). Aspectos epidemiológicos da ocorrência do *Enterococcus* resistente à vancomicina. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 44:725-731.
- Palmer KL, Kos VN, Gilmore MS. (2010). Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 13:632-639.
- Panesso D, Reyes J, Rincón S, Díaz L, Galloway-Peña J, Zurita J, Carrillo C, Altagracia M, Guzmán M, Adachi JA, Murray BE, Arias CA. (2010). Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in South American hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*, 48:1562-1569.
- Papadimitriou-Olivgeris M, Filippidou S, Kolonitsiou F, Drougka E, Koutsileou K, Fligou F, Dodou V, Sarrou S, Marangos M, Vantarakis A, Anastassiou ED, Petinaki E, Spiliopoulou I. (2016). Pitfalls in the identification of *Enterococcus* species and the detection of *vanA* and *vanB* genes. *Letters in Applied Microbiology*, 63:189-95.
- Paulsen IT, Banerjee L, Myers GSA, Nelson KE, Seshadri R, Read TD, Fouts DE, Eisen JA, Gill SR, Heidelberg JF, Tettelin H, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac L, Beanan M, Daugherty S, DeBoy RT, Durkin S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, Vamathevan J, Tran B, Upton J, Hansen T, Shetty J, Khouri H, Utterbacl T, Radune D, Ketchum KA, Dougherty BA, Fraser CM. (2003). Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*, 299: 2071-2074.
- Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. (2013). *Clinical relevance of the ESKAPE pathogens*. *Expert Reviews of Anti-Infective Therapy*, 11:297-308.
- Pereira G, Müller P, Zanella R, de Jesus Castro Lima M, Torchio D, Levin A. (2010). Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital: the lack of effect of measures directed mainly by surveillance cultures and differences in response between *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *American Journal of Infection Control*, 38:406-409.

- Poletto KQ, Reis C. (2005). Antimicrobial susceptibility of the uropathogens in out patients in Goiânia City, Goiás State. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*,38:416-420.
- Ramakrishnan K, Scheid DC. (2005). Diagnosis and Management of Acute Pyelonephritis in Adults. *American Family Physician*, 11:933-943.
- Reddy EA, Shaw AV, Crump JA. (2010). Community acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 10:417-432.
- Reyes J, Hidalgo M, Díaz L, Rincón S, Moreno J, Vanegas N, Castañeda E, Arias CA. (2007). Characterization of macrolide resistance in gram-positive cocci from Colombian hospitals: a countrywide surveillance. *International Journal of Infectious Diseases*, 11: 329–336.
- Ribas RM, Darini ALDC, Moreira TA, Freitas C, Gontijo Filho PP. (2007). Vancomycin-resistant VanA phenotype *Enterococcus faecalis*: first case in Minas Gerais state and epidemiological considerations. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 11:439-440.
- Ribeiro T, Oliveira M, Fraqueza MJ, Lauková A, Elias M, Tenreiro R, Barreto AS, Semedo-Lemsaddek T. (2011). Antibiotic resistance and virulence factors among Enterococci isolated from chouriço, a traditional Portuguese dry fermented sausage. *Journal of Food Protection*,74:465-9.
- Rosa RD, Creti R, Venditti M, D'Amelio R, Arciola CR, Montanaro L, Baldassari L. (2006). Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiology Letters*,256:145–150.
- Rossi F, Diaz L, Wollam A, Panesso D, Zhou Y, Rincon S, Narechania A, Xing G, Di Gioia TS, Doi A, Tran TT, Reyes J, Munita JM, Carvajal LP, Hernandez-Roldan A, Brandão D, van der Heijden IM, Murray BE, Planet PJ, Weinstock GM, Arias CA. (2014). Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. *New England Journal of Medicine*, 370:1524-1531.
- Rossi F. (2011). The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clinical infectious diseases*, 52:1138-1143.
- Rowe-Magnus DA, Mazel D. (2002). The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *International Journal of Medical Microbiology*, 292:115-25.

- Ruiz-Garbajosa P, Cantón R, Pintado V, Coque TM, Willems R, Baquero F, del Campo R. (2006). Genetic and phenotypic differences among *Enterococcus faecalis* clones from intestinal colonisation and invasive disease. *Clinical Microbiology and Infection*, 12:1193-1198.
- Ruzon FI, Paula SB, Kanoshiki RL, Santos JP, Kerbauy G, Kobayashi RKT, Yamauchi LM, Perugini MRE, Yamada-Ogatta SF. (2010). Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* vanA isolated from different sources at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. *Journal of Microbiology*, 48:814-821.
- Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, Jones RN. (2001). Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 5:200-214.
- Saint-Ruf C, Garfa-Traoré M, Collin V, Cordier C, Franceschi C, Matic I. (2014). Massive diversification in aging colonies of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 196:3059-3073.
- Santos BA, Oliveira JS, Cardoso NT, Barbosa AV, Superti SV, Teixeira LM, Neves FPG. (2017). Major globally disseminated clonal complexes of antimicrobial resistant enterococci associated with infections in cancer patients in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 55:56-62.
- Sava IG, Heikens E, Huebner J. (2010a). Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 16:533-540.
- Sava IG, Heinkens E, Kropec A, Theilacker C, Willems R, Huebner J. (2010b). Enterococcal surface protein contributes to persistence in the host but is not a target of opsonic and protective antibodies in *Enterococcus faecium* infection. *Journal of Medical Microbiology*, 59:1001-1004.
- Schmitz FJ, Sadurski R, Kray A, Boos M, Geisel R, Köhrer K, Verhoef J, Fluit AC. (2000). Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45: 891-894.
- Selden PA. (2007). Terrestrialization of animals. In: Briggs D, Crowther PR. *Paleobiology II*: 71-74. Malden: Blackwell Science.
- Semedo T, Santos MA, Martins P, Lopes MFS, Marques JJF, Tenreiro R, Crespo MTB. (2003). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic

- activity and occurrence of the *cyl* operon in Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:2569-2576.
- Seno Y, Kariyama R, Mitsuhata R, Monden K, Kumon H. (2005). Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta Medica Okayama*, 59:79–87.
- Shankar N, Lockatell CV, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS, Johnson DE. (2001). Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 69:4366–4372.
- Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. (1999). Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *inesp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and Immunity*, 67:193-200.
- Sharifi Y, Hasani A, Ghotaslou R, Varshochi M, Hasani A, Aghazadeh M, Milani M. (2012). Survey of virulence determinants among vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from clinical specimens of hospitalized patients of northwest of Iran. *Open Microbiology Journal*, 6:34-39.
- Shi L, Zheng M, Xiao Z, Asakura M, Su J, Lin L. (2006). Unnoticed spread of class 1 integrons in Gram-positive strains isolated in Guangzhou, China. *Microbiology and Immunology*, 50:463-467.
- Siegmán-Igra Y, Fourer B, Orni-Wasserlauf R, Golan Y, Noy A, Schwartz D, Giladi M. (2002). Reappraisal of community-acquired bacteremia: a proposal of a new classification for the spectrum of acquisition of bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, 34: 1431-1439.
- Sillanpää J, Nallapareddy SR, Singh KV, Prakash VP, Fothergill T, Ton-That H, Murray BE. (2010). Characterization of the *ebpfm* pilus-encoding operon of *Enterococcus faecium* and its role in biofilm formation and virulence in a murine model of urinary tract infection. *Virulence*, 1: 236-246.
- Silva LP, Pitondo-Silva A, Martinez R, da Costa Darini AL. (2012). Genetic features and molecular epidemiology of *Enterococcus faecium* isolated in two university hospitals in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 74:267-271.
- Singh KV, Nallapareddy SR, Sillanpää J, Murray BE. (2010). Importance of the collagen adhesin Ace in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis. *PLoS Pathogens*, 6:1–13.

- Smyth CJ, Matthews H, Halpenny MK, Brandis H, Colman G. (1987). Biotyping, serotyping and phage typing of *Streptococcus faecalis* isolated from dental plaque in the human mouth. *Journal of Medical Microbiology*, 23:45–54.
- Soares RO, Fedi AC, Reiter KC, Caierão J, d'Azevedo PA. (2014). Correlation between biofilm formation and gelE, esp, and agg genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. *Virulence*, 5:634-637.
- Søgaard M, Nøgaard M, Dethlefsen C, Schønheuder HC. (2011). Temporal changes in the incidence and 30-day mortality associated with bacteremia in hospitalized patients from 1992 through 2006: a population-based cohort study. *Clinical Infectious Diseases*, 52:61-69.
- Somerville GA, Beres SB, Fitzgerald JR, DeLeo FR, Cole RL, Hoff JS, Musser JM. (2002). In vitro serial passage of *Staphylococcus aureus*: changes in physiology, virulence factor production, and agr nucleotide sequence. *Journal of Bacteriology*, 184:1430-1437.
- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 40:175–179.
- Strateva T, Atanasova D, Savov E, Petrova G, Mitov I. (2016). Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*; 20:127–133
- Su J, Shi L, Yang L, Xiao Z, Li X, Yamasaki S. (2006). Analysis of integrons in clinical isolates of *Escherichia coli* in China during the last six years. *FEMS Microbiology Letters*, 254:75-80.
- Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. (1996). Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40:2562-2566.
- Svec P, Pantůček R, Petráš P, Sedláček I, Nováková D. (2010). Identification of *Staphylococcus* spp. using (GTG)₅-PCR fingerprinting. *Systematic and Applied Microbiology*, 33:451-456
- Svec P, Vancanneyt M, Seman M, Snauwaert C, Lefebvre K, Sedláček I, Swings J. (2005). Evaluation of (GTG)₅-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 247:59-63.
- Tannock GW, Cook G. (2002). Enterococci as members of the intestinal microflora of humans. In M. S. Gilmore, D. B. Clewell, P. Courvalin, G. M. Dunny, B. E. Murray, & L. B. Rice, *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*. Washington, D. C.: ASM Press

- Tannock GW. (2010). The bowel microbiota and inflammatory bowel diseases. *International Journal of Inflammation*, 2010:954051.
- Tavares W. (2000). Problem gram-positive bacteria: resistance in staphylococci, enterococci, and pneumococci to antimicrobial drugs. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33:281-301.
- Taxonomy Browser. (2018). *Enterococcus*. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1352>>. Acesso em 03 jan 2018.
- Terzić-Vidojević A, Veljović K, Begović J, Filipić B, Popović D, Tolinački M, Miljković M, Kojić M, Golić N. (2015). Diversity and antibiotic susceptibility of autochthonous dairy enterococci isolates: are they safe candidates for autochthonous starter cultures? *Frontier in Microbiology*, 6:954.
- Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, Amorena B, Leiva J, Penadés JR, Lasa I. (2001). The Enterococcal Surface Protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:4538-4545.
- Upadhyaya GP, Lingadevaru UB, Lingegowda RK. (2011). Comparative study among clinical and comensal isolates of *Enterococcus faecalis* for presence of Esp gene and biofilm production. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 5:365-369.
- Upadhyaya PM, Ravikumar KL, Umapathy BL. (2009). Review of virulence factors of enterococci: an emerging nosocomial pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27:301-305.
- Vallés J, Rello J, Ochagavía A, Garnacho J, Alcalá MA. (2003). Community-acquired bloodstream infection in critically ill adult patients: impact of shock and inappropriate antibiotic therapy on survival. *Chest*, 123:1615-1624.
- Vallés J, Palomar M, Álvarez-Lerma F, Rello J, Blanco A, Garnacho-Montero J, Martín-Loeches I; GTEI/SEMICYUC Working Group on Bacteremia. (2013). Evolution over a 15-year period of clinical characteristics and outcomes of critically ill patients with community-acquired bacteremia. *Critical Care Medicine*, 41:76-83.
- Van Essen-Zandbergen A, Smith H, Veldman K, Mevius D. (2007). Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and

- Campylobacters* pp. in the Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59:746-750.
- van Harten RM, Willems RJL, Martin NI, Hendrickx APA. (2017). Multidrug-Resistant Enterococcal Infections: New Compounds, Novel Antimicrobial Therapies? *Trends in Microbiology*, 25:467-479.
- Van Tyne D, Gilmore MS. (2014). Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. *Annual Review of Microbiology*, 68:337-356.
- Van Tyne D, Martin MJ, Gilmore MS. (2013). Structure, function, and biology of *the Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins*, 5:895-911.
- Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, Jabes D, Goossens H. (2004). Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42:4473-4479.
- Vasco RF, Moyses RM, Zatz R, Elias RM. (2016). Furosemide Increases the Risk of Hyperparathyroidism in Chronic Kidney Disease. *American Journal of Nephrology*, 43:421-430.
- Vranic SM, Zatric N, Rebic V, Aljicevic M, Abdulzaimovic A. (2017). The Most Frequent Isolates from Outpatients with Urinary Tract Infection. *Materia Socio-medica*, 29:17-20.
- Vu J, Carvalho J. (2011). *Enterococcus*: review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. *Frontiers in Biology*, 6:357-366.
- Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, Klare I, Kristinsson KG, Leclercq R, Lester CH, Lillie M, Novais C, Olsson-Liljequist B, Peixe LV, Sadowy E, Simonsen GS, Top J, Vuopio-Varkila J, Willems RJ, Witte W, Woodford N. (2008) Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveillance*, 13:pii:19046.
- Willems RJ, Homan W, Top J, van Santen-Verheuevel M, Tribe D, Manziros X, Gaillard C, Vandenbroucke-Grauls CM, Mascini EM, van Kregten E, van Embden JD, Bonten MJ. (2001). Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet*, 357:853-855.
- Xu Z, Li L, Alam MJ, Yamasaki S, Shi L. (2008b). First confirmation of integron-bearing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology*, 57:264-268.

- Xu Z, Li L, Shirliff ME, Alam MJ, Yamasaki S, Shi L. (2009). Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Southern China. *Journal of Clinical Microbiology*, 47:230-234.
- Xu Z, Li L, Shirliff ME, Peters BM, Peng Y, Alam MJ, Yamasaki S, Shi L. (2010). First report of class 2 integron in clinical *Enterococcus faecalis* and class 1 integron in *Enterococcus faecium* in South China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 68:315-317.
- Xu Z, Shi L, Alam MJ, Li L, Yamasaki S. (2008a). Integron-bearing methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in South China, 2001-2004. *FEMS Microbiology Letters*, 278:223-230.
- Xu Z, Shi L, Zhang C, Zhang L, Li X, Cao Y, Li L, Yamasaki S. (2007). Nosocomial infection caused by class 1 integron-carrying *Staphylococcus aureus* in a hospital in South China. *Clinical Microbiology and Infection*, 13:980-984.
- Yan H, Li L., Zong M, Alam MJ, Shinoda S, Shi L. (2010). Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in clinical bacterial isolates from patients in South China. *Journal of Health Science*, 56:442-450.
- Yu G, Li Y, Liu X, Zhao X, Li Y. (2013). Role of integrons in antimicrobial resistance: a review. *African Journal of Microbiology Research*, 7:1301-1310.
- Zhanell GG, Hisanaga TL, Laing NM, DeCorby MR, Nichol KA, Weshnoweski B, Johnson J, Noreddin A, Low DE, Karlowsky JA, for the NAUTICA Group, Hoban DJ. (2006). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* outpatient urinary isolates: final results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 8:468-475.
- Zheng JX, Bai B, Lin ZW, Pu ZY, Yao WM, Chen Z, Li DY, Deng XB, Deng QW, Yu ZJ. (2017a). Characterization of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* isolates derived from urinary tract infections in China. *Journal of Medical Microbiology*. (no prelo). DOI 10.1099/jmm.0.000647.
- Zheng JX, Wu Y, Lin ZW, Pu ZY, Yao WM, Chen Z, Li DY, Deng QW, Qu D, Yu ZJ. (2017b). Characteristics of and Virulence Factors Associated with Biofilm Formation in Clinical *Enterococcus faecalis* Isolates in China. *Frontiers in Microbiology*, 24;8:2338.

ANEXO 1 - TABELA DE RESULTADOS: GRUPO COMUNIDADE

AMOSTRA	ESPÉCIE	TESTES FENOTÍPICOS			GENES DE RESISTÊNCIA								INTEGRON	ANTIBIOGRAMA								
		Gelatinase	Citolisina	Biofilme	erm(A)	erm(B)	mef(A/E)	ant(4)-Ia	tet(L)	tet(M)	tet(O)	van		int1/2/3	AMP	CIP	CLO	ERI	LVX	LZD	PEN	TET
1	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	+	-	+	+	-	-	-	-	28,12	22,16	25,69	14,53	20,98	26,94	20,46	27,93	22,21
2	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	+	-	+	+	-	-	-	-	27,86	18,09	26,91	20,72	23,06	27,35	22,58	26,25	23,01
3	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	+	-	+	+	-	-	-	-	28,45	20,07	28,01	19,67	18,17	27,22	20,43	26,45	21,27
4	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	+	-	+	+	-	-	-	-	28	21,83	28,52	11,62	15,84	29,38	20,09	27,67	21,81
5	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	+	-	-	+	-	-	-	-	29,92	16,87	26,32	17,63	27,97	27,41	21,47	24,47	21,06
6	<i>E. faecium</i>	-	Beta	NP	-	+	-	+	+	+	-	-	-	26,14	15,92	25,89	17,83	17,81	27,57	15,18	25,74	20,5
7	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	+	-	-	+	-	-	-	-	31,69	22,7	23,56	18,82	22,46	25,8	26,1	26,3	19,62
8	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	+	-	-	+	+	-	-	-	25,93	21,99	24,23	11,02	21,06	25,89	15,88	26,1	20,48
9	<i>E. faecium</i>	-	-	B	-	+	-	+	+	+	-	-	-	37,23	25,29	29,25	15,8	23,84	28,16	33,97	26,89	22,14
10	<i>E. faecium</i>	-	-	B	-	+	-	-	+	+	-	-	-	30,53	22,62	26,83	15,93	22,6	29,29	21,95	27,11	19,59
11	<i>E. faecium</i>	+	Beta	NP	-	+	-	-	+	-	-	-	-	28,85	23,21	29,47	28,09	21,48	27,4	20,7	26,74	23,03
12	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	+	-	-	+	-	-	-	-	34,5	21,21	31,01	22,59	20,54	27,16	30,71	27,88	23,55
13	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	+	-	-	+	-	-	-	-	29,46	18,59	26,01	18,58	19,82	26,82	20,87	28,39	21,11
14	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	+	-	+	+	+	-	-	-	27,3	22,61	27,01	27,44	20,61	26,9	20,48	9,2	21
15	<i>E. faecium</i>	-	-	M	-	+	-	+	+	+	-	-	-	37,57	20,79	27,75	20,13	20,85	27,68	36,17	28,19	22,9
16	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	+	-	-	+	-	-	-	-	25,03	19,63	26,6	26,11	19,63	26,21	21,52	26,46	19,98
17	<i>E. faecalis</i>	-	-	NP	-	+	-	+	+	-	-	-	-	28,38	19,39	23,53	23,63	21,25	26,66	22,96	25,75	18,53
18	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	+	-	-	+	+	-	-	-	27,95	19,92	24,45	26,91	18,09	28,17	22,4	7,34	20,65
19	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	+	-	-	-	-	-	-	-	27,19	22,68	26,82	27,64	21,12	26,96	22,82	27,02	21,58
20	<i>E. faecium</i>	-	-	M	-	+	-	+	+	-	-	-	-	30,19	21,43	24,79	20,16	20,31	27,85	23,95	26,03	20,24
21	<i>E. casseliflavus</i>	-	Alfa	NP	-	+	-	+	+	+	-	C2/C3	-	28,55	20,25	25,03	24,37	19,34	25,23	26,14	23,6	18,57
22	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	+	-	+	+	-	-	-	-	33,06	25,59	26,39	12,88	25,78	28,01	31,73	28,48	22,63
23	<i>E. faecalis</i>	+	-	NP	-	-	-	-	+	-	-	-	-	28,19	19,48	21,58	19,48	19,5	25,81	22,26	23,01	17,71
24	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	+	-	-	+	-	-	-	-	24,78	20,27	25,71	13,14	19	27,57	20,23	26,43	20,95
25	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	-	-	+	+	-	-	-	-	26,59	19,76	27,61	20,57	22,12	26,62	22,94	25,61	21,67
26	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	-	-	-	+	-	-	-	-	33,92	16,45	27,34	18,75	16,67	26	31,57	25,73	23,28
27	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	+	-	+	-	-	-	-	-	26,58	19,38	27,17	25,33	20,17	25,39	23,4	26,11	21,95
28	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	+	-	-	+	-	-	-	-	30,99	17,05	28,91	19,11	18,1	25,21	26,5	27,12	20,39
29	<i>E. faecalis</i>	-	-	M	-	+	-	-	+	-	-	-	-	30,48	22,67	26,61	22,96	24,84	27,15	26,88	23,41	20,52
30	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	+	-	+	+	-	-	-	-	25,31	23,79	23,14	15,45	24,6	25,53	20,74	23,74	21,65
31	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	-	-	-	+	+	-	-	-	26,57	14,9	22,06	13,78	18,25	24,62	21,06	0	20,05
32	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	+	-	-	-	+	-	-	-	32,96	19,81	26,15	24,73	17,74	25,85	32,4	18,03	20,35
33	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	-	+	-	-	+	-	-	-	-	30,99	22,89	27,75	21,96	23,98	26,51	30,39	26,52	21,41

ANEXO 2 - TABELA DE RESULTADOS: GRUPO ITU

AMOSTRA	ESPÉCIE	TESTES FENOTÍPICOS			GENES DE RESISTÊNCIA								INTEGRON	ANTIBIOGRAMA								
		Gelatinase	Citolisina	Biofilme	erm(A)	erm(B)	mef(A/E)	ant(4)-Ia	tet(L)	tet(M)	tet(O)	van		int1/2/3	AMP	CIP	CLO	ERI	LVX	LZD	PEN	TET
34	<i>E. faecalis</i>	+	-	NP	-	+	-	-	+	+	-	-	-	30,67	21,52	29,13	22,77	22,92	28,8	21,92	25,56	21,1
35	<i>E. faecalis</i>	-	Beta	M	-	+	-	-	-	+	-	-	-	28,88	22,94	25,06	0	23,51	29,73	20,99	10,46	19,17
36	<i>E. faecalis</i>	-	-	M	-	+	-	+	+	+	-	-	-	29,89	25,41	27,78	26,95	25,18	31,33	19,84	27,42	19,74
37	<i>E. faecalis</i>	+	-	NP	-	+	-	-	+	+	-	-	-	30,76	21,9	26,43	27,1	22,41	27,62	22,38	26,1	19,21
38	<i>E. faecalis</i>	+	-	NP	-	+	-	-	+	+	-	-	-	28,5	19,87	27,43	26,76	21,16	26,29	20,37	24,25	17,89
39	<i>E. faecalis</i>	-	-	A	-	+	-	+	+	+	-	-	-	28,72	21,64	26,39	26,23	22,25	29,72	22,47	12,11	19,99
40	<i>E. faecalis</i>	+	-	B	-	+	-	-	+	+	-	-	-	29,16	21,91	26	0	22,44	27,16	21,42	9,34	19,36
41	<i>E. faecalis</i>	+	-	B	-	+	-	+	+	+	-	-	-	27,92	21,46	25,27	0	22,59	26,99	20,68	9,87	19,02
42	<i>E. faecalis</i>	-	-	NP	-	+	-	+	+	+	-	A	-	27	22,67	12,75	0	23,17	27,51	16,52	8,27	16,54
43	<i>E. faecalis</i>	-	-	NP	-	+	-	+	+	+	-	A	-	33,78	22,47	25,65	0	21,98	27,23	25,87	0	16,65
44	<i>E. faecalis</i>	-	-	B	-	+	-	+	+	+	-	-	-	29,62	21,19	25,31	21,61	22,09	27,3	20,97	24,82	19,55
45	<i>E. faecalis</i>	+	-	B	-	+	-	+	+	+	-	-	-	28,95	21,28	23,29	0	24,24	28,3	21,89	8,46	19,32
46	<i>E. faecalis</i>	+	-	NP	-	+	-	-	+	+	-	-	-	29,63	21,7	11,09	0	18,15	28,72	21,52	10,51	19,38
47	<i>E. faecalis</i>	+	-	M	-	+	-	-	+	+	-	-	-	31,91	22,35	27,47	0	17,19	29,94	16,56	0	20,37
48	<i>E. faecalis</i>	-	-	A	-	+	-	-	+	+	-	-	-	29,88	21,31	27,66	24,88	21,71	27,36	21,4	8,9	20,86
49	<i>E. faecalis</i>	+	Beta	B	-	+	-	-	+	+	-	-	-	27,39	20,95	23,5	0	21,14	27,13	17,85	10,11	17,52
50	<i>E. faecalis</i>	-	-	NP	-	+	-	-	+	+	-	-	-	28,52	21,55	23,35	24,32	24,72	26,86	18,56	22,12	17,02
51	<i>E. faecalis</i>	-	Beta	M	-	+	-	-	+	+	-	A	-	35,73	24,72	32,05	30,15	17,61	36,14	21,58	26,02	15,38
52	<i>E. faecalis</i>	-	Beta	B	-	-	-	+	+	+	-	A	-	28,35	21,51	20,22	0	22,03	27,71	18,81	8,35	15,68
53	<i>E. faecalis</i>	+	-	M	-	+	-	-	+	+	-	-	-	27,33	22,87	27,38	24,87	13,51	28,98	20,2	7,96	18,84
54	<i>E. faecalis</i>	-	Beta	NP	-	-	-	-	+	+	-	A	-	21,49	0	10,36	0	18,13	28,6	0	9,22	16,25
55	<i>E. faecalis</i>	-	-	B	-	+	-	-	+	+	-	A	-	11,15	18,52	9,73	19,41	10,3	22,48	15,61	22,51	16,85
56	<i>E. faecalis</i>	+	-	NP	-	-	-	-	+	+	-	A	-	16,97	13,82	24,24	0	13,88	25,93	10,81	0	14,73
57	<i>E. faecalis</i>	-	Beta	NP	-	-	-	-	+	+	-	-	-	17,26	20,17	24,62	24,92	18,04	29,63	9	12,21	21,02
58	<i>E. faecalis</i>	-	Beta	NP	-	+	-	-	+	+	-	-	-	28,41	23,31	24,29	0	23,17	26,8	20,04	12,36	18,85
59	<i>E. faecalis</i>	+	-	M	-	-	-	-	+	+	-	-	-	27,91	19,93	22,89	0	19,94	27,53	20,72	9,4	18,6
60	<i>E. faecalis</i>	-	Beta	NP	-	-	-	-	+	+	-	-	-	28,29	21,84	23,4	25,02	22,19	26,87	20,48	8,8	18,23
61	<i>E. faecalis</i>	+	-	NP	-	+	-	+	+	+	-	-	-	27,35	20,52	23,18	20,32	20,51	25,01	20,01	21,92	17,15
62	<i>E. faecalis</i>	-	-	NP	-	+	-	-	+	+	-	-	-	30,85	20,83	27,89	23,45	23,1	25,82	22,04	12,64	19,48
63	<i>E. faecalis</i>	-	Beta	NP	-	+	-	-	+	+	-	A	-	28,82	18,48	9,95	0	19,61	24,42	16,48	20,46	16,99
64	<i>E. faecalis</i>	-	-	B	-	+	-	-	+	+	-	A	-	28,98	0	11,64	0	0	25,8	20,58	0	16,14
65	<i>E. faecalis</i>	+	-	M	-	+	-	-	+	+	-	-	-	28,82	0	23,28	0	0	28,06	19,88	7,32	19,25
66	<i>E. faecalis</i>	-	-	M	-	+	-	-	+	+	-	-	-	28,66	0	11,19	0	0	25,89	21,14	0	18,67
67	<i>E. faecalis</i>	-	Beta	NP	-	-	-	-	+	+	-	-	-	29,75	22,48	26,34	23,71	22,03	25,78	21,41	8,95	17,89
68	<i>E. faecalis</i>	+	Beta	NP	-	+	-	-	+	+	-	A	-	26,86	25,94	26,08	21,08	24,53	26,56	20,97	24,21	16,82

ANEXO 3A - TABELA DE RESULTADOS: GRUPO ICS - VIRULÊNCIA

AMOSTRA	ESPÉCIE	TESTES FENOTÍPICOS			GENES DE VIRULÊNCIA												
		Gelatinase	Citolisina	Biofilme	<i>gelE</i>	<i>cylA</i>	<i>cylM</i>	<i>cylLI</i>	<i>cylLs</i>	<i>esp</i>	<i>efaAfs</i>	<i>efaAfm</i>	<i>cpd</i>	<i>cob</i>	<i>ccf</i>	<i>ace</i>	<i>hyl</i>
69	<i>E. casseliflavus</i>	-	Alfa	NP	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
70	<i>E. casseliflavus</i>	-	Alfa	NP	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
71	<i>E. faecalis</i>	-	-	B	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
72	<i>E. faecalis</i>	+	-	NP	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
73	<i>E. faecalis</i>	-	-	NP	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
74	<i>E. faecalis</i>	-	-	NP	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
75	<i>E. faecalis</i>	+	-	NP	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
76	<i>E. faecalis</i>	+	Alfa	M	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
77	<i>E. faecalis</i>	-	Alfa	NP	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
78	<i>E. faecalis</i>	+	Alfa	NP	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
79	<i>E. faecalis</i>	+	Alfa	NP	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-
80	<i>E. faecalis</i>	+	Alfa	NP	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-
81	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
82	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
83	<i>E. faecium</i>	-	Alfa	NP	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
84	<i>E. faecium</i>	-	Alfa	NP	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
85	<i>E. faecalis</i>	-	Alfa	NP	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
86	<i>E. faecalis</i>	+	-	B	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
87	<i>E. faecalis</i>	-	-	M	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
88	<i>E. faecalis</i>	+	-	NP	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
89	<i>E. faecalis</i>	-	-	NP	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
90	<i>E. faecalis</i>	+	-	NP	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
91	<i>E. faecalis</i>	-	-	NP	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
92	<i>E. faecalis</i>	+	Alfa	NP	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-
93	<i>E. faecalis</i>	-	-	NP	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
94	<i>E. faecalis</i>	+	-	NP	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
95	<i>E. faecalis</i>	+	-	B	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
96	<i>E. faecalis</i>	+	-	B	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
97	<i>E. faecalis</i>	+	-	B	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
98	<i>E. faecium</i>	-	-	NP	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
99	<i>E. faecalis</i>	-	-	B	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
100	<i>E. gallinarum</i>	-	Alfa	NP	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
101	<i>E. faecalis</i>	-	Beta	NP	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
102	<i>E. faecalis</i>	-	-	A	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
103	<i>E. faecalis</i>	-	Beta	NP	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-

ANEXO 3B - TABELA DE RESULTADOS: GRUPO ICS - RESISTÊNCIA

AMOSTRA	ESPÉCIE	GENES DE RESISTÊNCIA								INTEGRON	ANTIBIOGRAMA								
		erm(A)	erm(B)	mef(A/E)	ant(4)-Ia	tet(L)	tet(M)	tet(O)	van		int1/2/3	AMP	CIP	CLO	ERI	LVX	LZD	PEN	TET
69	<i>E. casseliflavus</i>	-	+	-	-	+	+	-	C2/C3	-	22,77	16,71	22,89	22,33	16,65	26,25	18,69	27,01	23,3
70	<i>E. casseliflavus</i>	-	+	-	+	+	+	-	C2/C3	-	20,32	12,74	24,61	23,45	14,98	27,09	24,37	21,2	20,49
71	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	-	23,8	17,8	9,15	0	19,51	23,79	19,59	8,49	17,59
72	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	13,79	0	9,96	0	0	27,83	0	0	19,24
73	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-	+	+	-	A	-	26,67	19,97	23,31	21,23	20,27	25,48	21,2	12,46	14,62
74	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	-	27,91	20,04	23,27	21,73	21,8	26,17	21,26	10,83	17,78
75	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	-	26,02	19,98	17,91	0	19,63	25,15	18,21	24,55	18,38
76	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	-	29,48	22,97	22,03	0	23,55	26,32	24,05	21,32	20,91
77	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	+	+	+	-	A	-	21,84	18,35	21,16	26,53	18,75	25,85	19,65	20,71	14,2
78	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	-	24,52	20,01	24,72	25,88	18,94	26,7	19,07	24,96	19,26
79	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-	+	+	-	A	-	24,62	10,2	19,94	0	0	24,84	18,17	19,87	13,36
80	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-	+	+	-	A	-	25,77	17,53	0	0	19,63	21,01	20,94	8,99	0
81	<i>E. faecium</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	-	0	0	22,54	0	0	29,29	0	28,63	22,99
82	<i>E. faecium</i>	-	+	-	+	+	+	-	A	-	0	0	0	0	0	28,84	0	26,8	10,21
83	<i>E. faecium</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	-	17,13	15,49	24,3	8,7	15,83	27,32	12,47	26,2	20,19
84	<i>E. faecium</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	-	19,36	16,1	22,64	16,63	15,01	27,12	11,98	31,01	17,94
85	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-	+	+	-	A	-	26,38	18,15	11,21	9,91	16,19	27,02	20	8,43	10,07
86	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	26,65	17,18	23,11	22,33	19,34	26,43	20,83	25,51	18,19
87	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	-	18,46	17,71	21,87	20,83	14,74	25,84	18,87	8,92	17,73
88	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	-	21,13	18,33	21,86	20,13	16,14	26,47	19,6	10,92	17,66
89	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	-	29,67	18	23,2	0	21,7	27,72	26,87	8,2	18,38
90	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	-	25,4	18,36	21,5	20,77	18,92	25,64	20,89	13,98	17,77
91	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	-	30,21	20,21	19,5	0	20,83	25,5	24,5	7,87	17,09
92	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	-	23,96	16,95	20,13	19,36	16,75	24,54	17,96	13,21	17,69
93	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	-	26,83	21,94	10,38	0	21,09	24,8	20,43	0	18,61
94	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-	+	+	-	A	-	25,64	0	11,75	0	0	26,8	19,43	10,78	0
95	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	+	+	-	A	-	24,39	18,56	20,79	22,15	21,27	25,25	18,88	24,45	16,96
96	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	+	+	+	-	A	-	26,85	18,6	21,52	21,76	23,18	24,79	20,69	23,51	14,76
97	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-	+	+	-	A	-	25,23	0	20,85	0	0	25,19	15,61	8,83	0
98	<i>E. faecium</i>	-	+	-	-	+	+	-	A	-	0	0	21,53	0	0	0	0	25,96	0
99	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-	+	+	-	A	-	10,27	17,84	8,91	0	0	0	0	9,43	0
100	<i>E. gallinarum</i>	-	+	-	-	+	-	-	C1	-	25,48	19,9	10,3	0	18	21,28	21,28	10,68	15,95
101	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	27,47	18,52	23,16	21,21	19,21	22,03	22,03	26,14	18,02
102	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-	+	-	-	A	-	28,19	19,5	21,15	0	15,74	17,3	17,3	17,8	11,58
103	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	-	28,72	19,77	21,75	20,65	19,67	22,69	22,69	25,71	19,31

ANEXO 4 – ARTIGO PUBLICADO

BRIEFING COMMUNICATION

J Bras Patol Med Lab, v. 52, n. 5, p. 312-315, October 2016

Expression of pathogenicity factors by *Enterococcus* strains isolated from inpatients with bloodstream infection in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Expressão de fatores de patogenicidade por amostras de Enterococcus isoladas de pacientes com infecção de corrente sanguínea em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Samir de Deus E. Andrade; Amanda Maria P. Borges; Gustavo A. R. Duarte; Simone G. Santos; Luiz M. Farias; Paula P. Magalhães

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Minas Gerais, Brazil.

ABSTRACT

In this investigation, we addressed the pathogenicity profile of 35 *Enterococcus* samples isolated from inpatients with bloodstream infections (BSI) at hospitals in Belo Horizonte (MG), Brazil. The most prevalent species was *E. faecalis* (27/77.14%). The ability to produce gelatinase and cytolysin was detected in 14/40% of the samples and presented a heterogeneous distribution. Biofilm production was observed in 27 strains (77.14%) and classified as weak (8/22.86%), moderate (18/51.42%), or strong (1/2.86%). This study adds to knowledge of the pathogenicity profile of *Enterococcus* strains isolated from BSI, aiming to increase understanding about virulence of the circulating strains in Brazil.

Key words: *Enterococcus*; virulence; gelatinases; hemolysin proteins; biofilms.

INTRODUCTION

Bloodstream infections (BSI) are associated with high morbidity and mortality rates worldwide⁽¹⁾. Cases related to *Candida* spp., *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus* spp. are frequently fatal⁽²⁾.

Bacteria of the *Enterococcus* genus are members of the indigenous intestinal microbiota. Initially, the group was not recognized as having great clinical relevance, but has lately emerged as an important nosocomial pathogen. These microorganisms can synthesize the enzymes gelatinase and cytolysin, as well as adhesion proteins, which confer capacity of biofilm formation to the samples. These abilities contribute to their capacity to survive for long periods in surfaces and can help explain their dissemination in hospital settings^(3,4).

The objective of this study was to confirm the identification of *Enterococcus* samples isolated from BSI patients in hospitals

of Belo Horizonte (MG), Brazil, to the species level. Another objective was to assess the expression of pathogenicity factors that are important for the infectious process associated with the microorganism.

MATERIAL AND METHOD

Thirty-five *Enterococcus* samples isolated during 2008 and 2009 from blood cultures of inpatients with BSI in different hospitals of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, were included in the study. The project was approved by the Ethics Research Committees of the participant hospitals and of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (ETIC 114/08).

The species-level biochemical and physiological identification (Vitek® 2) of bacteria was confirmed by polymerase chain reaction (PCR), using the conditions and the starters described by Dutka-Malen *et al.*⁽⁵⁾. Moreover, the

First submission on 03/05/16; last submission on 02/09/16; accepted for publication on 11/09/16; published on 20/10/16

samples identified as *E. casseliflavus* by the physiological and biochemical method were tested for pigment production in tryptic soy agar (TSA) with 5% horse blood⁽⁶⁾.

In order to assess gelatinase production, bacteria were inoculated into nutrient agar with 3% gelatin; enzyme production was identified by the presence of clear zones around the colonies⁽⁷⁾. In order to investigate cytolysin production, samples were inoculated into TSA with 5% horse blood, and the enzyme was detected by the presence of hemolysis zones⁽⁷⁾.

The assay to assess biofilm production was based on modifications in a protocol described by López-Salas *et al.*⁽⁴⁾. The inoculum was adjusted to the turbidity of a 0.5 McFarland standard, and then was diluted 1:40 in tryptic soy broth with 2% glucose. Suspensions were inoculated into 96-well microplates and incubated. Then, plates were processed and stained with crystal violet solution. Excess crystal violet was removed, the stain adhering to the microplate was solubilized, and the optical density of the solution was measured at 570 nm. The samples were classified as biofilm producers (absorbance > 0.5) or non-biofilm producers (absorbance ≤ 0.5); production, in its turn, was classified as strong (absorbance > 2), moderate (1 < absorbance ≤ 2), or weak (0.5 < absorbance ≤ 1).

RESULTS

The distribution of *Enterococcus* species, considering the method of genotypic identification, was *E. faecalis* – 27 samples (77.14%), *E. faecium* – five samples (14.29%), *E. casseliflavus* – two samples (5.71%), and *E. gallinarum* – one sample (2.86%) (**Figure A**). There was agreement of 97.14% (34/35) in species-level identification between the genetic technique and the physiologic and biochemical method. Both samples of *E. casseliflavus* produced pigment, forming yellow colonies. PCR result was considered definitive.

Gelatinase production was detected in 14 (40%) samples of *E. faecalis* (**Figure B**). Capacity for cytolysin production was also detected in 14 (40%) samples, although with a distinct distribution (**Figure C**), and among which just two samples of *E. faecalis* were classified as beta-hemolytic. Five samples, all *E. faecalis*, were able to synthesize both enzymes.

Biofilm production was observed in most samples (27/35, 77.14%). Among them, 18 (51.42%) were included in the category of moderate production; one (2.86%) presented strong biofilm production; and eight (22.86%), weak production (**Figure D**).

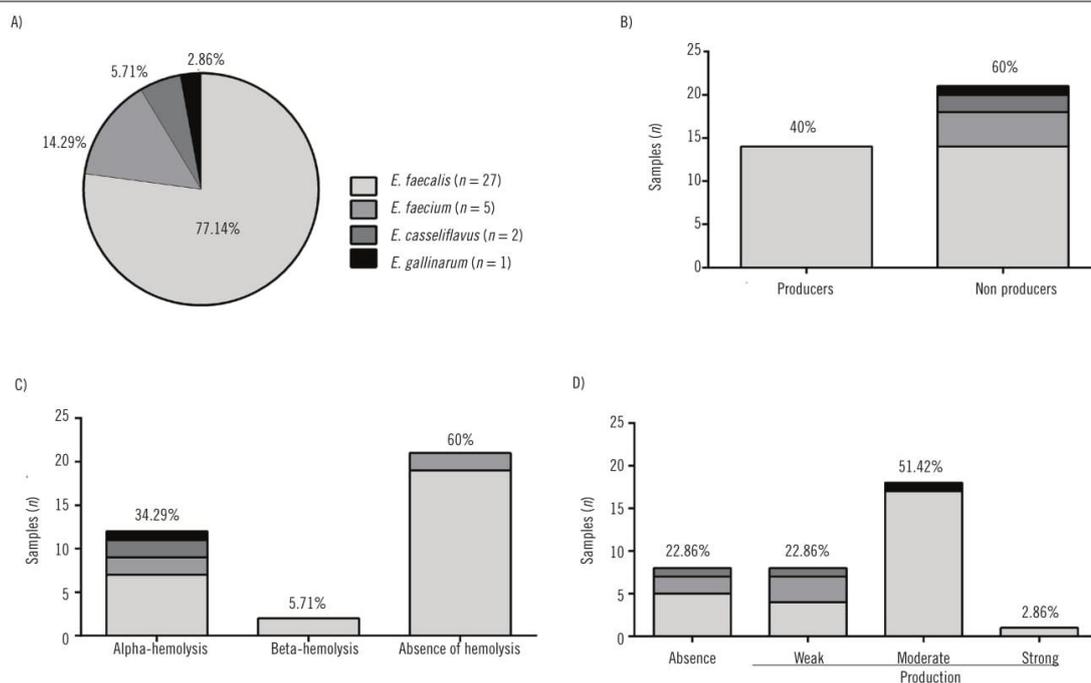


FIGURE – Distribution of *Enterococcus* species (A) and evaluated production of gelatinase (B), cytolysin (C) and biofilm (D) by the samples included in the study

DISCUSSION

Results indicated higher prevalence of *E. faecalis* species (77.14%), as well as high agreement between the genotypic (PCR) and automated phenotypic (Vitek® 2) methods. Considering the high accuracy of the employed genetic technique, identification by PCR was chosen to define the species^(8,9). Thus, a sample initially identified as *E. casseliflavus* was reidentified as *E. gallinarum*. The result indicates that the employed phenotypic method requires complementary tests, such as assessment of pigment production, to enable accurate species identification^(6,9). The data obtained in this study are in agreement with previous reports, which show elevated prevalence of *E. faecalis* in enterococci infections, including in Brazil^(10,11).

The pathogenicity factors of *Enterococcus* contribute to enhance fitness and persistence of the pathogen in the environment. Among them can be cited those related to adhesion (biofilm formation) and synthesis of enzymes, such as gelatinase and cytolysin/hemolysin⁽¹²⁾. Knowledge about the presence of a specific pathogenicity factor and its real implication in enterococci infectious processes in human beings is still limited. In this regard,

the present investigation is even more significant, once data on virulence of *Enterococcus* lineages circulating in Brazil are so far scarce⁽¹³⁾.

The expression of gelatinase was observed in 40% of the studied samples. In the literature, values close to the ones of this investigation have already been reported^(12,14). Cytolysin activity was also observed in 40% of the samples. Values equal to or close to this have been reported in studies evaluating samples from diverse origins, including blood cultures^(15,16).

In this study, more than 75% of the samples were able to produce biofilm, predominantly included in the category moderate production. Among the five samples of *E. faecium*, two were classified as non-producers; and three, with low capacity for biofilm production. These results are similar to other already described in the literature, which also observed that most samples of *E. faecalis* were strong or moderate producers, while most samples of *E. faecium* were non-biofilm producers^(17,18).

The data provided by this study represent a contribution for the characterization of Brazilian samples of *Enterococcus*, considered of great relevance as infectious disease agent in our country.

RESUMO

Neste trabalho, avaliou-se o perfil de patogenicidade de 35 amostras de Enterococcus isoladas de pacientes com infecção de corrente sanguínea (ICS) em diferentes hospitais de Belo Horizonte (MG), Brasil. E. faecalis foi a espécie mais prevalente (27/77,14%). A produção de gelatinase e citolisina, detectada em 14/40% das amostras, apresentou distribuição heterogênea. A produção de biofilme foi observada em 27 amostras (77,14%) e classificada como fraca (8/22,86%), moderada (18/51,42%) ou alta (1/2,86%). Este estudo contribui para o conhecimento do perfil de patogenicidade de amostras de Enterococcus isoladas de ICS, buscando auxiliar na compreensão da virulência das amostras circulantes no Brasil.

Unitermos: Enterococcus; virulência; gelatinases; proteínas hemolisinas; biofilmes.

REFERENCES

1. Laupland KB. Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 19(6): 492-500. PubMed PMID: 23398633.
2. Al Mohajer M, Darouiche RO. Sepsis syndrome, bloodstream infections, and device-related infections. *Med Clin North Am.* 2012; 96(6): 1203-23. PubMed PMID: 23102485.
3. Arias CA, Murray BE. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nat Ver Microbiol.* 2012; 10(4): 266-78. PubMed PMID: 22421879.
4. López-Salas P, Llaca-Díaz J, Morfin-Otero R, et al. Virulence and antibiotic resistance of Enterococcus faecalis clinical isolates recovered from three states of Mexico. Detection of linezolid resistance. *Arch Med Res.* 2013; 44(6): 422-8. PubMed PMID: 23973462.
5. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(1): 24-7. PubMed PMID: 7699051.
6. Cartwright CP, Stock F, Fahle GA, Gill VJ. Comparison of pigment production and motility tests with PCR for reliable identification of intrinsically vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol.* 1995 Jul; 33(7): 1931-3. PubMed PMID: 7665675.

7. Gonçalves A, Igrejas G, Radhouani H, et al. Detection of antibiotic resistant enterococci and *Escherichia coli* in free range Iberian Lynx (*Lynx pardinus*). *Sci Total Environ*. 2013; 456 57: 115-9. PubMed PMID: 23588135.
8. Fang H, Ohlsson AK, Ullberg M, Özenci V. Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and the VITEK 2 system for the identification of clinical *Enterococcus* isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31(11): 3073-7. PubMed PMID: 22706514.
9. Garcia-Garrote F, Cercenado E, Bouza E. Evaluation of a new system, VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(6): 2108-11. PubMed PMID: 10834961.
10. Conceição N, Oliveira CC, Silva PR, Ávila BGM, Oliveira AG. Trends in antimicrobial resistance among clinical isolates of enterococci in a Brazilian tertiary hospital: a 4-year study. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011; 44(2): 177-81. PubMed PMID: 21468473.
11. Bender EA, Freitas AL, Reiter KC, Lutz L, Barth AL. Identification, antimicrobial resistance and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated in Porto Alegre, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2009; 40: 693-700. PubMed PMID: 24031416.
12. Medeiros AW, Pereira RI, Oliveira DV, et al. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. *Braz J Microbiol*. 2014; 45(1): 327-32. PubMed PMID: 24948952.
13. Ruzon FI, Paula SB, Kanoshiki RL, et al. Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* vanA isolated from different sources at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. *J Microbiol*. 2010; 48(6): 814-21. PubMed PMID: 21221940.
14. Soares RO, Fedi AC, Reiter KC, Caierão J, d'Azevedo PA. Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. *Virulence*. 2014; 5(5): 634-7. PubMed PMID: 24782231.
15. Libertin CR, Dumitru R, Stein DS. The hemolysin/bacteriocin produced by enterococci is a marker of pathogenicity. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1992; 15(2): 115-20. PubMed PMID: 1572135.
16. Biswas PP, Dey S, Adhikari L, Sen A. Virulence markers of vancomycin resistant enterococci isolated from infected and colonized patients. *J Glob Infect Dis*. 2014; 6(4): 157-63. PubMed PMID: 25538454.
17. Anderson AC, Jonas D, Huber I, et al. *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. *Front Microbiol*. 2015; 6: 1534. PubMed PMID: 26793174.
18. Comerlato CB, Resende MCC, Caierão J, d'Azevedo PA. Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013; 108(5): 590-5. PubMed PMID: 23903974.

CORRESPONDING AUTHOR

Paula Prazeres Magalhães

Universidade Federal de Minas Gerais; Instituto de Ciências Biológicas; Departamento de Microbiologia, bloco C4, sala 204; Av. Antônio Carlos, 6.627; Pampulha; CEP: 31270-901; Belo Horizonte-MG, Brasil; e-mail: ppmagalhaes@ufmg.br