Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

Luciana Milanêz de Paula Araújo

Caracterização fenotípica e molecular de *Enterococcus* isolados de infecções da corrente sanguínea

Rio de Janeiro
2017

Luciana Milanêz de Paula Araújo

Caracterização fenotípica e molecular de *Enterococcus* isolados de infecções da corrente sanguínea

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica Humana, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Dra. Vânia Lúcia Carreira Merquior

Coorientadora: Prof.ª Dra. Lucia Martins Teixeira

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

A663 Araújo, Luciana Milanêz de Paula.
Caracterização fenotípica e molecular de Enterococcus isolados de infecções da corrente sanguínea / Luciana Milanêz de Paula Araújo. – 2017.
90 f.

Orientadora: Vânia Lúcia Carreira Merquior
Coorientadora: Lúcia Martins Teixeira

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Enterococcus - Teses. 2. Circulação sanguínea - Infecção - Teses. 3. Virulência (Microbiologia) – Teses. 4. Infecção hospitalar – Teses. 5. Resistência microbiana a medicamentos. I. Merquior, Vânia Lúcia Carreira. II. Teixeira, Lúcia Martins. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 576.8.06

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira CRB/7 - 5302

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Luciana Milanêz de Paula Araújo

Caracterização fenotípica e molecular de *Enterococcus* isolados de infecções da corrente sanguínea

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiololgia Médica Humana, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 12 de junho de 2017.

Orientadora: Prof.ª Dra. Vânia Lúcia Carreira Merquior
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientadora: Prof.ª Dra. Lucia Martins Teixeira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Banca Examinadora:

_____

Prof.ª Dra. Angela Corrêa Freitas Almeida
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

_____

Prof.ª Dra. Cíntia Silva dos Santos
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

_____

Prof.ª Dra. Rachel Leite Ribeiro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
2017

AGRADECIMENTOS

Ao Universo pelo constante fluxo de bençãos em minha vida que sempre foi maior do que os obstáculos encontrados ao longo do caminho. Dentro dessas bençãos, agradeço especialmente aos meus pais Marize Milanez de Paula e Fernando Anísio Araújo que sempre me ofereceram todo o suporte para que eu tivesse condições de ingressar na vida científica. Agradeço também aos meus amigos que são meu maior tesouro e que contribuíram para a minha estabilidade emocional ao longo desse último ano. Em particular, minha amiga Adriana Faria que não só me ajudou emocionalmente, como também através da sua extensa experiência, conhecimento nesse mundo acadêmico, eterna boa vontade e generosidade em cooperar sempre. Meu chaveiro particular, Mariana Cunha, que também me auxiliou muito durante minha estadia no laboratório 27, sempre com boa vontade em me ajudar no dia a dia, nesse mundo que era tão novo e desconhecido pra mim. Agradeço a Soraya Santiago, meu eterno "Sol", que sempre iluminou minhas idéias diante dos meus desesperos e crises de estresse ao longo desse período. Agradeço a professora Vânia Merquior pela oportunidade e credibilidade oferecida ao me receber como aluna orientanda e que me proporcionou adquirir muito conhecimento dentro da área da Microbiologia. Agradeço à professora Lúcia Martins Teixeira pelos ensinamentos e coorientação desta dissertação. Ás agências de fomento à pesquisa FAPERJ, CAPES, CNPq pelo apoio financeiro ao projeto e bolsa concedida. Por fim e muito importante, agradeço a todos os amigos espirituais, seres de luz e guias espirituais que me auxiliaram sempre ao longo de toda a minha jornada. Gratidão.

"Kodoish, Kodoish, Kodoish, Adonai Tsebayoth".

Com as perdas só há um jeito: perde-las.

Com os ganhos, o proveito é saborear cada um como boa fruta da estação.

Lya Luft.

RESUMO

ARAÚJO, Luciana Milanêz de Paula. *Caracterização fenotípica e molecular de Enterococcus isolados de infecções da corrente sanguínea*. 2017. 90 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

As infecções de corrente sanguínea (ICS) constituem um problema comum e potencialmente fatal em Unidades de Terapias Intensivas (UTIs) e estão entre as infecções mais frequentemente documentadas. Elas são classificadas de acordo com características específicas relacionadas aos seus aspectos diagnósticos e preventivos. Além disso, o uso prolongado de cateteres intravasculares e seu manejo inadequado são importantes fatores de risco para o desenvolvimento dessas infecções, bem como a presença de infecções respiratórias, urinárias, feridas e infecções intestinais podem contribuir como um foco primário para as ICS. Nesse cenário, os enterococos emergiram como importantes patógenos e atualmente são considerados a terceira causa mais comum de bacteremia nosocomial. Dentre o gênero dos enterococos, a espécie *E. faecalis* é a mais frequentemente isolada entre as infecções humanas, seguido da espécie *E. faecium.* O objetivo desse estudo foi caracterizar amostras de *Enterococcus* isoladas de hemoculturas de pacientes hospitalizados em instituições de saúde localizadas em dois estados brasileiros (Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte) em um período de 11 anos consecutivos (2005 a 2015). Foram incluídas nesse estudo 203 amostras caracterizadas quanto ao gênero e espécie pela metodologia de MALDI-TOF. A susceptibilidade a um painel de 15 antimicrobianos foi avaliada pelo método de difusão em Agar e o genótipo de resistência a vancomicina foi detectado por metodologia de PCR. Perfis de virulência foram determinados por metodologia de PCR para um conjunto de nove genes. A diversidade das amostras pertencentes as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* foi avaliada por PFGE. Os resultados desse estudo identificaram um maior número de isolados *E. faecalis*, seguido de *E. faecium,* além de amostras de *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. durans* e *E. raffinosus.* Foi identificado um menor número de amostras multirresistentes (resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos), sendo que isoladamente quinolonas, macrolídeos e tetraciclinas determinaram os maiores percentuais de amostras não susceptíveis. Percentuais elevados de amostras não susceptíveis também foram observados frente a antimicrobianos comumente utilizados no tratamento das ICS, como aminoglicosídeos, beta-lactâmicos e glicopeptídeos. As amostras pertencentes a espécie *E. faecalis* apresentaram uma maior frequência de determinantes de virulência quando comparadas à espécie *E. faecium.* Percentuais elevados de amostras *E. faecium* resistentes a vancomicina exibiram caracteristicamente os genes *esp* e *hyl,* importantes marcadores de clones de dispersão mundial. As amostras de *E. faecalis* apresentaram uma maior diversidade clonal do que *E. faecium,* conforme identificado por PFGE. Foram identificados grupos clonais que reuniram amostras isoladas em mais de uma instituição de saúde, sugerindo uma ampla dispersão interhospitalar. As informações apresentadas nesse estudo visam contribuir com dados brasileiros como mais um suporte para o desenvolvimento de medidas de contenção da dispersão da resistência em *Enterococcus* e do controle do uso de antimicrobianos.

Palavras chaves: *Enterococcus*. Infecções de corrente sanguínea. Bacteremia. PFGE. *Enterococcus* resistentes a vancomicina. Multirresistência.

ABSTRACT

ARAÚJO, Luciana Milanêz de Paula.. *Phenotypic and molecular characterization of Enterococcus isolated from bloodstream infections.* 2017. 90 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Nosocomial blood stream infections (BSIs) are a common and potentially life-threatening problem in intensive care units and are among the most frequently documented nosocomial infections. They are classified according to specific features related to diagnostic and preventive aspects.In addition, the prolonged use of intravascular catheters and its inadequate management are important risk factors for nosocomial BSIs development. Besides, respiratory, urinary tract, wounds, and gastrointestinal infections may also contribute as a primary focus for BSIs development. In this setting, enterococci emerged as important pathogens and are currently considered the third most common cause of nosocomial bacteremia. Among the *Enterococcus* species, *E. faecalis* is the most frequent, followed by *E. faecium*. The aim of this study was to perform the phenotypic and molecular characterization of enterococci isolated from bloodstream of hospitalized patients attended at healthcare instituitions located in two Brazilian states (Rio de Janeiro and Rio Gende do Norte), in a 11 years period (from 2005 to 2015). This study included 203 isolates that were characterized as genus and species level by MALDI-TOF. Susceptibility testing were carried out by disk diffusion to a panel of 15 antimicrobial agents and vancomycin-resistance genotype were detected by PCR. Virulence profiles were investigated by PCR for a set of nine genes. The diversity of de the isolates belonging to *E. faecalis* and *E. faecium* species were determined by PFGE technique. The results of this study identifiedthe prevalence of *E. faecalis* species followed by *E. faecium*. However, isolates belonging *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. durans* and *E. raffinosus* were also identified. A large amout of multidrug resistance isolates were detected. Resistance to quinolones, macrolides and tetracyclines were prevalent. A high prevalence of isolates non-susceptible to antimicrobials commonly used to the BSIs therapy such as aminoglycosides, beta-lactams and glycopeptides were also identified. *E. faecalis* showed virulence determinants in higher frequency than *E. faecium*. Vancomycin resistance was associated to *esp* and *hyl* among *E. faecium* isolates. PFGE results showed a greater diversity among *E. faecalis* than *E. faecium*. Clonal groups included isolated from different healthcare institutions suggesting a wide interhospitalar dispersion. The information presented in this study are intended to contribute to brazilian data as an additional support for the development of control measures of the dispersion of *Enterococcus* resistant strains as well as for the improvement of BSIs management.

Keywords: *Enterococcus.* Blood stream infections, Bacteremia. PFGE. Vancomycin- resistant *Enterococcus.* Multiresistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 – Número de pacientes com sepse grave e choque séptico por ano no Brasil, segundo o software ILAS online..... 16

Gráfico 2 – Comparação entre os dados obtidos de hospitais públicos e privados quanto ao percentual de letalidade por sepse grave e choque séptico..... 17

Figura 1 – Distribuição por gênero dos 203 pacientes analisados neste estudo 36

Figura 2 – Distribuição das amostras bacterianas por ano de estudo (2005 a 2015) e gênero dos 203 pacientes analisados 37

Figura 3 – Frequência das espécies de *Enterococcus* isoladas de amostras de sangue e analisadas neste estudo 38

Figura 4 – Agrupamento de 203 amostras de *Enterococcus* por espécie de acordo com os resultados obtidos pela metodologia de MALDI TOF e emprego do algoritmo *Neighbor joining* 39

Figura 5 – Distribuição das amostras em relação ao número de marcadores de resistência aos antimicrobianos 43

Figura 6 – Percentual de amostras de *Enterococcus* multirresistentes (MR) por espécies em relação ao número de classes de antimicrobianos para as quais foram não susceptíveis 47

Figura 7 – Distribuição das taxas de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLAR) nas espécies de *Enterococcus* identificadas neste estudo 49

Figura 8 – Distribuição dos fenótipos de resistência aos aminoglicosídeos (gentamicina, GEN; estreptomicina, EST; ou a ambos, GEN+EST), em relação à Instituição Hospitalar de origem 50

Figura 9 – Distribuição das amostras de *Enterococcus* portadoras do fenótipo HLAR isoladas no estado do Rio de Janeiro por ano de estudo 51

Figura 10 – Frequência de marcadores de virulência em amostras de *Enterococcus* isoladas de hemoculturas 53

Figura 11 – Associação entre a presença de determinantes de virulência e a presença de HLAR (A) e a susceptibilidade à vancomicina (B) em amostras de *Enterococcus* isoladas de hemoculturas 56

Figura 12 – Dendrograma representativo do relacionamento genético de 43 amostras de *E. faecalis* isoladas de hemoculturas, considerando características de resistência à níveis elevados de aminoglicosídeos e à vancomicina e instituição hospitalar de origem 58
Figura 13 – Dendrograma representativo do relacionamento genético de 16 amostras de *E. faecium* isoladas de hemoculturas, considerando características de resistência à níveis elevados de aminoglicosídeos e à vancomicina e instituição hospitalar de origem 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes, oligonucleotídeos iniciadores e tamanhos dos produtos obtidos nas reações de PCR para caracterização genotípica da resistência e virulência de amostras de *Enterococcus* 32

Tabela 2 – Distribuição das amostras de *Enterococcus*, analisadas neste estudo, por instituição hospitalar de origem 35

Tabela 3 – Distribuição das amostras de *Enterococcus* isoladas de sangue por categoria de susceptibilidade (sensível, intermediário, resistente), de acordo com os resultados obtidos nos testes de disco difusão para 15 antimicrobianos 40

Tabela 4 – Frequência de amostras de *Enterococcus* não susceptíveis aos antimicrobianos em relação às espécies identificadas neste estudo 42

Tabela 5 – Distribuição do número de marcadores de resistência em relação às espécies de *Enterococcus* isoladas de hemoculturas 44

Tabela 6 – Distribuição do número de marcadores de resistência em relação às instituições hospitalares de origem das amostras de *Enterococcus* isoladas de hemoculturas 45

Tabela 7 – Distribuição das amostras de *Enterococcus* multirresistentes isoladas de hemocultura em relação às instituições hospitalares de origem 48

Tabela 8 – Distribuição dos marcadores de virulência por espécie de *Enterococcus* 54

Tabela 9 – Distribuição do número de determinantes de virulência por espécie de *Enterococcus* em amostras isoladas de hemoculturas 55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA –	Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
Cyl –	Citolisina
CLSI –	*Clinical and Laboratory Standards Institute*
D-Ala –	D-alanina
D-Ala-D-Ala –	D- alanil-D-alanina
D-Ala-D-Ser –	D-alanina-D- Serina
D-Lac –	D-lactato
DNA –	Ácido desorribonucleico
dNTP–	Dinucleotídeo trifosfatado
EMAs–	Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos
Esp –	Proteína de Superfície de Enterococos
EUA –	Estados Unidos da América
HCCA –	Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico
HLAR –	Resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos
HLR-G –	Resistência a níveis elevados de gentamicina
HLR-GS –	Resistência a níveis elevados de gentamicina e estreptomicina
HLR-S –	Resistência a níveis elevados de estreptomicina
ILAS –	Instituto Latino Americano de Sepse
ICS–	Infecções de Corrente Sanguínea
IPCS –	Infecções Primárias de Corrente Sanguínea
KCl –	Cloreto de Potássio
MALDI-TOF–	*Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight*
CIM–	Concentração Inibitória Mínima
MHA–	Ágar Müeller-Hinton
MLS_B–	Macrolídeos Lincosamina e Streptogramina B
MRSA –	*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina
MSCRAMM–	*microbial surface components recognizing adhesive matrix melecules*
$MgCl_2$ –	Cloreto de magnésio
NaCl–	Cloreto de Sódio
pb–	Pares de base

PBP–	*Penicillin Binding Proteins*
PCR–	Reação em cadeia da polimerase
PFGE–	Eletroforese em campo pulsado
RNA–	Ácido ribonucleico
RNAt–	RNA transportador
rpm–	Rotações por minuto
UFC	Unidades formadoras de colônias
UPGMA–	*Unweighted-Pair Group Method with Averages*
UTI–	Unidade de Terapia Intensiva
VRE–	Enterococos resistentes à vancomicina

LISTA DE SÍMBOLOS

%–	Porcentagem
±–	Mais ou menos
β–	Beta
µg–	Micrograma
µL–	Microlitro
µM–	Micromolar
mg–	Miligrama
mL–	Mililitro
cm–	Centímetro
α–	Alfa

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 17

1 **OBJETIVOS** 31

2. **MATERIAIS E MÉTODOS** 32

2.1. **Amostras Bacterianas** 32

2.2. **Caracterização das Espécies de *Enterococcus* por Espectrometria de Massa** 32

2.3. **Determinação de Susceptibilidade aos Antimicrobianos** 33

2.4. **Detecção de Genótipos de Resistência aos Glicopeptídeos e de Virulência** 34

2.4.1. Extração de DNA 34

2.4.2. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR 35

2.4.3. Eletroforese e Análise dos Produtos Amplificados 37

2.5. **Perfis de Fragmentação do DNA Cromossômico por Eletroforese em Campo Pulsado - PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*)** 37

3. **RESULTADOS** 39

4. **DISCUSSÃO** 62

CONCLUSÃO 73

REFERÊNCIAS 74

INTRODUÇÃO

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA (2009), as infecções da corrente sanguínea (ICS) são classificadas em duas síndromes baseadas em características específicas, que estão relacionadas aos seus aspectos diagnósticos e preventivos. Essas síndromes correspondem às (i) infecções primárias de corrente sanguínea (IPCS), que são aquelas que não apresentam um foco primário detectável e implicações sistêmicas graves; e (ii) infecções relacionadas ao acesso vascular, que são aquelas que ocorrem no local da inserção do cateter e que não apresentam repercussões sistêmicas. Há ainda as infecções secundárias da corrente sanguínea, que correspondem a bacteremia ou sinais clínicos de sepse na presença de um foco primário conhecido, por exemplo, pneumonia, infecção de trato urinário ou sítio cirúrgico.

Dentre as infecções hospitalares, as infecções primárias de corrente sanguínea estão entre as mais frequentemente documentadas. Do ponto de vista epidemiológico, dentre as espécies de cocos Gram positivos, que frequentemente albergam características de multirresistência, os principais agentes responsáveis por esse tipo de infecção são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa e *Enterococcus* (BOUZA; FINCH, 2001; MARTINEZ; WOLK, 2016; ZHU; ZHANG; ZHANG, 2017).

S. aureus resistentes à meticilina (MRSA) é a principal espécie relacionada às infecções de corrente sanguínea devido ao fato deste marcador estar associado à resistência a outros antimicrobianos, reduzindo consideravelmente a escolha terapêutica (LIU *et al*., 2017; RASMUSSEN *et al*., 2011; RODVOLD; SIT *et al*., 2017).

Já as espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa, principalmente o grupo *S. epidermidis* (como *S. hominis* e *S. haemolyticus*) e *S. saprophyticus*, constituem os principais agentes de infecções de corrente sanguínea relacionadas ao uso de dispositivos médicos, como cateteres e próteses (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014).

Em geral, a maioria das bacteremias causadas por *Enterococcus*, particularmente *E. faecalis* e *E. faecium* (espécies que se destacam nas infecções humanas), podem ter origem em diferentes sítios de infecção ou colonização. Entretanto, o trato urinário é a origem mais comum; porém em muitos casos não é possível reconhecer um sítio de origem óbvio, estando muitas vezes também associada à presença de dispositivos médicos, como acessos intravasculares (ARIAS; MURRAY, 2012; HOLLEBECK; RICE, 2012).

É estimado que cerca de 60% das bacteremias nosocomiais estejam relacionadas a algum dispositivo intravascular, sendo o uso de cateteres centrais, a constante manipulação da linha venosa e a colonização da pele no local da introdução do dispositivo os principais fatores de risco relacionados às IPCS (ANVISA, 2013).

Os microrganismos presentes na pele podem migrar ao longo da superfície do cateter e colonizarem a extremidade distal deste dispositivo, levando ao processo infeccioso (LAI *et al*., 2016; SUZUKI *et al*., 2016). Além disso, estes microrganismos também são responsáveis pela colonização do lúmen do cateter onde, após os processos de adesão, levam a formação de biofilmes, que frequentemente resulta em uma disseminação hematogênica (ESMANHOTO *et al.*, 2013; GOMINET *et al*., 2017).

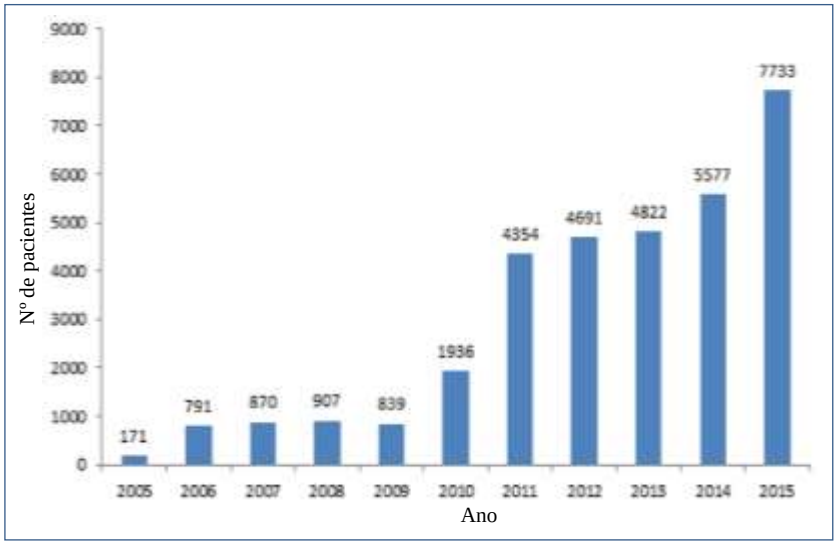
A primeira definição conceitual de sepse foi proposta em 1991 nos EUA, durante uma conferência consenso, que determinou a terminologia "síndrome da resposta inflamatória sistêmica" (SIRS), que seria desencadeada por uma infecção suspeita ou confirmada (falta ref). As limitações dessa definição inicial incluía um excessivo foco no processo inflamatório, um modelo errôneo de que a sepse segue um caminho contínuo através da doença severa ao choque (SINGER *et al*., 2016).

Mais tarde, o Terceiro Consenso Internacional para a definição de Sepse e Choque Séptico (*Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock /Sepsis-3*), definido por reuniões periódicas entre Janeiro de 2014 e Janeiro de 2015, com membros da *European Society of Intensive Care Medicine* e *Society of Critical Care Medicine*, buscou atualizar essas definições apontando a necessidade de uma releitura da doença. Assim, passou a ser definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção; ou seja, uma síndrome englobando múltiplos sinais clínicos e sintomas em um paciente com suspeita de infecção.

A nova definição passou, então, a enfatizar a primazia da resposta do hospedeiro à infecção, a potencial letalidade que é consideravelmente superior a uma infecção direta e a necessidade de um reconhecimento urgente com garantia de maiores níveis de monitoramento e intervenção. O choque séptico foi definido como um subconjunto da sepse, no qual ocorrem anormalidades metabólicas, celulares e circulatórias profundas e que estão associadas com um maior risco de mortalidade quando comparados com a sepse isolada (SINGER *et al*., 2016).

O relatório nacional de sepse grave e choque séptico do Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS) mostrou o aumento no número de pacientes com sepse grave e choque séptico no Brasil por ano em um período de 10 anos (de 2005 a 2015), conforme pode ser visto no GRÁFICO 1.

Gráfico 1 – Número de pacientes com sepse grave e choque séptico por ano no Brasil, segundo o software ILAS online.



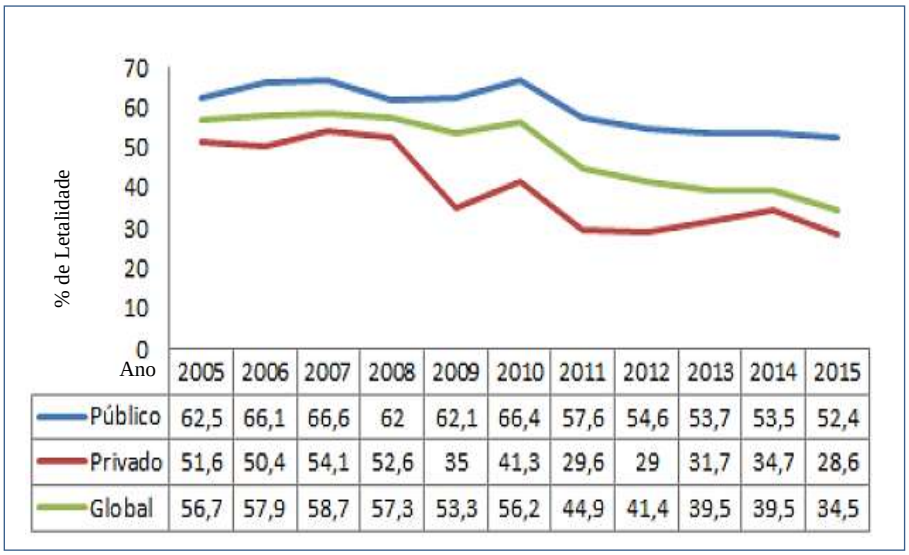
Nota: Modificado de Relatório Nacional, Protocolos Gerenciados de Sepse, Sepse Grave e Choque Séptico 2005-2015; Banco de dados ILAS online, 2015.
Fonte: Disponível em http://www.ilas.org.br/assets/arquivos/relatorio-nacional/relatorio-nacional.pdf (último acesso Abril / 2017)

Ainda segundo o banco de dados do ILAS, referente ao período de 2005 a 2015, o aumento da incidência de casos de sepse pode ser devido a um melhor atendimento nos serviços de emergência, a um crescente número na população de idosos e de pacientes imunossuprimidos, o que contribui para uma população suscetível ao desenvolvimento de infecções graves e ao aumento da frequência de microrganismos multirresistentes aos antimicrobianos.

O estudo de SALES JUNIOR e colaboradores (2006) demonstrou que estes pacientes normalmente seguem um curso clínico mais grave e apresentam um elevado tempo de internação. Estes dados estão de acordo com os de outros estudos desenvolvidos no país. Os dados nacionais disponíveis apontam uma elevada letalidade, principalmente, em hospitais públicos vinculados ao Sistema Único de Saúde (SUS). Um estudo realizado em 2006 com Unidades de Terapias Intensivas (UTIs) em diversas regiões do país demonstrou uma elevada mortalidade pela sepse, chegando a 46,6%.

O GRÁFICO 2 apresenta o percentual de letalidade divulgado pelo ILAS (2015) no período avaliado.

Gráfico 2 – Comparação entre os dados obtidos de hospitais públicos e privados quanto ao percentual de letalidade por sepse grave e choque séptico.



Ano	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Público	62,5	66,1	66,6	62	62,1	66,4	57,6	54,6	53,7	53,5	52,4
Privado	51,6	50,4	54,1	52,6	35	41,3	29,6	29	31,7	34,7	28,6
Global	56,7	57,9	58,7	57,3	53,3	56,2	44,9	41,4	39,5	39,5	34,5

Nota: Modificado de Relatório Nacional, Protocolos Gerenciados de Sepse, Sepse Grave e Choque Séptico 2005-2015; Banco de dados ILAS online, 2015.
Fonte: Disponível em http://www.ilas.org.br/assets/arquivos/relatorio-nacional/relatorio-nacional.pdf (último acesso Abril / 2017)

As infecções de corrente sanguínea de origem comunitária são aquelas que se apresentam em pacientes ambulatoriais ou que são identificadas em até 48 horas após admissão no hospital. Os microrganismos mais comumente associados a essas infecções são: *Escherichia coli*, *S. aureus* e *Streptococcus pneumoniae* (DEEN *et al*., 2012; GRADEL *et al*., 2016; NOVILLO *et* al., 2016; VAN WIJK *et al*., 2006).

Em contraste com a extensa bibliografia referente às ICS de origem hospitalar, os estudos disponíveis quanto as de origem comunitária são controversos e menos frequentes. Essas infecções podem, ainda, ser subdividas em: (i) associadas aos cuidados com a saúde, que são aquelas que dizem respeito aos pacientes com hospitalização recente ou que receberam serviços médicos especializados no domicílio; e (ii) associadas a comunidade, quando os pacientes não passaram por exposição prévia aos cuidados de saúde. Nestes casos, o conhecimento epidemiológico e microbiológico é fundamental para o melhor entendimento dessas infecções e a correta ação intervencionista. Isto porque, é sabido que nem sempre uma cultura de sangue positiva significa uma ICS. Pois, apesar de ser obrigatório para o diagnóstico, pode estar relacionada a uma contaminação, na maioria das vezes relacionada aos microrganismos residentes da microbiota da pele, ou pode estar coligada a presença ou

ausência de uma doença clínica associada (BARON *et al*., 2013; DOWNIE *et al*., 2013; HUSON *et al*., 2014; LAUPLAND; CHURCH, 2014).

Em todas as síndromes associadas as ICS, a etiologia enterocócica já foi relatada. Estudos recentes indicam que *Enterococcus* são responsáveis por aproximadamente 10% de todas as bacteremias notificadas em países da América do Norte e da Europa, contribuindo também como o quarto ou quinto agente envolvido em quadros de sepse (DESHPANDE *et al*., 2007; COOMBS *et al*., 2014; ROSA *et al*., 2014; VOGKOU *et al*., 2016).

Microrganismos pertencentes ao gênero *Enterococcus* são bactérias comensais que habitam o intestino de humanos e animais domésticos, mas que também podem ser encontrados no meio ambiente, no solo, água, nas plantas, animais selvagens e insetos. Esse grupo de cocos Gram positivos foi considerado por muito tempo como apenas microrganismos comensais e de pouca relevância clínica. Mas, nas últimas duas décadas, surgiram como importantes patógenos nosocomiais, responsáveis por infecções do trato urinário, feridas, bacteremias e endocartides infecciosas. Dados recentes de vigilância epidemiológica indicam que o gênero *Enterococcus* é o terceiro patógeno nosocomial mais isolado, correspondendo a cerca de 10-12% de todas as infecções hospitalares, ficando atrás apenas dos *Staphylococcus* coagulase negativa e *S. aureus*. Esse aumento na prevalência de infecções enterococcicas em seres humanos tem relação com a capacidade que esses microorganismos possuem em resistir a ação dos antimicrobianos comumente utilizados na prática clínica (ARIAS; MURRAY, 2012; GUZMAN PRIETO *et al*., 2016; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016).

Enterococcus apresentam resistência intrínseca a um grande número de agentes antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções por bactérias Gram positivas, como baixas concentrações de beta-lactâmicos e de aminoglicosídeos; além de clindamicina e cotrimazol. Também, as espécies *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* apresentam resistência intrínseca a concentrações baixas de vancomicina. Além da resistência intrínseca, é comum entre os membros do gênero *Enterococcus* a presença de mecanismos de resistência adquiridos, determinados pela presença de mutações ou pela aquisição de DNA extra-cromossômico, como plasmídeos e transposons. Esses microrganismos podem, então, exibir resistência adquirida a outros agentes antimicrobianos, incluindo quinolonas, macrolídeos, tetraciclinas, estreptograminas e glicopeptídeos (HOLLENBECK; RICE, 2012; KRISTICH; RICE; ARIAS, 2014; MILLER; MUNITA; ARIAS, 2012).

Os antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos exercem seu efeito bactericida inibindo as enzimas envolvidas na síntese da parede celular. Esses agentes contêm na sua

estrutura química um anel beta-lactâmico, que atua se ligando às proteínas ligadoras de penicilina – PBPs (do inglês, *penicillin-binding proteins*), que são essenciais para a síntese do peptídeoglicano, prejudicando dessa maneira a integridade da parede celular bacteriana (MEROUEH et al, 2003**)**. A resistência a níveis baixos de beta-lactâmicos, geralmente ampicilina e penicilina em enterococos ocorre devido a alterações na expressão ou na estrutura de PBPs de baixa afinidade. Além disso, amostras de enterococos produtores de beta-lactase, já foram descritas (MURRAY, 1998). A expressão de resistência intrínseca aos beta-lactâmicos difere nas espécies *E. faecalis* e *E. faecium*. Na verdade, este último é cerca de 4 a 16 vezes menos susceptível a penicilina (BHARDWAJ *et al*., 2013; MILLER; MUNITA; ARIAS, 2012).

Já o mecanismo adquirido, que leva à resistência a níveis elevados de beta-lactâmicos, ocorre principalmente devido a superprodução de PBP5 ou a expressão de beta lactamase. Uma super expressão de PBP5 de baixa afinidade de ligação aos beta-lactâmicos é, atualmente, uma característica muito comum em *E. faecium*, apesar de configurar um fenômeno raro em *E. faecalis*. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) > 64 µg/mL tem sido comumente relatados para amostras de *E. faecium* isoladas em diferentes regiões do mundo. Assim, o uso de ampicilina no tratamento das infecções por esta espécie já não é mais recomendado. Adicionalmente, sabe-se que as linhagens genéticas que apresentam esta característica de resistência exibem também uma maior virulência e capacidade de disseminação em ambientes determinantes de seleção, como o hospitalar (CATTOIR; LECLERCQ, 2013; HAMMERUM, 2012; HOLLENBECK; RICE, 2012; WILLEMS; SCHAIK; 2009; ZHANG *et al*., 2012).

Os aminoglicosídeos estão entre os antimicrobianos de amplo espectro mais utilizados no arsenal anti-infeccioso, constituindo uma classe de antimicrobianos que atuam inibindo a síntese proteica ou levando a produção de proteínas defeituosas pela ligação a fração 30S da subunidade ribossomal. Apesar do potencial de toxicidade renal, ototoxicidade e resistência bacteriana, vários membros desta família de antimicrobianos têm têm sido utilizados há várias décadas. Os enterococos são intrinsicamente resistentes a baixos níveis de aminoglicosídeos (CIM de 16µg/mL a 64µg/mL) devido a um defeito na energização oxidativa da membrana citoplasmática, resultando em uma redução do transporte ativo da droga para o interior da célula bacteriana (LECLERCQ, 1997). Quando este é o único mecanismo expresso, em relação a este grupo de antimicrobianos, a associação de um aminoglicosídeo com um agente que atue interferindo na formação da parede celular, resulta em efeito sinérgico bactericida,

comumente empregado como regime terapêutico nas enterococcias graves (ARIAS; MURRAY, 2012; KRISTICH; RICE; ARIAS, 2014; MURRAY, 1990; 1998).

Já, a resistência adquirida a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLAR, do inglês *high-level aminoglycoside resistance*) é decorrente de dois mecanismos diferentes: alteração no sítio alvo nos ribossomos e inativação por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs). O primeiro é conseqüência de mutações cromossômicas, enquanto o segundo é mediado pela aquisição de genes localizados em plasmídeos transferíveis e transposons (ARIAS; MURRAY, 2012; MURRAY, 1998).

As enzimas ANT(6)-I e APH(3`)-IIIa, codificadas pelos genes *ant(6)-Ia* e *aph(3`)-IIIa*, respectivamente, são as mais comumente detectadas em enterococos, determinando valores elevados de concentração inibitória mínima (CIM>2.000 μg/mL). Já a resistência a níveis elevados de gentamicina (CIM ≥ 500 μg/mL) é mais frequentemente mediada pela expressão do gene *aac(6`)-Ie-aph(2`)-Ia* que codifica uma enzima bifuncional AAC(6′)-APH(2″) que exerce atividade de adenilase e de fosforilase, inibindo a ação do antimicrobiano. Níveis elevados de resistência aos aminoglicosídeos impedem o sucesso terapeûtico desejado com o emprego da associação de um aminoglicosídeo a um agente ativo na parede celular, que determina um efeito sinérgico bactericida (ARIAS et al, 2010; PADMASINI et al, 2014; MILLER et al, 2015). Portanto, diversos estudos tem apontado a necessidade da determinação da CIM para os aminoglicosídeos na detecção de amostras HLAR que resulte na melhor orientação da conduta terapêutica para as enterococcias graves, como bacteremias e endocardites (AAMODT *et al*., 2015; ARAOKA; KIMURA; YONEYAMA, 2011; ASLANGUL *et al*., 2005; JAIN *et al*., 2011).

A resistência aos glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) em *Enterococcus* foi detectada pela primeira vez na Inglaterra, em 1986 (UTTLEY *et al*., 1988), em uma amostra de hemocultura de um paciente com insuficiência renal crônica, logo após, foi relatado também o primeiro isolamento de VRE (*vancomycin-resistant enterococci*) na França (LECLERCQ *et al*., 2002). Atualmente, esses microrganismos têm importância destacada em todo o mundo (EMANEINI, *et al*., 2016; MILLER *et al*., 2016; REYES; BARDOSSY; ZERVOS, 2016).

Nove fenótipos de resistência aos glicopeptídeos têm sido identificados em enterococos, são eles: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM e VanN. A expressão desses fenótipos modifica a terminação D-Alanina-D-Alanina (DAla-DAla) do peptideoglicano, para D-Alanina-D-Lactato (Dala-DLac) ou D-Alanina-D-Serina (Dala-DSer) (XU *et al*., 2010; LEBRETON *et al*., 2011). Os fenótipos VanA e VanB são os de maior importância clínica, por determinarem resistência a níveis elevados de vancomicina e maior

capacidade transferência de seus determinantes, através de plasmídeos ou transposons. (COURVALIN, 2006; HOLLENBECK; RICE, 2012).

A expressão do fenótipo VanA se caracteriza por uma resistência adquirida e induzível a altos níveis de vancomicina (concentração inibitória mínima - CIM > 64µg/mL) e teicoplanina (CIM > 16 µg/mL), são sete os genes responsáveis pela regulação e expressão da resistência à vancomicina, denominados como conjunto gênico *vanA* (*vanHRSXYZ*) e estão localizados no transposon *Tn1546*, frequentemente associado a um plasmídeo. O genótipo *vanA* tem sido identificado com maior frequência em amostras das espécies *E. faecium* e *E. faecalis*, contudo, já foi identificado em *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E.gallinarum* e *E. raffinosus* (FISHER; PHILLIPS, 2009; WARDAL *et al.*, 2014; WOODFORD, 2003). O fenótipo VanB apresenta resistência adquirida e transferível à vancomicina e sensibilidade à teicoplanina. O gene *vanB* pode estar localizado nos transposons Tn*1547*, Tn*1549* ou Tn*5382*. Baseado na variabilidade da sequência gênica do gene *van*B, foram descritos três diferentes subtipos, *van*B_1, *van*B_2 e *van*B_3 (DEPARDIEU *et al*., 2007).

Segundo o Programa de Vigilância SENTRY (SADER *et al*., 2016), a taxa global de resistência à vancomicina na América Latina no período entre o período de 2011 a 2014 foi de 15,5%. Em relação às espécies, foi observado que cerca de 50% das amostras de *E. faecium* eram VRE, enquanto a taxa de *E. faecalis* foi de 2,3%.

Considerando-se as ICS, ARIAS e colaboradores (2012) relataram que, em um estudo conduzido com amostras isoladas em um período de 10 anos, a taxa de resistência para vancomcina em *E. faecium* aumentou de 57,1% em 2000 para 80,7% em 2010; enquanto que, na espécie *E. faecalis* além de percentuais menores, a variação foi de 4% (ARIAS et al, 2012). Adicionalmente, na maioria dos estudos já publicados, os casos de bacteremia causados por amostras VRE estãomais associados à espécie *E. faecium* (HAYAKAWA *et al*., 2012; MCKINNELL *et al*., 2010; O'DRISCOLL; CRANK, 2015; SUZUKI *et al*., 2017; ZIAKAS *et al*., 2013). Além disso, para esta espécie pode-se observar uma maior taxa de mortalidade, do que os quadros relacionados a *E. faecalis*. Aparentemente, deve-se a isso uma maior susceptibilidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos, importantes no tratamento dessas infecções, por amostras de *E. faecalis* (HAYAKAWA et al, 2012).

A resistência aos macrolídeos (como eritromicina, claritomicina, clindamicina, roxitromicina e azitromicina) em enterococos envolve a alteração do sítio de ligação do antimicrobiano, em consequência da ação de ezimas que metilam um resíduo de adenina na porção 23S da subunidade 50S do RNA ribossomal. Nesses microrganismos, esse processo é mais frequentemente mediado pelo gene *ermB* (LECLERCQ, 2002; PORTILLO *et al*., 2000).

Além disso, os enterococos, também, podem expressar resistência às quinolonas (como o ácido nalidíxico) e fluoroquinolonas (por exemplo, norfloxacina, ciprofloxacina, ofloxacina, lomefloxacina e perfloxacina). Esses antimicrobianos são agentes bactericidas, que atuam inibindo as enzimas DNA girase e topoisomerase IV, envolvidas na síntese do DNA bacteriano. Os mecanismos de resistência descritos em enterococos, particularmente nas espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, é decorrente de mutações nos genes *parC* e *gyrA*, responsáveis pela expressão dessas enzimas (HOLLENBECK; RICE, 2012; JIA; LI; WANG, 2014; MC CRACKEN *et al*., 2013).

Dessa forma, o tratamento de bacteremias causadas por amostras multirresistentes torna-se bastante desafiador diante do reduzido número de opções terapêuticas que normalmente se apresentam disponíveis para o combate dessa grave patologia. Mais recentemente, três alternativas terapêuticas têm sido sugeridas para o tratamento das infecções causadas por enterococos, particularmente as causadas por amostras resistentes aos glicopeptídeos (VRE), que são linezolida, daptomicina e tigeciclina. (AKSOY; UNAI, 2008)

A linezolida é um antimicrobiano pertencente a classe das oxazolidinonas e possui um amplo espectro de ação contra bactérias Gram positivas. Esse agente atua impedindo a formação do complexo de iniciação pré-traducional bacteriano e possui atividade bacteriostática contra amostras VRE de *E. faecium* e *E. faecalis*. Entretanto, apesar de ainda ser um evento raro, já foram identificadas amostras de enterococos resistentes a este antimicrobiano. A resistência à linezolida ocorre devido a redução da afinidade do antimicrobiano pelo sítio alvo, RNA23S ribossomal, decorrente de mutação; ou ainda, um mecanismo transmissível, via aquisição do gene *cfr*, cujo produto induz metilação neste local, impedindo a ligação da linezolida (LINDEN, 2002; MENDES *et al*., 2014; O`DRISCOLL; CRANCK, 2015; TSAI *et al*., 2012).

A daptomicina é um lipopeptídeo com rápida atividade bactericida *in vitro* contra amostras VRE e tem sido utilizada com sucesso para tratar bacteremias causadas por essas amostras. Esse antimicrobiano atua interagindo com a membrana da célula bacteriana de uma maneira dependente de cálcio, levando a sua despolarização e consequente morte bacteriana. No uso de daptomicina para o tratamento de infecções graves causadas por VRE são consideradas algumas desvantagens, como: a emergência comum de resistência durante a terapia; a identificação de mutações associadas à resistência em amostras consideradas sensíveis nos testes diagnósticos (indicando uma necessidade na reavaliação dos pontos de corte desses testes); e a falta de dados para a melhor definição da dose terapêutica ideal (ARIAS *et al*., 2011; DIAZ *et al*., 2014; LOPES, 2008; MUNITA *et al*., 2014a). Dentre estas,

a emergência de resistência a este antimicrobianos durante o tratamento é o que mais causa preocupação. O mecanismo de resistência em enterococos parece estar relacionado ao aumento de cardiolipina na membrana celular que inibe a sua permeabilização ao antimicrobiano (ZHANG *et al*., 2014).

Entretanto, os estudos disponíveis ainda são controversos quanto a escolha de linezolida ou daptomicina como opões terapêuticas para o tratamento das infecções graves causadas por enterococos, como bacteremias e endocardites. Em algumas situações os autores consideram uma superioridade no tratamento com linezolida, se comparado à daptomicina (BALLI *et al*., 2014; CHUANG *et al*., 2014; WHANG *et al*., 2013). Entretanto, em outros, uma maior eficácia foi associada à daptomicina (BRITT *et al*., 2015; CASAPAO *et al*., 2013; ROLSTON *et al*., 2014).

A tigeciclina, uma terceira alternativa, é um antimicrobiano novo e de amplo espectro de ação, que inibe a síntese proteica pela ligação à subunidade 30S dos ribossomos, impedindo o acesso do RNAt ao sítio A (POLIDORI *et al*., 2011; ZHANG *et al*., 2015). Este antimicrobiano é uma glicilclina derivada da minociclina, com uma substituição no grupo funcional, sendo ativo para Gram negativos e Gram positivos (incluindo amostras VRE). Entretanto, por aparentemente não atingir níveis séricos elevados, sua utilização como monoterapia, para o tratamento de infecções graves causadas por VRE, não é amplamente recomendado. Por outro lado, a terapia combinada deste antimicrobiano com daptomicina no tratamento da endocardite por VRE tem sito utilizada com sucesso (BARBER *et al*., 2015; YIM, SMITH, RYBAK, 2017).

Em conjunto com o aumento da resistência aos antimicrobianos, a aquisição de fatores de virulência, bem como a capacidade dessas bactérias para formar biofilmes, também contribuiu para o aumento da prevalência desses microrganismos nas infecções humanas, particularmente as de origem hospitalar. Os fatores de virulência mais conhecidos em *Enterococcus* são: gelatinase, proteína de superfície enterocócica (Esp), substância de agregação, hialuronidase e citolisina (ARIAS; MURRAY, 2012; CHUANG *et al*., 2009; SHARIFI et al, 2012).

A gelatinase é uma enzima proteolítica codificada pelo gene *gelE*, sendo caracterizada como uma zinco metaloprotease, que hidroliza fibrinogênio, colágeno, fibrina e outros peptídeos bioativos. Já foi demonstrado em modelos animais que a expressão de gelatinase favorece o desenvolvimento de endocardite; embora seu papel na patogenicidade de infecções humanas ainda seja pouco elucidado (KOCH *et al*., 2004; TSIKRIKONIS et al, 2012; VANKERCKHOVEN et al, 2004)

A proteína de superfície de *Enterococcus* – Esp (*enterococcal surface protein*) – codificada pelo gene *esp*, está associada à parede celular, e foi identificada pela primeira vez na espécie *E. faecalis* (SHANKAR *et al.*, 1999). Porém, pode estar presente em outras espécies, particularmente *E. faecium* (WILLEMS *et al.*, 2001). Essa proteína possui uma estrutura que inclui um núcleo central constituído por unidades distintas com repetições *in tandem*, com um domínio de apoio da parede celular C-terminal levemente divergente, e um domínio N-terminal globular. A região central de repetição serve como um "braço retrátil", estendendo o N-terminal (domínio globular) através da parede celular à superfície, provavelmente esta retração pode facilitar a evasão da bactéria da ação do sistema imune do hospedeiro. Essa proteína também está associada a colonização dos enterococos a bexiga causando infecção urinária e também está associada a formação de biofimes (BALLERING *et al*., 2009; CHUANG-SMITH *et al*., 2010).

A substância de agregação é uma proteína de superfície codificada por genes plasmidiais, sendo mais comum o gene *asa1*. Essa proteína é induzida por feromônio sexual e facilita as trocas de plasmídeos conjugativos, favorecendo o contato eficiente entre célula doadora e célula receptora. Além disso, pode se ligar a proteínas da matriz extracelular (fibronectina, trombospondina, vitronectina e colágeno tipo I), bem como mediar a interação do microrganismo com células do túbulo renal, do endocárdio e do epitélio intestinal humano (FISHER; PHILLIPS, 2009; KREFT *et al*., 1992; OLSEN *et al*., 2012).

A hialuronidase enterocócica é uma enzima com ação hidrolítica que atua na degradação do ácido hialurônico, resultando em dano tecidual no hospedeiro. Este fator de virulência está associada principalmente à espécie *E. faecium* e codificada pelo gene hyl_{fm}. O gene que codifica a hialuronidase faz parte de uma estrutura genética altamente conservada localizada em um grande plasmídeo - pLG1 (150 a 350 kb), que alberga também genes de resistência, metabólicos e fatores essenciais à conjugação (ARIAS *et al*., 2009; LAVERDE GOMEZ *et al.*, 2011).

A citolisina é uma toxina bacteriana que causa a ruptura da membrana das várias células humanas, incluindo eritrócitos. Já foi demonstrado que a citolisina atua de forma significativa na gravidade da endocardite enterocócica. Embora, os mecanismos envolvidos nos danos teciduais ainda não estejam bem descritos, é possível que a citolisina contribua para o aumento do processo inflamatório, ao induzir a liberação de mediadores inflamatórios, por lisar as células teciduais e macrófagos (COBURN; GILMORE, 2003; VAN TYNE; MARTIN; GILMORE, 2013). A citolisina é codificada por um conjunto de oito genes (*cylR1*, *cylR2*, *cylLL*, *cylLS*, *cylM*, *cylB*, *cylA* e *cyII*) sendo *cylA* responsável pela expressão da atividade citolítica (SHANKAR *et al*., 2004).

Sendo assim, o monitoramento dessas amostras, exibindo características de multirresistência aos antimicrobianos e de virulência, faz-se necessário para auxiliar no desenvolvimento de estratégias de tratamento e no controle das infecções causadas por esses microrganismos. No contexto da vigilância epidemiológica, os métodos moleculares são utilizados para monitorar disseminação geográfica e prevalência de clones epidêmicos e endêmicos, avaliar estratégias preventivas ou para diagnosticar a etiologia das infecções, na busca de soluções para os desafios por essas patologias. Diversos métodos moleculares têm sido empregados para avaliação da clonalidade de amostras de *Enterococcus*. As diferenças apresentadas entre eles estão relacionadas, principalmente, com a complexidade e custos, variando, também, em função de sua reprodutibilidade e poder discriminatório. As primeiras técnicas moleculares desenvolvidas para a investigação da diversidade clonal de amostras de enterococos foram a análise do perfil plasmidial e os perfis de restrição do DNA cromossômico utilizando endonucleases específicas e eletroforese convencional. Em sequência, outras metodologias foram desenvolvidas e aplicadas, tais como ribotipagem, eletroforese de isoenzimas (MLEE, do inglês "*multilocus enzyme electrophoresis"*), amplificação randômica do DNA cromossômico (RAPD-PCR, do inglês "*random- amplified polymorphic DNA – PCR"*) e amplificação de sequências de elementos repetitivos (rep-PCR, do inglês "*repetitive-element sequence – PCR"*) (HAYDEN, 2000; TEIXEIRA *et al*., 2015).

Posteriormente, a análise do DNA cromossômico resultante da digestão por enzimas de restrição de cortes pouco frequentes (principalmente utilizando a enzima *Sma*I) e eletroforese em um campo pulsado originou a metodologia de PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*), que é utilizada para análises epidemiológicas de infecções enterocócicas. A metodologia do PFGE é baseada na prévia restrição do DNA cromossômico seguida pela eletroforese em gel de campo pulsado e análise dos perfis de bandas. A interpretação dos dados obtidos é baseada nas diferenças do tamanho dos fragmentos, que resulta em perfis de bandas a serem comparados entre as amostras estudadas (AKPAKA; KISSOON; JAYARATNE, 2016; LANDERSLEV *et al*., 2016; RYAN *et al*., 2015).

Mais recentemente, métodos baseados no sequenciamento de genes ou, ainda, do genoma completo, têm sido os recomendados na caracterização do relacionamento genético de amostras bacterianas. A metodologia de tipificação de sequências em múltiplos *loci* – MLST (*multilocus sequence typing*) – tem sido referida como a que reúne um maior número de vantagens para as análises de diversidade de microrganismos. Esquemas de tipificação por MLST já foram desenvolvidos para as espécies *E. faecium* e *E. faecalis*, onde são analisados

fragmentos internos de genes de manutenção celular (*housekeeping genes*) (MAIDEN *et al*., 2013; RAVEN *et al*., 2016).

O sequenciamento do genoma completo – WGS (*whole-genome sequencing*) – tem se tornado mais acessível e, portanto, mais utilizado na investigação das relações genéticas entre bactérias. A metodologia de WGS tem sido empregada como uma nova abordagem para o rastreamento de surtos hospitalares e em estudos mais amplos de epidemiologia molecular. As análises por WGS empregam tecnologias de sequenciamento de segunda geração, realizado a partir do DNA bacteriano total altamente fragmentado, permitindo a distinção de amostras que diferem em apenas um único nucleotídeo (BRODRICK *et al*., 2016; RAVEN *et* al., 2016; SALIPANTE *et al*., 2015).

Estudos comparativos demonstraram uma boa correlação entre as metodologias PFGE, MLST e WGS. Entretanto, as análises por MLST e WGS são mais onerosas, ficando restritas a laboratórios mais especializados (PINHOLT *et al*. 2015). Assim, em geral, a metodologia de PFGE é o método de tipificação empregado pelas redes de vigilância, apresentando um custo mais reduzido, além de ser considerado como um método eficaz e de excelente reprodutibilidade na caracterização da diversidade bacteriana (CDC PulseNet, 2013).

Assim, diante da importância dos microrganismos do gênero *Enterococcus* frente as suas habilidades em exibir diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos, particularmente para aqueles que são importantes no tratamento de infecções graves, como as relacionadas à corrente sanguínea, capacidade de transmitir e adquirir genes de resistência e virulência inter e intra- espécie, sua adaptação e sobrevivência no ambiente hospitalar e elevado potencial de disseminação, a necessidade do estudo desses aspectos de sua biologia, bem como o rastreamento das infecções decorrentes são fundamentais e frequentemente renovadas. (MUNITA; MURRAY; ARIAS, 2014; FSHARI *et al.* 2012; ARIAS; MURRAY, 2012)

1. OBJETIVOS

Esse estudo teve por objetivo principal analisar amostras de diferentes espécies de *Enterococcus* isoladas de hemoculturas de pacientes hospitalizados em instituições de saúde localizadas em dois estados brasileiros (Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte), para avaliar diferentes aspectos desse microrganismos como agentes etiológicos de infecções de corrente sanguínea.

Os objetivos específicos desse estudo foram:

- Caracterizar espécies de *Enterococcus* isoladas de infecções da corrente sanguínea por metodologia MADI-TOF;
- Avaliar a susceptibilidade das amostras de *Enterococcus* frente a um painel de antimicrobianos, contemplando diferentes classes, para caracterização de amostras multirresistentes isoladas de hemoculturas;
- Identificar perfis genotípicos de virulência pela metodologia de PCR multiplex;
- Identificar perfis genotípicos de resistência aos glicopeptídeos;
- Avaliar a diversidade genética das amostras de *Enterococcus* pela metodologia de tipagem molecular de eletroforese em campo pulsado, PFGE.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras Bacterianas

Foram avaliadas 203 amostras isoladas de hemoculturas de pacientes hospitalizados em instituições hospitalares localizadas nos estados do Rio de Janeiro (n=196) e do Rio Grande do Norte (n=7), obtidas em estudos anteriores e isoladas durante os anos de 2005 a 2015. As amostras bacterianas estavam mantidas como uma suspensão em meio de preservação, contendo 10% de leite desnatado (*Skim Milk*; BD Diagnostics, MD, EUA) acrescido de 10% de glicerol e a -20°C (suspensão estoque).

As amostras bacterianas foram reativadas por semeadura em meio de ágar sangue de carneiro (Plast Labor, Rio de Janeiro, RJ) e incubação a 36ºC ±1ºC por 18 h-24 h. Todos os testes incluídos neste estudo foram realizados a partir de uma cultura recente, em meio ágar sangue, definida como um subcultivo (a 36ºC ±1ºC por 18 h-24 h) do crescimento obtido pela da suspensão estoque.

2.2. Caracterização das Espécies de *Enterococcus* por Espectrometria de Massa

As espécies de *Enterococcus* foram caracterizadas por metodologia de MALDI-TOF MS (do inglês, *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry*). O equipamento utilizado para obtenção dos espectros foi Microflex LT (Bruker Daltonics, Alemanha), utilizando o software FlexControl no modo automático (MBT_FC.par). A partir de um crescimento recente, uma colônia de cada amostra bacteriana foi aplicada, com auxílio de palitos de madeira, em uma placa de aço polido (*target plate*) e, em sequência, recoberta com 1 µL de uma solução saturada da matriz HCCA (ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico). Os espectros foram gerados com auxílio do software Biotyper 3.0 (do mesmo fabricante do equipamento), utilizado para informar a proposta de identificação e os escores de confiabilidade, interpretados de acordo com os seguintes critérios indicados pelo fabricante: 2,3 a 3,0 – altamente provável a identificação de gênero e espécie; 2,0 a 2,29 –

identificação segura para gênero e provável para espécie; 1,7 a 1,99 – identificação provável para gênero e espécie; 0,0 a 1,69 – não há segurança para identificação.

2.3. Determinação de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

A partir de um crescimento recente, foi preparada uma suspensão bacteriana em solução salina fisiológica (NaCl a 0,85%) estéril, com turbidez correspondente ao padrão 0,5 da escala de McFarland, representativa de 1,5 X 10^8 UFC/mL. A suspensão bacteriana foi semeada na superfície do meio ágar Müeller-Hinton (MH-A, BD Diag.), com auxílio de *swabs* estéreis e em três direções distintas. Discos impregnados com antimicrobianos foram depositados sobre o inóculo de forma distribuída e espaçadamente e as placas incubadas a 36°C ±1°C por 18 h ou por 24 h para a leitura dos halos de susceptibilidade à vancomicina.

Para o teste de susceptibilidade foram utilizados discos contendo os seguintes 15 antimicrobianos nas concentrações designadas entre parênteses: ampicilina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), fosfomicina (200 µg), levofloxacina (5 µg), nitrofurantoína (300 µg), norfloxacina (10 µg), penicilina (10 µg), rifampicina (5 µg), teicoplanina (30 µg), tetraciclina (30 µg), vancomicina (30 µg) e concentrações elevadas de gentamicina (120 µg) e estreptomicina (300 µg). Os discos de antimicrobianos foram obtidos da Oxoid Ltd (Hampshire, Reino Unido). A amostra de referência *E. faecalis* ATCC 29212 foi utilizada como controle nos testes.

Os halos de inibição foram interpretados de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016), para a determinação das categorias de susceptibilidade (sensível, intermediário e resistente). Foram consideradas amostras multirresistentes aquelas que apresentaram resistência plena a três ou mais classes de antimicrobianos.

2.4. Detecção de Genótipos de Resistência aos Glicopeptídeos e de Virulência

Amostras que apresentaram fenótipo de não susceptibilidade (categorias intermediária ou resistente) aos glicopeptídeos nos testes de disco difusão foram submetidas à amplificação de segmentos específicos por metodologia da reação em cadeia da polimerase (PCR), para a detecção dos genes *vanA* e *vanB*, segundo as recomendações de Dutka-Malen *et al*.,1995 e Departieu, Perichon e Courvalin, 2004.

Foi também avaliada, por metodologia de PCR, a presença de nove genes relacionados à expressão dos respectivos fatores envolvidos na virulência de *Enterococcus*: *asa1*, substância de agregação; *cylA*, citolisina; *esp*, proteína de superfície de enterococos; *hyl*, hialuronidase; *gelE*, gelatinase; *ace*, adesina de superfície; *efa*A, antígeno A; *agg*A, substância de agregação; e *epp*, determinante de feromônio. Para tal, duas reações em protocolos multiplex foram empregadas para detecção da presença desses genes. Os protocolos utilizados foram baseados nas recomendações de Gomes *et al*. 2008, Mannu *et al*. (2003), Padilla *et al*. (2012) e de Vankerckhoven *et al*. (2004).

2.4.1. Extração de DNA

A partir de um crescimento recente foi preparada uma suspensão densa em 200µL de uma solução aquosa contendo 5% (p/v) de resina Chelex 100 (Bio-Rad Labs, Hercules, CA, EUA) e 0,2 mg/mL de proteinase K (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA), segundo as recomendações de Pinto *et al*. (2013). A suspensão bacteriana, em tubo tipo Eppendorf, foi incubada a 56°C, em banho térmico, durante 1 h.

Após o período de incubação, a suspensão foi vigorosamente homogeneizada, em vortex por 10 seg, e em seguida deixada por 10 min em banho fervente. Após centrifugação (12.000 rpm por 3 min), o sobrenadante contendo o DNA molde foi armazenado a -20°C ou imediatamente utilizado para amplificação dos genes alvo por metodologia de Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.

2.4.2. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

Para a detecção dos genes associados à resistência adquirida aos glicopeptídeos, a mistura de reação foi preparada com: tampão de PCR 1X [10 mM Tris, 50 mM KCl (pH 8,3)], 0,2 mM cloreto de magnésio ($MgCl_2$) para detecção do gene *vanA* e 1 mM cloreto de magnésio ($MgCl_2$) para detecção do gene *vanB*, 1,5U da enzima *Platinum* Taq DNA polimerase, 0,4 μM de cada oligonucleotídeo iniciador (TABELA 1), 0,2 mM de cada dinucleotídeo trifosfatado (dNTP) e 2 μL da suspensão de DNA molde, para um volume final de 25 μL. Todos os reagentes foram obtidos da Invitrogen, Life Technologies do Brasil (São Paulo, SP).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (*Veriti Thermal Cycler*, Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), utilizando-se as seguintes etapas de ciclagem: uma etapa inicial a 95°C por 10 min; 30 ciclos de 94°C por 30 seg (para desnaturação do DNA fita dupla em fita simples), 54°C por 30 seg (para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores) e 72°C por 30 seg (para extensão das novas fitas de DNA) e uma etapa de extensão final a 72°C por 10 min. As amostras *E. faecalis* A256, portadora do genótipo *vanA*, e *E. faecalis* V583, portadora do genótipo *vanB*, foram utilizadas como controles positivos das reações.

Para a amplificação dos genes de virulência foram utilizados dois protocolos de reações multiplex, sendo a Reação 1 estabelecida para detecção de *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp* e *hyl* e a Reação 2 para amplificação dos genes *efaA*, *eep*, *aggA* e *ace*. Para Reação 1, as concentrações dos reagentes foram: tampão de PCR 1X, 3 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP e 0,8 μM de cada oligonucleotídeo iniciador (TABELA 1), 0,5U da enzima *Platinum* Taq DNA polimerase. Já para a Reação 2, foi utilizado tampão de PCR 1X, 2 mM $MgCl_2$, 0,2mM de cada dNTP, 0,5U da enzima *Platinum* Taq DNA polimerase e 0,6 μM dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção de *efaA* e *eep* e 1,2 μM para *aggA* e *ace* (TABELA 1). Volumes de 2 μL da suspensão de DNA molde foram adicionados às misturas de reação para um volume final de 25 μL. Todos os reagentes utilizados em ambos os protocolos foram obtidos da Invitrogen, Life Tech.

Para a Reação 1, as condições de amplificação foram as seguintes: 1 ciclo de 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, para desnaturação do DNA, 56°C por 1 min, para o anelamento dos iniciadores, e 72°C por 1 min, para extensão das novas fitas de DNA, e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 10 min, em termociclador. Já para a Reação 2, as condições

de amplificação incluíram: 1 ciclo de 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, para desnaturação do DNA, 51°C por 1 min, para o anelamento dos iniciadores, e 72°C por 1 min, para extensão das novas fitas de DNA, e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 10 min. As amostras de referência *E. faecalis* OG1xpAM714 (*cylA*$^+$, *esp*$^+$), *E. faecalis* OG1RF (*gelE*$^+$), *E. faecalis* UERJ101 (*asa*$^+$, *esp*$^+$) e CL 8020 (*hyl*$^+$) foram utilizadas como controles positivos para Reação 1; enquanto que, *E. faecalis* CL6738 (*efa*+, *agg*+, *eep*+, *ace*+) foi controle positivo para Reação 2.

Tabela 1 – Genes, oligonucleotídeos iniciadores e tamanhos dos produtos obtidos nas reações de PCR para caracterização genotípica da resistência e virulência de amostras de *Enterococcus*.

Genes alvo	Sequências de nucleotídeos dos iniciadores utilizados (direção 5`-3`)	Tamanho do produto (em pb)	Referência
vanA	F: GGGAAAACGACAATTGC R: GTACAATGCGGCCGTTA	732	Dutka-Malen *et al.* (1995)
vanB	F: ACGGAATGGGAAGCCGA R: TGCACCCGATTTCGTTC	647	Departieu, Perichon & Courvalin (2004)
asa1	F: GCACGCTATTACGAACTATGA R: TAAGAAAGAACATCACCACGA	375	Vankerckhoven *et al*. (2004)
gelE	F: AGTTCATGTCTATTTTCTTCAC R: CTTCATTATTTACACGTTTG	402	Gomes *et al* (2008)
cylA	F: ACTCGGGGATTGATAGGC R: GCTGCTAAAGCTGCGCTT	688	Vankerckhoven *et al*. (2004)
esp	F: AGATTTCATCTTTGATTCTTGG R: AATTGATTCTTTAGCATCTGG	510	Vankerckhoven *et al*. (2004)
hyl	F: ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG R: GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	276	Vankerckhoven *et al*. (2004)
efaA	F: GACAGACCCTCACGAATA R: AGTTCATCATGCTGCTGTAGTA	705	Padilla *et al*. (2012)
eep	F: GAGCGGGATTTTTAGTTCG R: TACTCCAGCATTGGATGCT	937	Padilla *et al*. (2012)
aggA	F: AAGAAAAAGTAGACCAAC R: AACGGCAAGACAAGTAAATA	1553	Padilla *et al*. (2012)
ace	F: AAAGTAGAATTAGATCCACAC R: TCTATCACATTCGGTTGCG	320	Mannu *et al*. (2003)

Legenda: F, direta (*foward*); R, reversa (*reverse*); A, adenina; C, citosina; G, guanina; T, timina.
Fonte: A autora, 2017.

2.4.3. Eletroforese e Análise dos Produtos Amplificados

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese, por 1 h a 100V, em gel de agarose (Invitrogen, Life Tech.) a 1,2% preparado em tampão TBE 0,5X (45mM Tris, 45mM ácido bórico, 1 mM EDTA, reagentes obtidos da Bio-Rad Labs.). Os géis foram corados com 0,5 µg/mL de brometo de etídio por 30 min, descorados por 30 min em água e, em seguida, visualizados e as imagens capturadas com auxílio do sistema *MiniBis Pro* (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Jerusalém, Israel). As corridas eletroforéticas foram acompanhadas de um padrão de pares de base (*100bp Ladder*, Invitrogen, Life Tech.) utilizado para estimar o tamanho dos produtos amplificados. Os resultados foram interpretados visualmente, baseados na comparação dos tamanhos dos amplicons.

Os tamanhos esperados dos produtos de amplificação para cada um dos genes avaliados estão indicados na TABELA 1.

2.5. Perfis de Fragmentação do DNA Cromossômico por Eletroforese em Campo Pulsado - PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*)

O protocolo utilizado seguiu a recomendação de Teixeira *et al*., (1997), sendo o DNA cromossômico obtido pela técnica de lise *in situ* e submetido a restrição com a enzima *Sma*I. Para tal, a partir de um crescimento recente, em meio AS, foram preparadas suspensões bacterianas em 500 µL de tampão PIV (1 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7,6), com turbidez ajustada para equivalente ao padrão 8 da escala de McFarland. O mesmo volume (500 µL) de agarose de baixo ponto de fusão (*NuSieve GTG Agarose*, Lonza, Suíça) a 2%, confeccionada neste mesmo tampão, foi adicionada às suspensões celulares. Esta mistura foi vertida em moldes que, após solidificação, deram origem a pequenos blocos contendo as células bacterianas.

Os blocos foram, então, incubados com uma solução de lise constituída de tampão EC (6mM Tris, pH 7,6; 1M NaCl; 100mM EDTA; 1% Sarcosyl, Bio-Rad Lab.) adicionado de 1 mg/mL de lisozima e 5 U/mL de mutanolisina (ambas obtidas da Sigma-Aldrich Co.), por 18 h - 24 h a 36±1°C e sob agitação suave. Após este período, a solução de lise foi substituída por tampão ESP (0,5 mM EDTA, pH 9,5; 1% Sarcosyl; 1 mg/mL de proteinase K, esta última

obtida da Sigma-Aldrich Co.) e foi realizada uma nova incubação por semelhante período (por 18 h – 24 h) em banho térmico a 50°C. Após estas etapas (de lise bacteriana, liberação do DNA e digestão de proteínas), os blocos foram lavados por quatro vezes em tampão TE (10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA, pH 7,6); sendo duas por 30 min e as outras duas por 1h.

Após as lavagens, os blocos contendo DNA foram incubados por 2 h em 250 µL do tampão específico para endonuclease de restrição *Sma*I (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EUA). Após a retirada do tampão, cada bloco foi incubado com 2 U da respectiva enzima por 18 h - 24 h a 25°C em banho térmico.

Os blocos foram então fundidos a 70°C e aplicados em gel de agarose (*UltraPure Agarose*, Invitrogen Life Tech.) a 1,2% , confeccionada em TBE 0,5X. Os fragmentos gerados foram separados em um sistema de eletroforese em campo pulsado - *CHEF DRIII Variable Angle System* (Bio-Rad Lab). Os parâmetros utilizados para eletroforese foram pulsos iniciais de 5 seg, pulsos finais de 35 seg, ângulo 120° e 6V/cm, durante 22 h a 13°C.

Os géis foram corados com 0,5 µg/ml brometo de etídeo por 30 min, descorados em água por 2 h e, posteriormente visualizados e as imagens capturadas como descrito no item 3.4.3. Os perfis eletroforéticos foram analisados pelo aplicativo *BioNumerics* v 7.6 (Applied Maths, Bélgica), com o emprego do coeficiente Dice, para gerar uma matriz de similaridade, que foi utilizada na obtenção de dendrogramas construídos pelo método hierárquico de agrupamento de *pares não ponderados* com base na *média* aritmética (UPGMA, *unweighted pair-group method using arithmetic averages*).

3. RESULTADOS

Foram avaliadas 203 amostras bacterianas obtidas a partir de hemoculturas de pacientes internados (uma por paciente) em 20 instituições hospitalares, sendo 16 localizadas no estado do Rio de Janeiro (nomeadas de A a P) e quatro no Rio Grande do Norte (nomeadas de Q a T). Para uma das amostras não foi possível determinar a instituição de origem.

O período avaliado neste estudo correspondeu a 11 anos completos, de Janeiro de 2005 a Dezembro de 2015. A distribuição das amostras por instituição hospitalar está apresentada na TABELA 2.

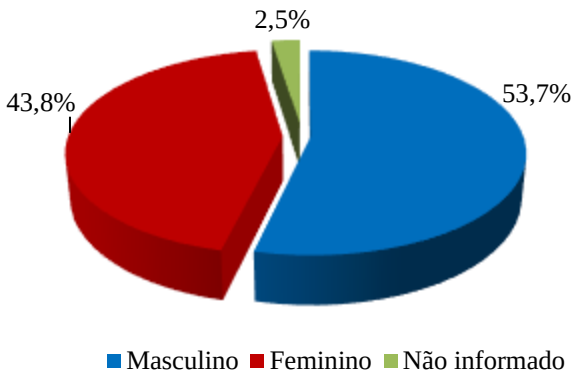
Tabela 2 – Distribuição das amostras de *Enterococcus*, analisadas de hemoculturas de pacientes internados, por instituição hospitalar de origem[1].

Instituição hospitalar	Nº de amostras (n=203)	% amostras no Estado de origem	% Total (n=203)
Rio de Janeiro (n=196)			
A	120	61,2	59,1
B	41	21,0	20,2
C	8	4,2	3,9
D	6	3,1	3,0
E	3	1,5	1,6
F	3	1,5	1,6
G	2	1,0	0,9
H	2	1,0	0,9
I	2	1,0	0,9
J	2	1,0	0,9
K	1	0,5	0,5
L	1	0,5	0,5
M	1	0,5	0,5
N	1	0,5	0,5
O	1	0,5	0,5
P	1	0,5	0,5
NI[2]	1	0,5	0,5
Rio Grande do Norte (n=7)			
Q	3	42,9	1,6
R	2	28,5	0,9
S	1	14,3	0,5
T	1	14,3	0,5

Legenda: [1] Nomeadas neste estudo por letras maiúsculas (de A a T); [2] NI, não informado.
Fonte: A autora, 2017

A maioria dos pacientes pertencia ao gênero masculino (53,7%). Porém, não foi possível obter esta informação para 2,5% da população estudada (cinco pacientes). A FIGURA 1 apresenta a distribuição dos pacientes por gênero.

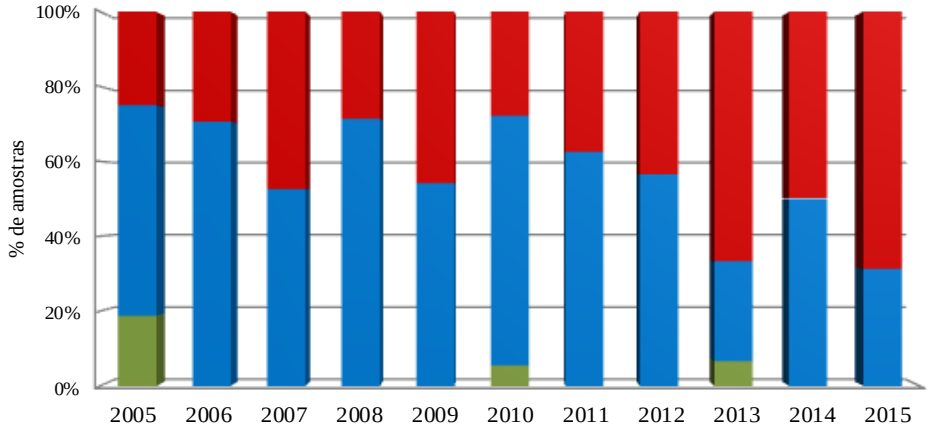
Figura 1 – Distribuição por gênero dos 203 pacientes analisados neste estudo.



Fonte: A autora, 2017.

A distribuição das amostras por ano avaliado foi relativamente semelhante, para a maioria do período. A média foi de 18,5 amostras bacterianas por ano, variando de sete em 2008 a 32 em 2014. A FIGURA 2 apresenta a distribuição das amostras por ano considerando-se também o gênero dos pacientes.

Figura 2 – Distribuição das amostras bacterianas por ano de estudo (2005 a 2015) e gênero dos 203 pacientes analisados.



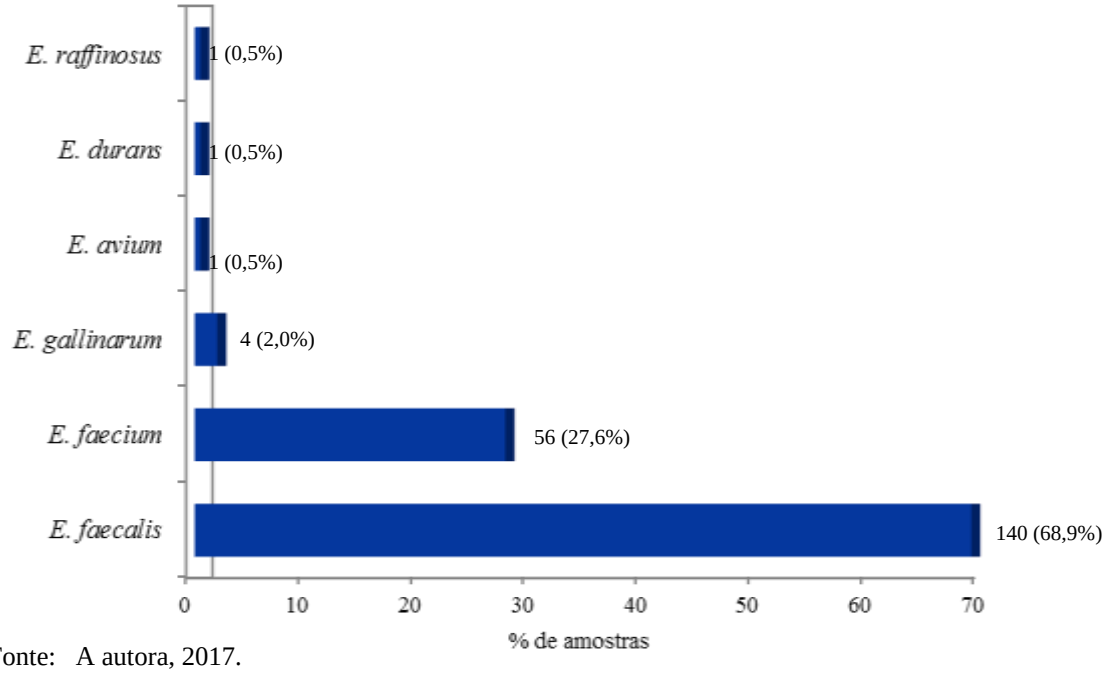
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Feminino	25	29,4	47,4	28,6	45,8	27,8	37,5	43,5	66,7	50	68,7
Masculino	56,3	70,6	52,6	71,4	54,2	66,7	62,5	56,5	26,7	50	31,3
Não Informado	18,7	0	0	0	0	5,5	0	0	6,6	0	0

Fonte: A autora, 2017.

As 203 amostras bacterianas incluídas neste estudo foram caracterizadas por espectometria de massas - MALDI-TOF, que identificou seis espécies distintas: *E. avium*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. raffinosus*. As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* foram as prevalentes correspondendo a 68,9% (140/203) e 27,6% (56/203), respectivamente. A FIGURA 3 apresenta a frequência das espécies identificadas neste estudo.

Das sete amostras obtidas de instituições hospitalares localizadas no Rio Grande do Norte, seis pertenceram à espécie *E. faecalis* (85,7%) e uma *E. gallinarum* (14,3%).

Figura 3 – Frequência das espécies de *Enterococcus* isoladas de amostras de sangue e analisadas neste estudo.

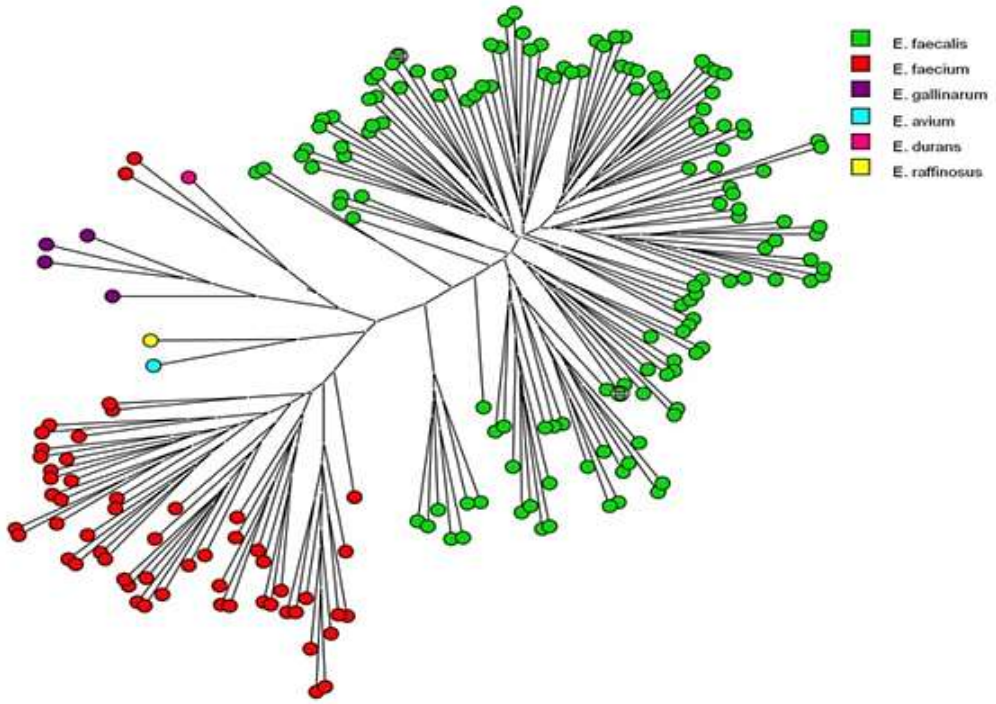


Fonte: A autora, 2017.

A caracterização das espécies pela metodologia de MALDI confirmou o esperado. Para as amostras caracterizadas em *E. faecalis* foram obtidos escores de variaram de 2,001 a 2,411, sendo que a maioria (75,7%; 106/140) apresentou valores ≥2,3, que garante com segurança a caracterização em espécie. Para *E. faecium* os valores variaram de 2,002 a 2,488, e 76,8% (43/56) foram ≥2,3. Para as demais espécies, os escores variaram de 2,0 a 2,3.

Os resultados obtidos com a metodologia de MALDI-TOF (escores) foram utilizados para construção de uma árvore de similaridade, utilizando-se o algoritmo de *Neighbor joining*. A distribuição das amostras pelas espécies se mostrou coerente, considerando-se os agrupamentos construídos com auxílio do software BioNumerics. A FIGURA 4 apresenta a árvore construída pelas análises do agrupamento dos escores obtidos na metodologia de MALDI-TOF. O arranjo das amostras por espécie se mostrou bem definido com agrupamento espécie específico. Porém, as amostras de *E. avium* e de *E. raffinosus* ficaram próximas compartilhando o mesmo nó da árvore. Da mesma forma, a amostra de *E. durans* foi agrupada com duas de *E. faecium*. Tais resultados podem ter sido influenciados pelo número reduzido de amostras que foi avaliado.

Figura 4 – Agrupamento de 203 amostras de *Enterococcus* por espécie de acordo com os resultados obtidos pela metodologia de MALDI TOF e emprego do algoritmo *Neighbor joining*[1].



Nota: [1]Realizado com auxílio do aplicativo BioNumerics (Applied Math, Bélgica)
Fonte: A autora, 2017.

As 203 amostras bacterianas foram avaliadas quanto à susceptibilidade a 15 antimicrobianos por metodologia de disco difusão. Os resultados obtidos estão demonstrados na TABELA 3. Pode-se observar que a maioria das amostras foi sensível a ampicilina (75,0%), cloranfenicol (73,4%), fosfomicina (95,1%), nitrofurantoína (83,3%) e penicilina . Por outro lado, um elevado percentual de amostras foi resistente a ciprofloxacina, eritromicina, tetraciclina e rifampicina. Em relação à categoria intermediária, foram encontradas frequências mais elevadas para ciprofloxacina e eritromicina. Foram identificados percentuais semelhantes de amostras sensíveis e resistentes para levofloxacina e norfloxacina. Em relação aos fenótipos de destacada importância clínica (resistência aos glicopeptídeos e aminoglicosídeos), foi observado que das 203 amostras de enterococos 14,3% e 19,7% apresentaram, respectivamente, resistência plena à teicoplanina e vancomicina; enquanto que, 20,7% e 35,5% à estreptomicina e gentamicina, respectivamente (TABELA 3).

Tabela 3 – Distribuição das amostras de *Enterococcus* isoladas de sangue por categoria de susceptibilidade (sensível, intermediário, resistente), de acordo com os resultados obtidos nos testes de disco difusão para 15 antimicrobianos.

Antimicrobianos	Categoria de Susceptibilidade / Número de amostras (% de amostras)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	152 (75)	-	51 (25)
Ciprofloxacina	63 (31)	46 (22,7)	94 (46,3)
Cloranfenicol	149 (73,4)	19 (9,4)	35 (17,2)
Eritromicina	19 (9,4)	50 (24,6)	134 (66)
Estreptomicina[1]	154 (75,9)	7 (3,4)	42 (20,7)
Fosfomicina	193 (95,1)	4 (1,9)	6 (3,0)
Gentamicina[1]	124 (61,1)	7 (3,4)	72 (35,5)
Levofloxacina	104 (51,2)	6 (3,0)	93 (45,8)
Nitrofurantoína	169 (83,3)	10 (4,9)	24 (11,8)
Norfloxacina	84 (41,3)	23 (11,3)	96 (47,3)
Teicoplanina	169 (83,3)	5 (2,4)	29 (14,3)
Tetraciclina	88 (43,3)	12 (5,9)	103 (50,8)
Vancomicina	163 (80,3)	-	40 (19,7)
Penicilina	149 (73,4)	-	54 (26,6)
Rifampicina	64 (31,5)	32 (15,8)	107 (52,7)

Legenda: [1] Discos contendo concentrações elevadas dos antimicrobianos estreptomicina e gentamicina; - nenhuma amostra.
Fonte: A autora, 2017.

Para a avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos em relação às espécies de *Enterococcus* identificadas neste estudo, foram reunidos os valores correspondentes às categorias resistente e intermediária. Os percentuais mais elevados de amostras não susceptíveis para a espécie *E. faecalis* ocorreram para eritromicina (90,7%) seguido de tetraciclina (67,9%) e ciprofloxacina (63,6%). Em relação à espécie *E. faecium*, os maiores percentuais de amostras não susceptíveis corresponderam à eritromicina (96,4%), rifampicina (91,1%) e ciprofloxacina (89,3%) (TABELA 4).

E. faecium apresentou taxas de não susceptibilidade elevadas (consideradas superiores a 50%) a um número maior de antimicrobianos do que *E. faecalis* (nove e cinco,

respectivamente). A espécie *E. faecium* apresentou taxas de não susceptibilidade superiores à *E. faecalis* em relação aos beta-lactâmicos (ampicilina, 76,8% / 3,6%; penicilina, 79,8% / 5,7%), quinolonas (ciprofloxacina, 89,3% / 63,6%; levofloxacina, 75,0% / 40,0%; norfloxacina, 78,6% / 52,1%), glicopeptídeos (teicoplanina, 55,4% / 2,1; vancomicina, 57,1% / 5,7%) e rifampicina (91,1% / 60,7%). Apenas para tetraciclina, a taxa de amostras não susceptíveis foi superior para *E. faecalis* (67,9%), em relação à *E. faecium* (26,8%). Já para eritromicina, as taxas de não susceptibilidade foram bastante elevadas e semelhantes para ambas espécies (*E. faecalis* 90,7%; *E. faecium* 96,4%) (TABELA 4).

Com relação às quatro amostras pertencentes à espécie *E. gallinarum*,, taxas de não susceptibilidade superiores à 50% foram observadas para eritromicina e tetraciclina. Todas as amostras de *E. gallinarum*, apesar de certamente apresentarem resistência intrínseca à níveis baixos de vancomicina, mostraram-se sensíveis a este antimicrobiano nos testes de disco difusão. Também, todas as amostras desta espécie foram sensíveis à teicoplanina e não exibiram fenótipo de resistência a níveis elevados de estreptomicina. Entretanto, uma amostra apresentou resistência a níveis elevados de gentamicina (TABELA 4).

As amostras pertencentes às espécies *E. avium*, *E. durans* e *E. raffinosus* (uma amostra cada) foram susceptíveis a quase totalidade dos antimicrobianos testados. A amostra de *E. avium* não foi susceptível apenas a tetraciclina; *E. durans* a nitrofurantoína e a rifampicina; e *E. raffinosus* a ampicilina, a tetraciclina e a penicilina (TABELA 4).

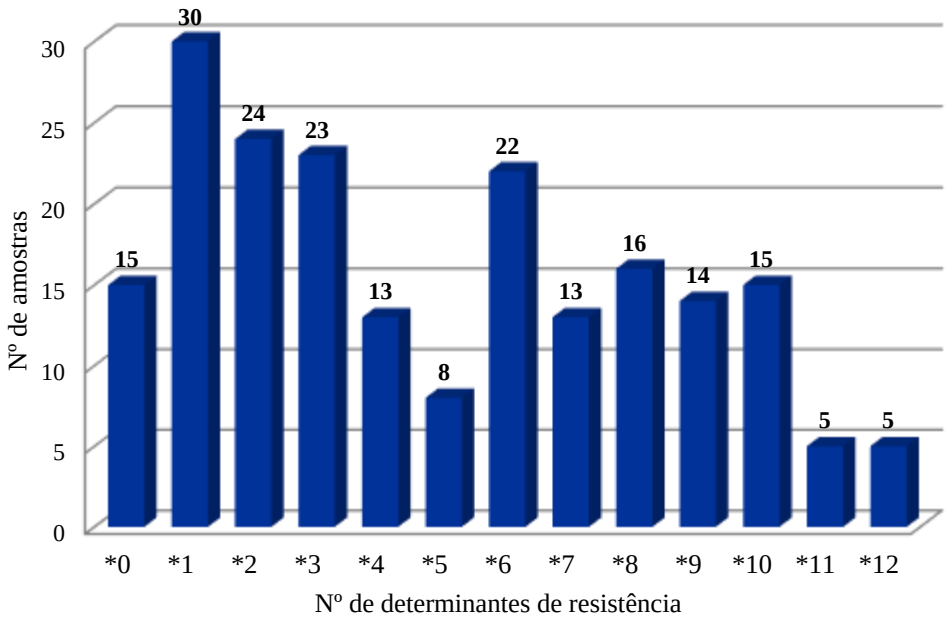
Tabela 4 – Frequência de amostras de *Enterococcus* não susceptíveis[1] aos antimicrobianos em relação às espécies identificadas neste estudo.

Antimicrobianos	Espécies / % de amostras não susceptíveis					
	E. faecalis (n=140)	*E. faecium* (n=56)	*E. gallinarum* (n=4)	*E. avium* (n=1)	*E. durans* (n=1)	*E. raffinosus* (n=1)
Ampicilina	3,6	76,8	50,0	-[3]	-	100
Ciprofloxacina	63,6	89,3	25,0	-	-	-
Cloranfenicol	36,4	1,8	50,0	-	-	-
Eritromicina	90,7	96,4	75,0	-	-	-
Estreptomicina[2]	25,0	25,0	-	-	-	-
Fosfomicina	3,6	7,1	25,0	-	-	-
Gentamicina[2]	37,1	46,4	25,0	-	-	-
Levofloxacina	40,0	75,0	25,0	-	-	-
Nitrofurantoína	7,1	37,5	50,0	-	100	-
Norfloxacina	52,1	78,6	50,0	-	-	-
Teicoplanina	2,1	55,4	-	-	-	-
Tetraciclina	67,9	26,8	75,0	100	-	100
Vancomicina	5,7	57,1	-	-	-	-
Penicilina	5,7	79,8	50,0	-	-	100
Rifampicina	60,7	91,1	50,0	-	100	-

Legenda: Somatório dos resultados obtidos nas categorias resistente e intermediária; [1] Discos contendo concentrações elevadas dos antimicrobianos estreptomicina e gentamicina; - nenhuma amostra; Em destaque, percentuais superiores a 50%.
Fonte: A autora, 2017.

O número de marcadores de resistência variou de um a 12, considerando-se os 15 antimicrobianos testados. A maioria das amostras (54,7%; 111/203) apresentou resistência a quatro ou mais antimicrobianos. Entretanto, 7,4% das amostras (15/203) apresentaram resultados nas categorias sensível ou intermediário para todos os antimicrobianos testados. A FIGURA 5 apresenta a distribuição das amostras em relação ao número de marcadores de resistência plena.

Figura 5 – Distribuição das amostras em relação ao número de marcadores[1] de resistência aos antimicrobianos.



Nota: [1]O número de marcadores foi definido como o número de antimicrobianos para os quais foram identificados resultados na categoria de resistência determinada por metodologia de disco difusão; os números acima das barras especificam o número de amostras bacterianas.
Fonte: A autora, 2017.

A distribuição do número de marcadores de resistência por espécie está apresentada na TABELA 5. Foi observado que, as amostras de *E. avium* e de *E. raffinosus* apresentaram resistência plena a apenas um antimicrobiano (um marcador); enquanto que *E. durans* à dois marcadores. As quatro amostras de *E. gallinarum* apresentaram resultados variáveis desde sensível e/ou intermediário a todos os 15 antimicrobianos testados (nenhum marcador) até oito marcadores. A maioria das amostras de *E. faecalis* (53,6%) apresentou de nenhum a três marcadores. Por outro lado, a maioria de *E. faecium* (60,6%) demonstrou resistência plena de nove a 12 marcadores. Apenas amostras da espécie *E. faecium* foram resistentes a 11 e 12 marcadores dentre os 15 antimicrobianos testados.

Tabela 5 – Distribuição do número de marcadores de resistência em relação às espécies de *Enterococcus* isoladas de hemoculturas.

Nº de marcadores	Espécie / % de amostras					
	E. faecalis (n=140)	*E. faecium* (n=56)	*E. gallinarum* (n=4)	*E. avium* (n=1)	*E. durans* (n=1)	*E. raffinosus* (n=1)
Nenhum	9,3	1,8	25,0	-	-	-
1	17,9	5,4	25,0	100	-	100
2	10,7	12,5	-	-	100	-
3	15,7	-	-	-	-	-
4	10,0	-	-	-	-	-
5	3,6	3,6	25,0	-	-	-
6	14,3	3,6	-	-	-	-
7	8,6	3,6	-	-	-	-
8	7,1	8,9	25,0	-	-	-
9	1,4	19,6	-	-	-	-
10	1,4	23,2	-	-	-	-
11	-	7,1	-	-	-	-
12	-	10,7	-	-	-	-

Nota:[1]Em destaque a faixa correspondente ao número de marcadores que agrupou a maioria das amostras de *E. faecalis* e de *E. faecium*; - , nenhuma amostra.
Fonte: A autora, 2017.

Foi também analisada a distribuição do número de marcadores nas instituições de saúde de origem das amostras de *Enterococcus*. Dentre as instituições localizadas no Rio Grande do Norte, o número máximo de marcadores de resistência encontrado foi de seis, em uma amostra obtida do Hospital R. De quatro instituições localizadas no estado do Rio de Janeiro foram avaliadas amostras de *Enterococcus* apresentando o número máximo de marcadores de resistência encontrado no estudo, foram elas: C, E, G e M. Estes resultados estão demonstrados na TABELA 6.

Tabela 6 – Distribuição do número de marcadores de resistência em relação às instituições hospitalares de origem das amostras de *Enterococcus* isoladas de hemoculturas.

Origem[1] (nº de amostras)	Número de marcadores de resistência / % de amostras												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A (n=120)	7,5	20,0	13,3	14,2	9,2	3,3	12,5	8,3	6,7	4,2	0,8	-	-
B (n=41)	7,3	9,8	12,2	2,4	4,9	4,9	7,3	7,3	12,2	17,1	12,2	2,4	-
C (n=8)	-	-	12,5	12,5	-	-	-	-	12,5	-	-	25,0	37,5
D (n=6)	-	-	16,7	-	-	-	16,7	-	-	-	66,6	-	-
E (n=3)	-	-	-	-	-	33,3	-	-	33,3	-	-	-	33,3
F (n=3)	-	-	-	-	-	33,3	33,3	33,3	-	-	-	-	-
G (n=2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50,0	-	50,0
H (n=2)	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I (n=2)	-	50,0	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J (n=2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50,0	50,0	-
K (n=1)	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-
L (n=1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-
M (n=1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
N (n=1)	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-
O (n=1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-
P (n=1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-
Q (n=3)	66,7	33,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R (n=2)	50,0	-	-	-	-	-	50,0	-	-	-	-	-	-
S (n=1)	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T (n=1)	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota: [1]Instituição hospitalar de origem; - , nenhuma amostra; em destaque, os resultados relativos as instituições hospitalares localizadas no estado do Rio Grande do Norte (as demais são localizadas no estado do Rio de Janeiro; para uma amostra bacteriana não foi possível determinar a instituição de origem e esta apresentou 10 marcadores de resistência.

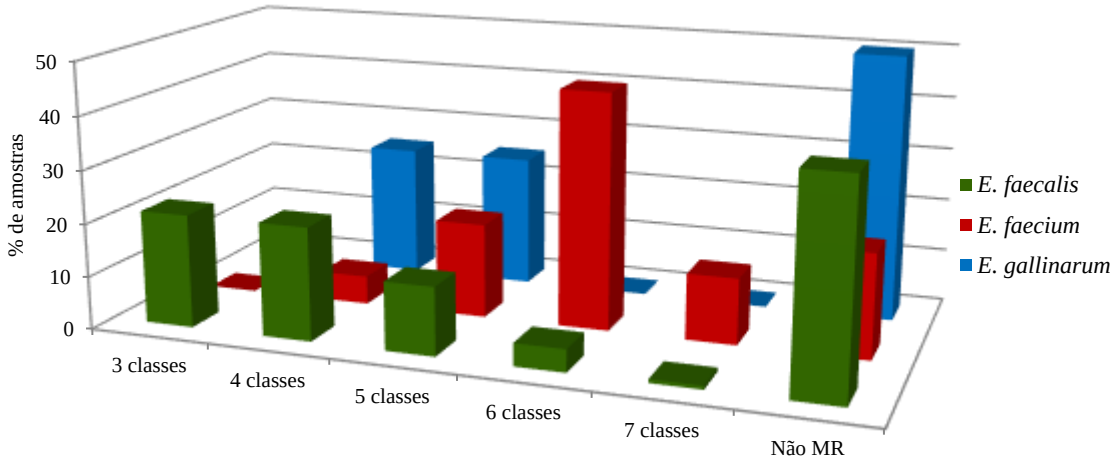
Fonte: A autora, 2017.

Considerando-se o número de marcadores de resistência plena (de 1 a 12), foram identificados 90 perfis de resistência. Os prevalentes reuniram 16 (7,9%), 12 (5,9%) e 10 (4,9%) amostras e foram relacionados à resistência apenas a rifampicina, a um conjunto de seis antimicrobianos (ciprofloxacina, eritromicina, levofloxacina, tetraciclina e níveis elevados de gentamicina) e apenas a eritromicina, respectivamente. A grande maioria dos perfis (68,9%; 62/90) foi equivalente a uma única amostra.

Dentre os 90 perfis de resistência identificados, foram caracterizados 73 como de multirresistência por corresponderem de três a sete classes de antimicrobianos. Perfis de multirresistência (MR) agruparam 132 amostras (65,0%), sendo o prevalente com 12 amostras. Os demais perfis MR foram assim distribuídos: um perfil com seis amostras; quatro perfis com cinco amostras cada; quatro perfis com quatro amostras cada; seis perfis com três amostras cada; três perfis com duas amostras cada; e 54 perfis com uma amostra cada. Tais resultados apontaram uma grande diversidade de perfis MR. Além disso, das 132 amostras multirresistentes, 22,7% foram resistentes a 3, 5 e 6 classes de antimicrobianos (30 amostras cada); 25,8% a quatro classes (34 amostras); e 6,1% (8 amostras) a 7 classes.

Em relação às espécies de *Enterococcus*, 60,7% (85/140) das amostras de *E. faecalis*, 80,4% (45/56) de *E. faecium* e 50,0% (2/4) de *E. gallinarum* apresentaram perfis MR. As amostras de *E. avium*, *E. durans* e *E. raffinosus* não foram multirresistentes. A maioria das amostras de *E. faecium* apresentou perfis MR para 5,6 e 7 classes de antimicrobianos; enquanto que a maior frequência de amostras MR em *E. faecalis* foi relacionada a resistência a 3, 4, e 5 classes. A FIGURA 6 apresenta a distribuição das amostras de *Enterococcus* por espécie e em relação ao número classes de antimicrobianos para as quais foram resistentes.

Figura 6 – Percentual de amostras de *Enterococcus* multirresistentes (MR) por espécies em relação ao número de classes de antimicrobianos para as quais foram não susceptíveis.



Fonte: A autora, 2017

A maioria das amostras obtidas da quase totalidade das instituições hospitalares avaliadas apresentou características de multirresistência. Cabe destacar, que a partir das instituições nomeadas B, C, E, G e M foram isoladas amostras resistentes a até sete classes de antimicrobianos. Três das quatro instituições localizadas no estado do Rio Grande do Norte apresentaram amostras MR; enquanto que dentre as 15 localizadas no Rio de Janeiro, em apenas uma (instituição I) não foram identificadas amostras MR. A distribuição das amostras MR em relação à instituição de origem está representada na TABELA 7.

Tabela 7 – Distribuição das amostras de *Enterococcus* multirresistentes isoladas de hemocultura em relação às instituições hospitalares de origem.

Origem[1] (nº de amostras)	Número de classes de antimicrobianos / % de amostras resistentes					Total (%) de amostras MR[2]
	3	4	5	6	7	
A (n=120)	19,2	19,2	11,7	7,5	-	57,6
B (n=41)	7,3	12,2	24,4	21,9	4,9	70,7
C (n=8)	12,5	-	-	37,5	37,5	87,5
D (n=6)	-	16,7	16,7	50,0	-	83,4
E (n=3)	-	33,3	-	33,3	33,3	100
F (n=3)	-	66,6	33,3	-	-	100
G (n=2)	-	-	-	50,0	50,0	100
H (n=2)	100	-	-	-	-	100
I (n=2)	-	-	-	-	-	0,0
J (n=2)	-	-	-	100	-	100
K (n=1)	-	-	100	-	-	100
L (n=1)	-	-	-	100	-	100
M (n=1)	-	-	-	-	100	100
N (n=1)	-	-	100	-	-	100
O (n=1)	-	-	100	-	-	100
P (n=1)	-	-	-	100	-	100
Q (n=3)	-	-	-	-	-	0,0
R (n=2)	-	100	-	-	-	100
S (n=1)	100	-	-	-	-	100
T (n=1)	-	100	-	-	-	100

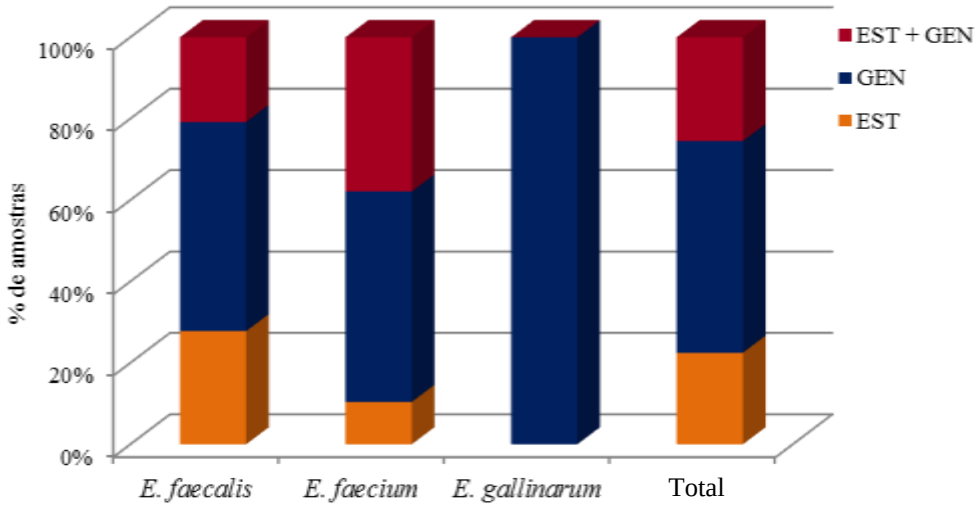
Nota:[1]Instituição hospitalar de origem; [2]MR, multirresistente; -, nenhuma amostra; para uma amostra bacteriana que apresentou 10 marcadores de resistência, não foi possível determinar a instituição de origem. para uma amostra bacteriana não foi possível determinar a instituição de origem e esta foi resistente a seis classes de antimicrobianos.

Fonte: A autora, 2017

Um total de 102 amostras de *Enterococcus* (50,2%) exibiu o fenótipo de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLAR). Destas, 72 (70,6%) pertenciam à espécie *E. faecalis*, 29 (28,4%) a *E. faecium* e uma (1,0%) a *E. gallinarum*. Os fenótipos identificados corresponderam à resistência a níveis elevados somente para estreptomicina (22,5%; 23/102), para gentamicina (52,0%; 53/102) e para ambos os antimicrobianos de maneira concomitante (25,5%; 26/102). Em relação à distribuição por espécie, a taxa de resistência a níveis elevados a gentamicina foi a que apresentou percentuais mais elevados (51,4%, 51,7% e 100% para *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. gallinarum*, respectivamente). *E. faecium* demonstrou taxa de resistência concomitante a níveis elevados de ambos os antimicrobianos mais elevada do que

E. faecalis (37,9% e 20,8%, respectivamente). Por outro lado, o inverso foi observado em relação à HLAR apenas para estreptomicina (*E. faecalis*, 27,8%; *E. faecium*, 10,4%). A distribuição dos fenótipos identificados pelas espécies correspondentes está representada na FIGURA 7.

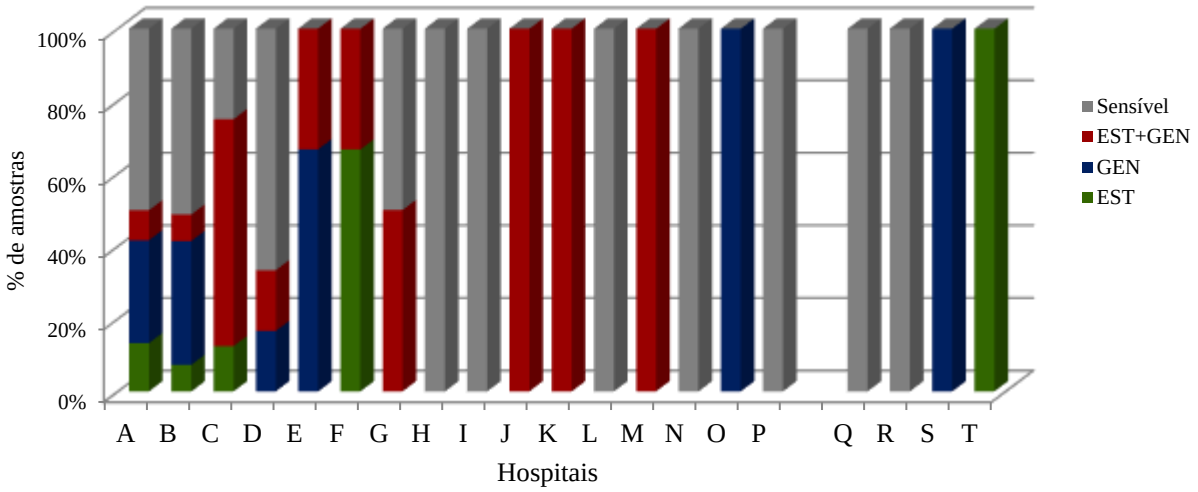
Figura 7 – Distribuição das taxas de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLAR)[1] nas espécies de *Enterococcus* identificadas neste estudo.



Nota:[1]Determinadas pelos resultados obtidos nos testes de difusão em ágar (disco difusão) utilizando-se discos contendo concentrações elevadas de gentamicina (120 µg) ou estreptomicina (300 µg); HLAR: EST, apenas para estreptomicina; GEN, apenas para gentamicina; EST + GEN, concomitante a ambos antimicrobianos.
Fonte: A autora, 2017

As taxas de HLAR foram, também, avaliadas quanto a sua frequência em relação às instituições hospitalares de origem e ano de isolamento. Dos hospitais A e B, localizados no Rio de Janeiro e responsáveis pelo maior número de amostras dentre as incluídas neste estudo, foram identificados todos os três fenótipos HLAR, sendo a resistência a níveis elevados apenas de gentamicina o mais frequente (A- 28,3%, 34/120; B- 34,1%, 14/41). Foi também identificado que o fenótipo de resistência concomitante a níveis elevados de ambos aminoglicosídeos se mostrou uma característica bem distribuída pelas instituições hospitalares do estado do Rio de Janeiro (presente em 10 dos 16 hospitais), não tendo sido encontrada dentre as amostras obtidas do Rio Grande do Norte (FIGURA 8). A amostra que não foi possível identificar a instituição de origem não apresentou fenótipo HLAR.

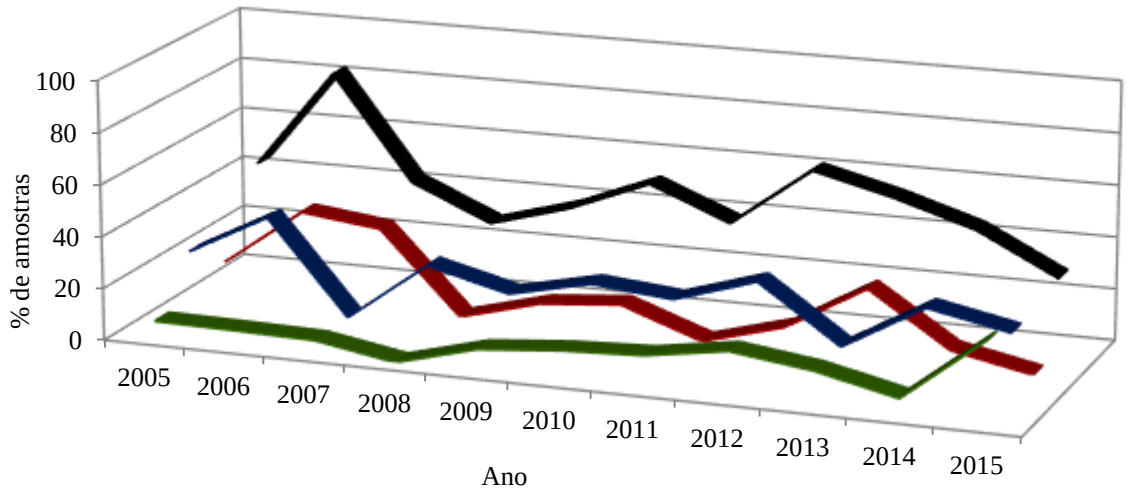
Figura 8 – Distribuição dos fenótipos de resistência aos aminoglicosídeos (gentamicina, GEN; estreptomicina, EST; ou a ambos, GEN+EST), em relação à Instituição Hospitalar de origem.



Hospitais: de A a P, localizados no Estado do Rio de Janeiro; Q a T, localizados no Estado do Rio Grande do Norte; Sensível, não portadora deste fenótipo
Fonte: A autora, 2017.

Considerando-se apenas as amostras isoladas no estado do Rio de Janeiro, que compõem a ampla maioria das amostras incluídas neste estudo, foi observado que, a frequência de amostras portadoras de HLAR variou bastante durante o período avaliado. Entretanto, no geral pode-se sugerir que foi um aumento da frequência de amostras portadoras de resistência a níveis elevados apenas de estreptomicina. Já em relação ao fenótipo de resistência a níveis elevados apenas de gentamicina, a frequência parece se manter relativamente estável e em valores superiores a 20%, durante o período avaliado. Com exceção dos anos 2007 e 2013, quando é possível observar uma redução da frequência desta característica na amostragem estudada (5,3% e 13,3%, respectivamente). Por outro lado, as taxas de resistência a níveis elevados de ambos aminoglicosídeos concomitantemente foram bastante variáveis ao longo do período (FIGURA 9).

Figura 9 – Distribuição das amostras de *Enterococcus* portadoras do fenótipo HLAR[1] isoladas no estado do Rio de Janeiro por ano de estudo.



	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
EST	6,3	5,9	5,3	0	8,3	11,1	12,5	17,4	13,3	6,3	31,2
GEN	25	41,2	5,3	28,6	20,8	27,8	25	34,8	13,3	31,2	25
EST+GEN	12,5	35,3	31,6	0	8,3	11,1	0	8,7	26,6	6,3	0
Total	43,8	82,4	42,1	28,6	37,5	50	37,5	60,9	53,3	43,8	28,1

Legenda:[1]Resistência à níveis elevados de aminoglicosídeos (high-level aminoglycoside resistance). EST, HLAR apenas para estreptomicina; GEN, apenas para gentamicina; e EST+GEN, para ambos os antimicrobianos. Frequência estimada considerando-se as amostras não susceptíveis (reunião das taxas correspondentes as categoria intermediária e resistente) determinadas em razão do total de amostras por ano de estudo.
Fonte: : A autora, 2017.

As amostras não susceptíveis à vancomicina – VRE (n=40; sendo oito *E. faecalis* e 32 *E. faecium*) apresentaram fenótipos variados de resistência aos glicopeptídeos. O fenótipo VanA, associado à resistência a ambos glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina), foi observado em 29 amostras (72,5%). Destas, 27 eram pertencentes à espécie *E. faecium* e duas *E. faecalis*. Nas demais amostras (n=11), os resultados para teicoplanina demonstraram tamanhos de halos compatíveis com as categorias de susceptibilidade intermediária (n=5; quatro amostras de *E. faecium* e uma *E. faecalis*) e sensível (n=6, uma amostra de *E. faecium* e cinco *E. faecalis*). Estes resultados sugeriam tratar-se dos fenótipos VanB ou VanD.

Entretanto, todas as amostras que apresentaram resistência à vancomicina, nos testes de disco difusão foram portadoras do gene *vanA*, conforme identificado por metodologia de PCR. Assim, os resultados incongruentes entre fenótipo e genótipo nesta amostragem foram

equivalentes a 27,5% (11/40) do total de amostras resistentes à vancomicina; ou 5,4% (11/203) do total de *Enterococcus* isolados de hemoculturas e avaliados neste estudo.

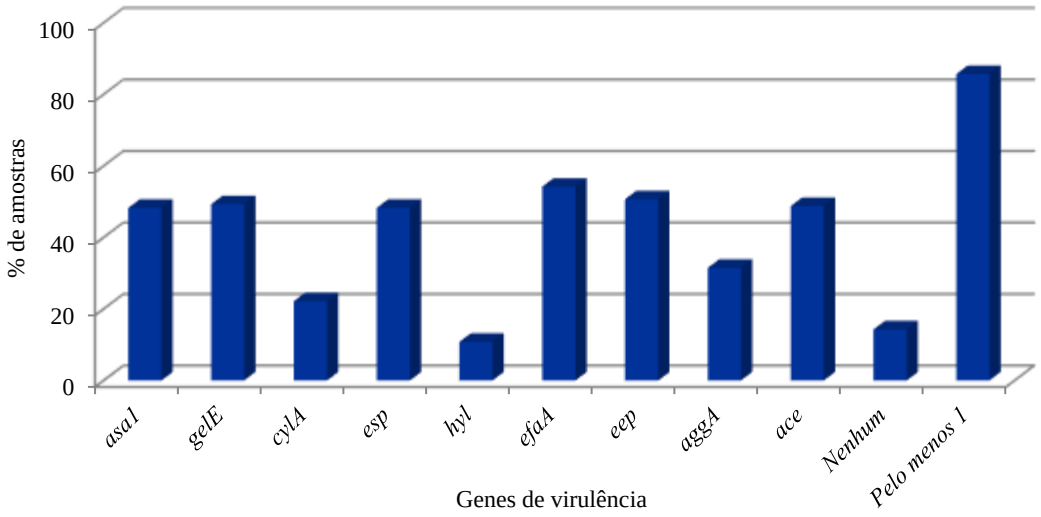
Cabe ressaltar que, em relação às espécies, das oito amostras de *E. faecalis* resistentes à vancomicina, seis (75%) apresentaram incongruência entre fenótipo e genótipo. Enquanto que, dentre as 32 amostras de *E. faecium* resistentes à vancomicina a taxa de incongruência foi de 15,2% (n=5).

As amostras resistentes à vancomicina e portadoras do genótipo *vanA* foram obtidas de 12 instituições hospitalares localizadas no estado do Rio de Janeiro. Além destas, uma amostra que não foi possível estabelecer à instituição de origem, também foi portadora do genótipo *vanA*. Por outro lado, não foram identificadas amostras portadoras de *vanA* dentre aquelas obtidas das instituições H (n=2), I (n=2), K (n=1) e N (n=1), localizadas no Rio de Janeiro. Nenhuma amostra isolada do estado do Rio Grande do Norte foi resistente aos glicopeptídeos. Amostras VRE foram isoladas ao longo do período em estudo, excetuando-se os anos 2011 e 2015.

Das 40 amostras VRE, 23 (57,5%; 23/40) também apresentaram características de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos. Seis destas pertenceram à espécie *E. faecalis* e 17 a *E. faecium*. Das seis amostras de *E. faecalis* VRE que apresentaram características de HLAR concomitantemente, uma foi resistente apenas a níveis elevados de estreptomicina, duas a gentamicina e três a ambos aminoglicosídeos. Em relação a *E. faecium* VRE, 17 amostras foram resistentes a níveis elevados de gentamicina e 10 a ambos aminoglicosídeos. Nenhuma amostra *E. faecium* VRE apresentou HLAR apenas para estreptomicina.

A presença dos determinantes genéticos *asa1*, *cylA*, *esp*, *hyl*, *gelE*, *ace*, *efaA*, *aggA*, e *epp*, associados à virulência de *Enterococcus*, foi avaliada por metodologia da PCR multiplex. Os resultados demonstraram que em 85,7% (174/203) das amostras foi detectado produto de amplificação para pelo menos um dos genes pesquisados. Os maiores percentuais foram relacionados aos genes *efa* (54,2%; 110/203), seguido de *eep* (50,7%; 103/203). Entretanto, para 14,3% das amostras (29/203) não foi detectado nenhum produto de amplificação referente aos genes pesquisados. A FIGURA 10 apresenta a frequência obtida para cada um destes genes na amostragem avaliada.

Figura 10 – Frequência de marcadores de virulência em amostras de *Enterococcus* isoladas de hemoculturas.



Fonte: A autora, 2017.

Considerando-se a relação entre a presença destes determinantes e as espécies de *Enterococcus*, foi observado que a quase totalidade das amostras de *E. faecalis* (97,8%; 137/140) e um elevado percentual de *E. faecium* (62,5%; 35/56) apresentaram pelo menos um dos genes avaliados.

Amostras de *Enterococcus* albergando determinantes de virulência foram identificadas em praticamente todas as instituições hospitalares avaliadas e nos dois estados (Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte). Apenas as amostras obtidas das instituições I (duas amostras) e L (uma amostra) não apresentaram produtos de amplificação para os genes de virulência analisados.

Dentre as amostras de *E. faecalis*, os genes *efaA* e *eep* foram os prevalentes sendo detectados em 75,7% e 71,4% das amostras, respectivamente. Em relação a *E. faecium*, a maior prevalência foi relacionada a *esp*, que foi identificada em 51,8% das amostras. Para as demais espécies, identificadas neste estudo, os resultados da PCR revelaram que: a amostra de *E. durans* foi portadora dos genes *asa1*, *cylA* e *esp*; uma amostra de *E. gallinarum* apresentou produto de amplificação para *esp* e *hyl*. Enquanto que, as demais três amostras de *E. gallinarum* foram negativas para todos os genes avaliados, assim como *E. avium* e *E. raffinosus*. A TABELA 8 apresenta a frequência dos determinantes de virulência para cada uma das espécies de *Enterococcus*.

Ainda em relação aos resultados apresentados na TABELA 8, pode-se ressaltar que a prevalência *asa1*, *gelE*, *cylA efaA*, *eep*, *aggA* e *ace* foi superior em amostras de *E. faecalis* se comparado à *E. faecium*. Por outro lado, a frequência de *hyl* foi maior em *E. faecium*. Além disso, também foi possível observar que, um percentual ligeiramente maior de amostras de *E. faecium*, do que de *E. faecalis*, apresentou o gene *esp*.

Tabela 8 – Distribuição dos marcadores de virulência por espécie de *Enterococcus*.

Espécie	Marcador de virulência / % de amostras[1]									
	asa1	*gelE*	*cylA*	*esp*	*hyl*	*efaA*	*eep*	*aggA*	*ace*	Nenhum
E. faecalis	67,1	68,6	30,0	47,9	1,4	75,7	71,4	44,3	68,6	2,1
E. faecium	5,4	7,1	3,6	51,8	33,9	7,1	5,4	3,6	5,4	37,5
E. gallinarum	-	-	-	25,0	25,0	-	-	-	-	75,0
E. avium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
E. durans	100	-	100	100	-	-	-	-	-	-
E. raffinosus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100

Nota:[1]Percentuais calculados em relação ao número total de amostras de cada espécie); -, nenhuma amostra.
Fonte: A autora, 2017.

A presença concomitante de cinco genes de virulência foi a mais frequente (17,9%; 25/140) dentre as amostras de *E. faecalis* positivas nas reações de PCR para esses marcadores. Cabe ressaltar que a maioria das amostras desta espécie apresentou de forma concomitante de cinco a nove genes (59,3%; 83/140). Nas amostras de *E. faecium*, 37,5% (21/56) não apresentaram produtos de amplificação para os genes avaliados. A presença concomitante de dois determinantes foi a apresentação prevalente (30,3%; 17/40) foi a apresentação mais frequente considerando-se a presença desses genes. A maioria das amostras de *E. faecium* apresentou um ou nenhum marcador de virulência (14 e 21, respectivamente; 62,5%; 35/56).

A TABELA 9 apresenta a distribuição das amostras por espécie de acordo com o número de determinantes de virulência.

Tabela 9 – Distribuição do número de determinantes de virulência por espécie de *Enterococcus* em amostras isoladas de hemoculturas.

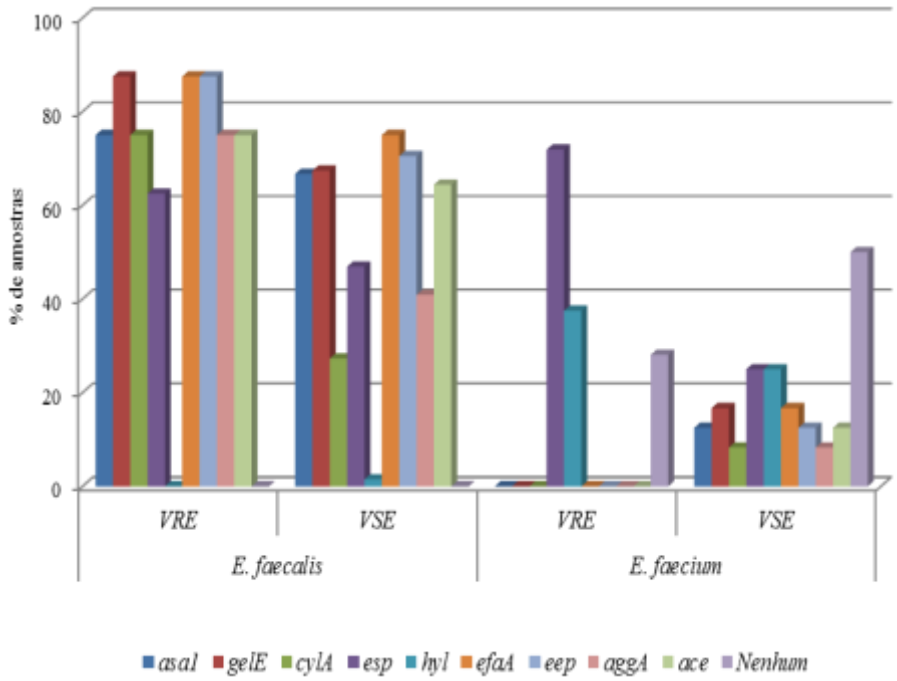
Espécies	Número de determinantes de virulência / % de amostras[1]									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
E. faecalis	2,1	9,3	7,9	10,0	11,4	17,9	17,1	12,9	10,7	0,7
E. faecium	37,5	25,0	30,3	1,8	-	3,6	-	-	1,8	-
E. gallinarum	75,0	-	25,0	-	-	-	-	-	-	-
E. durans	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-
E. avium	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. raffinosus	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	14,3	13,3	14,8	7,4	7,9	13,3	11,8	8,9	7,9	0,5

Nota:[1]Percentuais calculados em relação ao número total de amostras de cada espécie); -, nenhuma amostra.
Fonte: A autora, 2017.

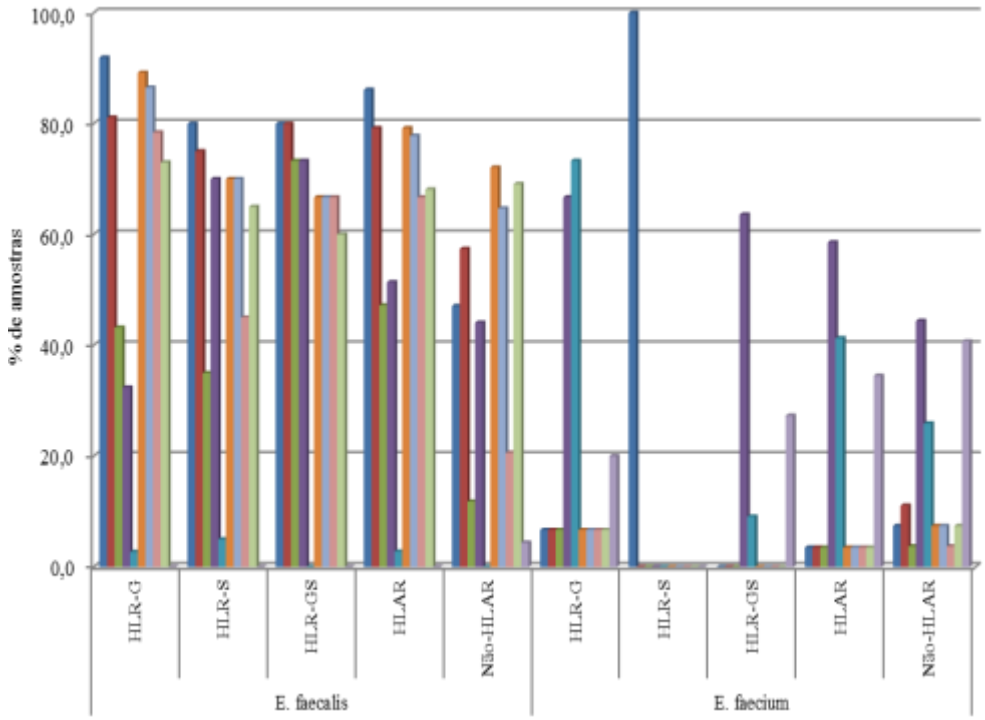
Foi avaliada a correlação entre as amostras não susceptíveis à vancomicina ou a níveis elevados de aminoglicosídeos e a presença de determinantes de virulência *versus* amostras sensíveis, considerando-se as espécies prevalentes, *E. faecalis* e *E. faecium*. Comparando-se a distribuição dos determinantes de virulência em relação a presença de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos foi observado que, em relação à *E. faecalis*, as amostras resistentes à vancomicina apresentaram em maior frequência todos os determinantes de virulência avaliados. Entretanto, qualitativamente, os perfis foram semelhantes. Por outro lado, em relação à espécie *E. faecium* as amostras não susceptíveis à vancomicina se destacaram por apresentarem somente os genes *esp* e *hyl* e em um percentual superior as sensíveis. Metade (50,0%) das amostras de *E. faecium* sensíveis à vancomicina não apresentou produtos de amplificação para os genes avaliados. Já em relação a presença de HLAR foi observado que *hylA* associado a espécie *E. faecium* foi prevalente entre amostras resistentes à gentamicina. Os demais determinantes de virulência não pareceram ter uma relação direta com mecanismos de resistência, pois se mostraram distribuídos independente dessa característica (FIGURA 11).

Figura 11 – Associação entre a presença de determinantes de virulência e a presença de HLAR[1] (**A**) e a susceptibilidade à vancomicina (**B**) em amostras de *Enterococcus* isoladas de hemoculturas.

A.



B.



Legenda: VRE, Amostras resistentes à vancomicina; VSE, amostras sensíveis à vancomicina; HLRA, resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos para: HLR-G, gentamicina; HLR-S, estreptomicina; HLR-GS,gentamicina e estreptomicina concomitantemente.

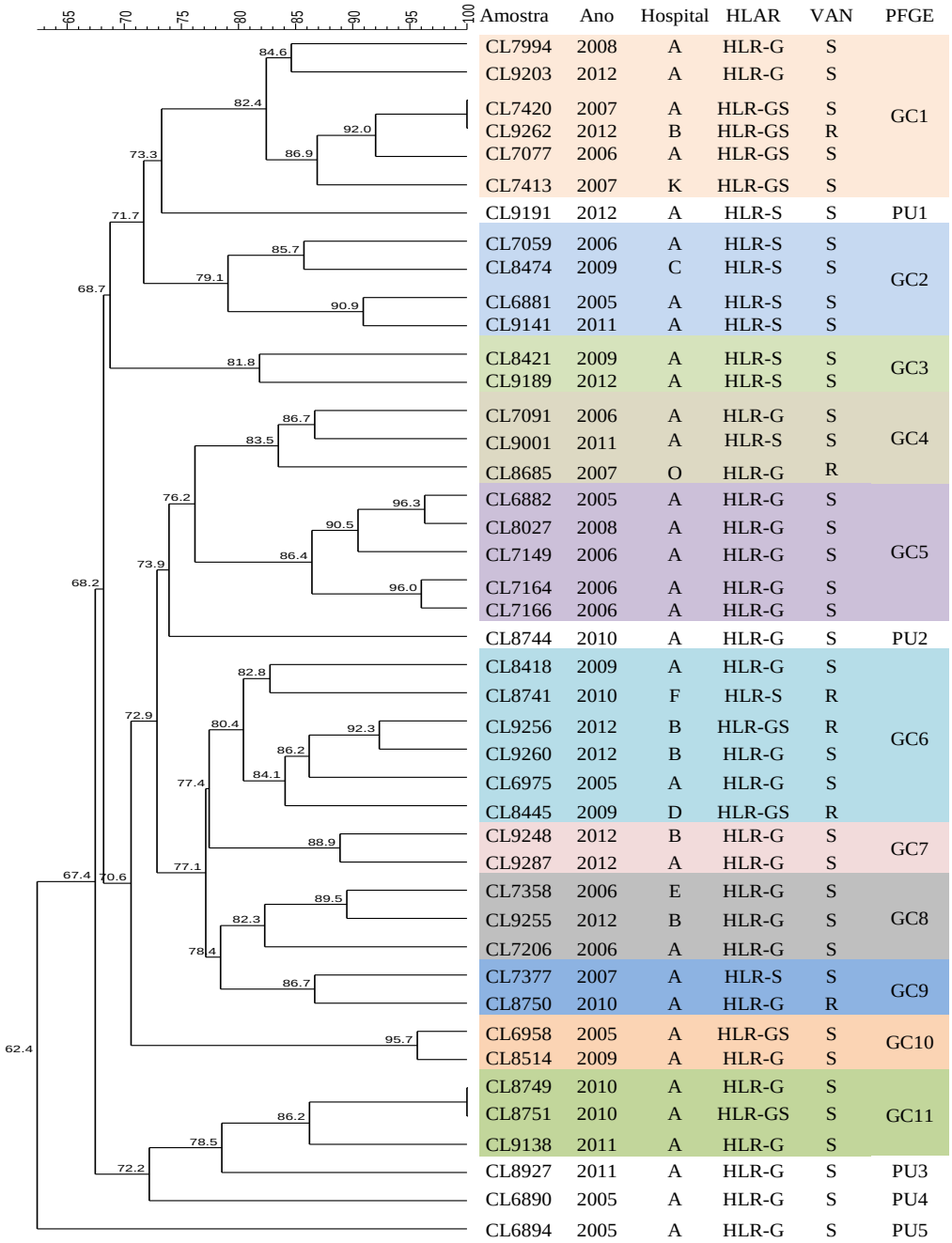
Fonte: : A autora, 2017.

Para análise da diversidade de *E. faecalis* e de *E. faecium* foram selecionadas 43 e 16 amostras, respectivamente, que foram avaliadas por metodologia de PFGE. Foram considerados perfis eletroforéticos como padrões de bandas apresentando qualquer diferença entre duas ou mais amostras e grupos clonais como arranjos de dois ou mais perfis agrupados com similaridade ≥79%. Os arranjos foram estabelecidos pelo emprego do coeficiente de Dice e construção de dendrogramas utilizando o algoritmo UPGMA, calculados e analisados com auxilio do software BioNumerics.

Os resultados obtidos com as 43 amostras de *E. faecalis* identificaram 41 perfis eletroforéticos, que foram reunidos em 12 grupos clonais (nomeados de $GC1_{faelis}$ a $GC\ 12_{faelis}$), além de seis perfis únicos (nomeados de $PU1_{faelis}$ a $PU6_{faelis}$). Todas as amostras selecionadas para análise por PFGE apresentaram HLAR. Pode-se notar que alguns grupos clonais apresentaram amostras exibindo diferentes categorias de HLAR. Entretanto, $GC1_{faelis}$, $GC5_{faelis}$, $GC7_{faelis}$, $GC8_{faelis}$, $GC10_{faelis}$ e $GC11_{faelis}$ reuniram amostras apresentando resistência à níveis elevados de gentamicina (HLR-G), isoladamente ou concomitante à resistência a níveis elevados de estreptomicina (HLR-GS). Por outro lado, $GC2_{faelis}$ e $GC3_{faelis}$ agruparam amostras apresentando apenas HLR-S. As seis amostras resistentes à vancomicina incluídas nas análises por PFGE foram distribuídas em três grupos clonais, sendo que $GC6_{faelis}$ agrupou 50% (3/6) destas. Em vários grupos clonais foram reunidas amostras provenientes de diferentes instituições hospitalares, sugerindo ampla disseminação interhospitalar dessas amostras. Da mesma forma, amostras isoladas em anos distintos foram agrupadas em um mesmo GC (FIGURA 12).

As 16 amostras de *E. faecium* foram reunidas em quatro grupos clonais ($G1_{fcium}$ a $G4_{fcium}$), além de três perfis únicos ($PU1_{fcium}$ a $PU3_{fcium}$). A maioria das amostras selecionadas apresentaram resistência a níveis elevados de gentamicina (HLR-G ou HLR-GS). Entretanto, foi observado que as amostras apresentando características distintas de HLAR foram reunidas em grupos diferentes. Cinco dentre as seis amostras VRE incluídas nesta análise foram reunidas em dois GCs. O $G1_{fcium}$ apresentou apenas amostras VRE isoladas no período de 2006 a 2013, de quatro diferentes insitutições hospitalares. A FIGURA 13 apresenta o dendrograma representativo dos resultados obtidos por PFGE com as amostras de *E. faecium*.

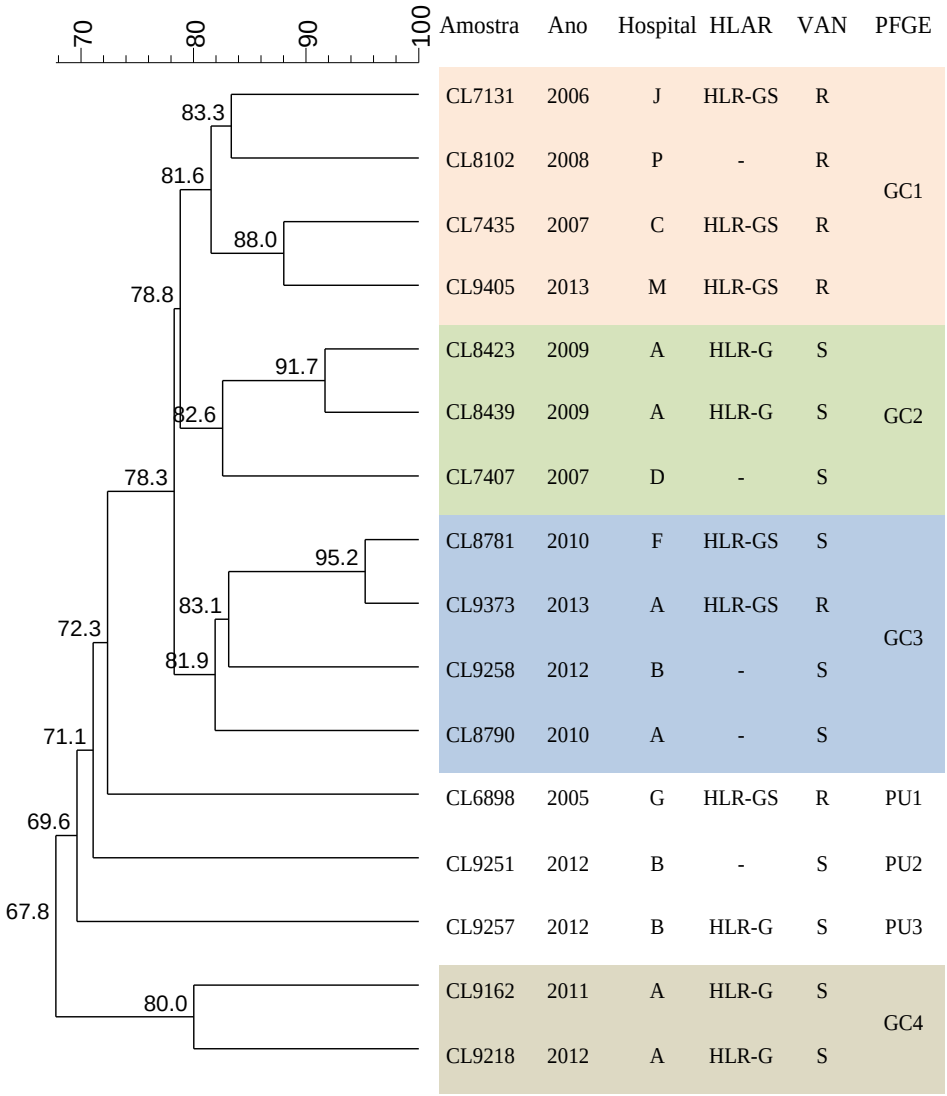
Figura 12 – Dendrograma representativo do relacionamento genético de 43 amostras de *E. faecalis* isoladas de hemoculturas, considerando características de resistência à níveis elevados de aminoglicosídeos e à vancomicina e instituição hospitalar de origem.



Nota: Dendrograma construído com auxílio do software BioNumerics v. 7.6 (Applied Math), utilizando-se o coeficiente de Dice para a construção das matrizes de similaridade e o algoritmo UPGMA para definição das relações e formação dos grupos, que foram definidos considerando-se a similaridade de ≥ 79%.

Fonte: A autora, 2017.

Figura 13 – Dendrograma representativo do relacionamento genético de 16 amostras de *E. faecium* isoladas de hemoculturas, considerando características de resistência à níveis elevados de aminoglicosídeos e à vancomicina e instituição hospitalar de origem.



Nota: Dendrograma construído com auxílio do software BioNumerics v. 7.6 (Applied Math), utilizando-se o coeficiente de Dice para a construção das matrizes de similaridade e o algoritmo UPGMA para definição das relações e formação dos grupos, que foram definidos considerando-se a similaridade de ≥ 79%.

Fonte: A autora, 2017.

4. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas os *Enterococcus* emergiram como importantes patógenos nosocomiais. Atualmente, esses microrganismos são considerados como importantes agentes de infecções de trato urinário, bem como de quadros clínicos mais graves como bacteremias acompanhadas ou não de endocardites. O amplo interesse no estudo dos *Enterococcus* pode ser interpretado como consequência do aumento desses microrganismos no cenário das infecções humanas, particularmente àquelas relacionadas aos cuidados em saúde. As bacteremias causadas por esse gênero de bactérias são caracterizadas como infecções de gravidade elevada, particularmente diante das falhas terapêuticas decorrentes da multirresistência, comumente associada a esses microrganismos. Dessa forma, neste estudo consideramos a relevância em aplicar diferentes metodologias para avaliar perfis de virulência e de resistência de amostras de *Enterococcus* oriundas de corrente sanguínea (DAHLEN *et al*., 2012; FISHER & PHILLIPS *et al*., 2009; LINDENSTRAU *et al*., 2011; SHARIFI *et al*., 2012).

Neste estudo foram avaliadas 203 amostras pertencentes ao gênero *Enterococcus* e isoladas de hemoculturas de pacientes atendidos em diferentes instituições hospitalares em dois estados brasileiros (Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte), no período de 10 anos (de 2005 a 2015). Também, foi avaliada a susceptibilidade dessas amostras a 15 antimicrobianos por metodologia de disco difusão, a fim de se identificar o perfil de susceptibilidade, bem como a presença de genes que conferem resistência à vancomicina. Adicionalmente, foi avaliado o perfil de virulência dessas amostras, através da investigação por PCR da presença de determinantes genéticos associados a essa característica, além da diversidade genética determinada pelo emprego da metodologia de PFGE.

Para a identificação das amostras bacterianas foi utilizada a técnica de MALDI-TOF. Essa técnica permite a identificação de diversas espécies bacterianas, baseando-se na análise do padrão de espectros de massa de peptídeos, principalmente relacionados a proteínas do ribossomo. Nos últimos anos, o MALDI-TOF tem sido cada vez mais aplicado e utilizado para identificar espécies bacterianas clinicamente relevantes, sendo atualmente referendado como um método de diagnóstico rápido e eficaz. Diversos estudos têm confirmado a excelente congruência entre MALDI-TOF MS e esquemas de identificação clássica (BENAGLI *et al*., 2011; CHRIST *et al*., 2017; HOLLAND *et al*., 1996; KRISHNAMURTHY *et al*., 1996; WERNER *et al*., 2012)

Neste estudo, a maioria das amostras avaliadas foi identificada como pertencente à espécie *E. faecalis,* seguida de *E. faecium*. Esses dados são compatíveis com os de outros estudos realizados em períodos distintos e em diferentes regiões geográficas, que destacaram essas espécies como prevalentes (FERNANDES; DHANASHREE, 2013; JIA; LI, WANG, 2014; NARAYANASWAMY *et al*., 2011). De fato, até o final da década de 1980, praticamente todas as infecções enterocócicas eram causadas por *E. faecalis*, no entanto, a partir da década de 1990, infecções de origem hospitalar causadas por *E. faecium* tornaram-se mais frequentes. Atualmente essa espécie é responsável por cerca de 40% de todas as infecções enterocócicas que são causadas durante a internação (ZHANG *et al*., 2012).

Higuita e Huycke (2014) sugeriram que a predominância de *E. faecalis* como principal agente etiológico das infecções causadas por enterococos poderia estar relacionada ao seu maior potencial de virulência, enquanto que a maior resistência aos antimicrobianos observada em amostras de *E. faecium*, seria responsável pelo seu envolvimento em quadros clínicos mais graves e associados a surtos epidêmicos.

Amostras pertencentes às espécies *E. avium*, *E. durans*, *E. gallinarum* e *E. raffinosus* também foram identificadas nesse estudo, apesar de em menor frequência. A presença dessas espécies como agentes de bacteremias e de outras infecções em humanos já foi descrita por outros autores (BILLINGTON *et al*., 2014; GORDON et al, 1992; MASTROIANNI, 2009; MOELLERING, 1992; TAN *et al*., 2010). Porém, a presença dessas espécies em material clínico humano, ainda é pouco documentada, particularmente pelas dificuldades inerentes a caracterização das espécies de *Enterococcus*, que normalmente exige esquemas convencionais laboriosos, ou que não é satisfatoriamente contemplada pelos de métodos automatizados ou semi-automatizados mais usuais em laboratórios de rotina diagnóstica. Considera-se, portanto, a necessidade de contínua atualização dos profissionais atuantes em laboratórios de microbiologia de rotina, quanto ao reconhecimento e valorização do isolamento de espécies de *Enterococcus* não-*faecalis* e não-*faecium* a partir de material clínico humano, com destaque para sangue, cuja eventual atribuição à mera contaminação deve sempre ser investigada.

Além disso, essas espécies, ditas *Enterococcus* não-*faecalis* e não-*faecium*, são aptos a adquirir e transferir elementos que conferem resistência aos antimicrobianos (DANIEL *et al*., 2015; HAYES *et al*., 2003; MIKALSEN *et al*., 2015; PALMER *et al*., 2010). Em nosso estudo, a maioria dessas espécies foi não susceptível a tetraciclina, e amostras pertencentes às espécies *E. gallinarum* e *E. raffinosus* exibiram perfis de multirresistência (resistência a três ou mais classes de antimicrobianos).

Estudos de vigilância epidemiológica têm ressaltado a evolução no padrão de resistência aos antimicrobianos de *Enterococcus* ao longo dos anos. Neste estudo, os resultados revelaram um elevado percentual de amostras multirresistentes. Foi avaliado o perfil de susceptibilidade das amostras isoladas de hemocultura, frente a 15 antimicrobianos. Os maiores percentuais de não susceptibilidade foram observados para ciprofloxacina, eritromicina, levofloxacina, norfloxacina, rifampicina e tetraciclina. Nossos dados estão de acordo com outros dados divulgados na literatura recente (HOLLENBECK; RICE, 2012; MILLER *et al*., 2014; WANG *et al*., 2016). Bender e colaboradores (2009) em um estudo com amostras isoladas no Rio Grande do Sul, também divulgaram percentuais semelhantes aos encontrados neste estudo, corroborando nossos achados, sugerindo que percentuais semelhantes de multirresistência para *Enterococcus* são observados em diferentes regiões brasileiras.

Com relação aos resultados obtidos nos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, pode-se destacar a considerável frequência de amostras (cerca de 30%) expressando níveis elevados de resistência aos aminoglicosídeos – HLAR. Nestes casos, dentre os mecanismos conhecidos, a modificação do antimicrobiano por ação enzimática é o mais frequente no cenário clínico (PADMASINI *et al*., 2014; RAMIREZ; TOLMASKY, 2010). Este fato está diretamente relacionado à habilidade desses microrganismos atuarem em eventos de transferência horizontal de elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons, que é favorecida pela pressão seletiva exercida pelo o uso de antimicrobianos. (ARIAS; MURRAY, 2012; LI *et al*., 2015; MILLER *et al*., 2014). Com relação às amostras isoladas de hemoculturas neste estudo, foram identificados os três fenótipos mais frequentes de HLAR, como resistência a níveis elevados apenas de gentamicina (HLR-G), apenas estreptomicina (HLR-S) ou a ambos aminoglicosídeos concomitantemente (HLR-GS)

Entretanto, neste estudo, o fenótipo prevalente correspondeu à resistência a níveis elevados de gentamicina. Esta característica, decorrente da ação de EMAs (enzimas modificadoras de aminoglicosídeos), confere resistência concomitante a diversos outros antimicrobianos desta classe, como tobramicina, netilmicina, amicacina e canamicina (PALAVENCINO *et al*., 2001; KAÇMAZ; AKSOY, 2005; ZARRILLI *et al*., 2005). Adicionalmente, a resistência a níveis elevados de estreptomicina pode também estar relacionado à presença de EMAs, ou ser decorrente de alteração no sítio alvo no ribossoma (CETINKAYA *et al*., 2000).

Antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos são clinicamente importantes no tratamento das infecções enterocócicas graves; particularmente, devido ao seu efeito sinérgico

e bactericida em combinação com inibidores da síntese da parede celular tais como, beta-lactâmicos e glicopeptídeos. O fenótipo HLAR elimina essa alternativa sinérgica com beta-lactâmicos, que por décadas é considerada de escolha no tratamento das enterococcias de maior gravidade, como bacteremias e endocardites (ARIAS; MURRAY, 2012; HOLLENBECK; RICE, 2012; CATTOIR; GIARD, 2014).

Além disso, a taxa de amostras não susceptíveis à penicilina foi muito expressiva entre as amostras de *E. faecium*. Os valores percentuais de amostras resistentes à penicilina nas amostras desta espécie foram muitos superiores aos de *E. faecalis*. Essa variação é comum e já foi relatada em outros estudos. A expressão de resistência à penicilina é um reflexo da presença de mutações pontuais no gene que codifica a PBP5, reduzindo a afinidade desta proteína pelo antimicrobiano (JUREEN *et al*., 2004; RICE *et al*., 2009; GALLOWAY-PENA *et al*., 2011). A resistência à penicilina em enterococos pode ser também decorrente da expressão de beta-lactamases. Entretanto, esta característica foi identificada apenas em raros episódios descritos na literatura e em amostras de *E. faecalis* (RUIZ-GARBAJOSA *et al*., 2006; MCBRIDE *et al*., 2007). Em nosso estudo, não foi testada a presença dessa enzima nas amostras não suscept[iveis.

Considerando-se que, amostras de *E. faecium* exibem percentuais elevados de resistência à penicilina, a ampicilina passou a ser o beta-lactâmico mais utilizado no tratamento das enterococcias (MURRAY, 1998). Entretanto, em nosso estudo registramos também um elevado percentual de amostras de *E. faecium* resistentes à ampicilina. Este dado corrobora o que já havia sido relatado por outros autores que destacaram o elevado percentual de resistência à ampicilina em amostras de *E. faecium* (BROWN *et al*., 2008; CETINKAYA *et al*., 2000; MUNDY *et al*., 2000; KAÇMAZ & AKSOY, 2005; TEIXEIRA *et al*., 2007).

A emergência da resistência aos glicopeptídeos em enterococos, no final dos anos 1980, reduziu ainda mais as possibilidades terapêuticas para as infecções graves causadas por estes microrganismos (SHEPARD; GILMORE, 2002; COURVALIN, 2006). Amostras de VRE representam um importante problema de saúde pública no mundo. A ocorrência dessas amostras em situações de maior gravidade, como as infecções da corrente sanguínea, sinaliza de antemão que poucas serão as alternativas disponíveis de tratamento e, ainda como agravante, ocorrem mais comumente entre pacientes hospitalizados e considerados de alto risco (DESHPANDE *et al*., 2007). As infecções causadas por VRE determinam significativas consequências, tanto sociais quanto econômicas. O valor estimado para o tratamento dessas infecções é dez vezes maior do que para aquelas causadas por amostras sensíveis a

vancomicina; além disso, determina um curso clínico mais grave com maior percentual de óbito (BROWN; TRACZEWSKI, *et al*., 2005; TACCONELLI; CATALDO *et al*., 2008).

Neste estudo, das 203 amostras avaliadas, 40 (sendo oito *E. faecalis* e 32 *E. faecium*) apresentaram resistência à vancomicina. O fenótipo VanA foi prevalente, responsável por 72,5% das amostras. Para o restante, a ausência de resistência plena à teicoplanina sugeriu a presença dos fenótipos VanB ou VanD. Entretanto, todas as amostras apresentaram o genótipo *vanA*, caracterizado por metodologia de PCR. Assim, foi observado que 27,5% das amostras (11/40) demonstraram incongruência entre fenótipo e genótipo. Essa discrepância entre genótipo/fenótipo pode estar relacionada a alterações no transposon Tn*1546*, elemento genético que carreia o conjunto gênico *vanA.* Dentre essas variações, a presença de elementos de sequências de inserção (IS) pode contribuir para a heterogeneidade de Tn*1546* e afetar o fenótipo VRE, acarretando erros na identificação da resistência e comprometendo o procedimento terapêutico (PARK *et al*., 2007; HENRIQUE *et al*., 2008; CHA *et al*., 2013).

As quinolonas geralmente exercem atividade moderada contra os *Enterococcus.* Essa classe de antimicrobianos atua inibindo o crescimento da bactéria e interfere na replicação do DNA, especificamente por se ligarem a topoisomerases do tipo II que controlam o super enovelamento da dupla hélice (DNA girase e DNA topoisomerase IV), inibem sua função levando a quebra da dupla fita. O mecanismos de resistência a esses antimicrobianos está mais comumente associado à ocorrência de mutações no gene *gyrA* que codifica uma DNA girase e *parC* que codifica para uma DNA topoisomerase IV (KRISTICH *et al*., 2014; ONODERA *et al*., 2002). Nossos dados estão de acordo com a literatura que relata que mecanismos de resistência adquirida, em enterococos, para quinolonas e fluoroquinolonas constituem atualmente características comuns desses microrganismos (DOROBAT *et al*., 2010; XU *et al*., 2016). A maior prevalência de amostras de enterococos resistentes certamente reflete o aumento do uso desses antimicrobianos na prática clínica nas últimas décadas (HOLLENBECK & RICE, 2012; JIA; LI, WANG, 2014; YASUFUKU *et al*., 2011).

Outros antimicrobianos para os quais foram observadas elevadas taxas de resistência entre as amostras avaliadas neste estudo foram eritromicina, tetraciclina e rifampicina. Em *Enterococcus*, a resistência a eritromicina pode se apresentar com fenótipos variados, decorrentes da expressão de uma série de marcadores genotípicos, que conferem resistência cruzada a vários antimicrobianos da família comumente designada MLS_B (que inclui macrolídeos), sendo o gene *ermB* o principal marcador existente em amostras de origem clínica (PORTILLO et al, 2000; ROBERTS et al., 1999). Não foi objetivo deste estudo a detecção dos determinantes genéticos envolvidos na resistência a eritromicicna. Entretanto,

cabe ressaltar que, para as espécies *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. gallinarum* registramos que a quase totalidade das amostras não foi susceptível a este antimicrobiano.

A tetraciclina é um antimicrobiano de amplo espectro que tem sido comumente utilizado nos últimos 60 anos para tratar infecções bacterianas. Esse antimicrobiano impede a síntese proteica pela ligação ao sítio ribossomal impedindo sua união com RNA transportador n-aminoacyl. O uso regular da tetraciclina, bem como o seu espectro de atividade exerceu uma pressão substancial para que *Enterococcus* passasse a abrigar determinantes de resistência. Essa resistência em amostras clínicas de enterococos é frequentemente associada à presença de plasmídeos e transposons conjugativos e, geralmente, segue duas estratégias: efluxo ativo do antimicrobiano e proteção do sítio ribossomal (CHOPRA; ROBERTS, 2001; FRANCIA; CLEWELL, 2002). Um estudo que buscou identificar a diversidade genética entre amostras de *E. faecalis* de coleção de culturas e isoladas nos últimos 100 anos, identificou que a resistência a tetraciclina foi a mais comum em todo período avaliado (MCBRIDE et al, 2002). De fato, nosso estudo identificou uma taxa maior de não susceptibilidade a tetracilina para a espécie *E. faecalis* (67,8%). De forma surpreendente, a resistência à tetraciclina na espécie *E. faecium* foi consideravelmente menor (26,8%). Este achado parece ser um dado particular deste estudo, pois relatos na literatura indicam sempre que percentuais elevados de resistência à tetraciclina são comumente exibidos por ambas as espécies (HOLLENBECK & RICE, 2012; ARIAS; MURRAY, 2012).

A rifampicina possui seu mecanismo de atuação através da inibição da síntese do RNA mensageiro. A resistência a esse antimicrobiano geralmente está relacionada a uma variedade de mutações no gene *rpoB* que codifica para a subunidade beta da RNA polimerase. A taxa de resistência a esse antimicrobiano é bastante generalizada, ocorrendo em 66% dos isolados de *E. faecium* nos EUA e 67,5% dos isolados na Europa. (DESHPANDE *et al*., 2007; MILLER *et al*., 2014). No presente estudo, a maioria das amostras apresentou um elevado percentual de não susceptibilidade para rifampicina, que foi mais expressivo nas amostras da espécie *E. faecium.*

Com relação ao cloranfenicol foi observado taxas moderadas de não susceptibilidade, também mais expressiva para *E. faecalis*. Apesar de o cloranfenicol apresentar uma ação bacteriostática contra *Enterococcus*, possui uma eficácia clínica relatada de 53% para tratar infecções mais graves (GOULD *et al*., 2004; LAUTENBACH *et al*., 1998). Seu mecanismo de ação envolve a inibição da tradução pela ligação à subunidade ribossomal 50 S. Vários mecanismos de resistência ao cloranfenicol em bactérias já foram descritos, o mais comum refere-se à inativação enzimática por acetilação da droga via enzimas transferases (AAKRA *et*

al., 2010; SCHWARZ *et al*., 2004). Um estudo publicado em 2005 relatou o sucesso no tratamento com cloranfenicol de um quadro de meningite causado por *E. faecium* VRE (SCAPELLATO et al, 2005). Entretanto, ainda são poucos os dados disponíveis a respeito da eficácia deste antimicrobiano no tratamento das enterococcias de maior gravidade.

Por outro lado, os resultados do presente estudo apontaram um elevado percentual de amostras susceptíveis a nitrofurantoína e fosfomicina. Taxas de resistência pouco expressivas para esses antimicrobianos têm sido relatadas, em acordo com o observado neste estudo (CHAUDHRY *et al*., 2016; HORNER *et al*., 2005). Perez e colaboradores (2011) avaliando o perfil de susceptibilidade de amostras de *Enterococcus* isoladas de instituições hospitalares de Cuba, também relataram um baixo percentual de amostras resistentes à nitrofurantoína e a fosfomicina. A nitrofurantoína é um agente sintético que se mostra eficaz para o tratamento das infecções do trato urinário causadas tanto por bactérias Gram-negativas, quanto Gram-positivas (RAFII & HANSEN, 1998). Em geral, taxas elevadas de susceptibilidade a este antimicrobiano são relatadas com frequência. (CETTI *et al.*, 2008; KARPMAN; KURZROCK, 2004; ZHANEL *et al.*, 2001).

A fosfomicina também tem se mostrado uma alternativa útil no tratamento de infecções não complicadas do trato urinário inferior, causadas por *Enterococcus* (PANESSO *et al.*, 2002). Embora a fosfomicina possua como característica uma alta taxa de emergência de resistência *in vitro*, a taxa de resistência *in vivo* permanece baixa (FALAGAS *et al.*, 2009; MICHALOPOULOS *et al.*, 2011).

Mesmo assim, neste estudo identificamos um elevado percentual de amostras exibindo característica de multirresistência aos antimicrobianos (resistência a mais de três classes de antimicrobianos). Dessa forma, ressaltamos a urgência para conformação de novos agentes antimicrobianos dedicados ao tratamento das infecções causadas por amostras de *Enterococcus* multirresistentes. Atualmente, as opções disponíveis permanecem limitadas e são baseadas principalmente na linezolida (uma oxazolidinona sintética), tigeciclina (uma glicil clina análoga à minociclina) e a associação quinupristina-dalfopristina (uma combinação de estreptograminas B e A). Entretanto, amostras de *Enterococcus* resistentes a um ou mais destes antimicrobianos vêm sendo relatadas em crescente frequência (AGER; GOULD, 2012; AKSOY; UNAI, 2008; BERSOS *et al.*, 2004; BONORA *et al.*, 2006; CORDINA *et al.*, 2012; GONZALEZ *et al.*, 2001; HERSHBERGER *et al.*, 2004; ISOGAI *et al.*, 2013; KARANIKA *et al.*, 2008; LUTHER *et al.*, 2014; MEKA; GOLD, 2004; MUTSCHLER *et al.*, 2013; NAILOR; SOBEL, 2009; ROSE *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2016; WERNER *et al.*, 2008).

Este trabalho também buscou investigar a presença de determinantes genéticos associados à virulência nas amostras de enterococos isoladas de infecções da corrente sanguínea. Dessa forma, foi utilizada a metodologia de PCR em protocolos multiplex a fim de identificar a presença dos genes *asa1, gelE, cylA, esp, hyl, efa, eep, agg* e *ace*, bem como a relação da presença destes com a resistência aos antimicrobianos. De acordo com os resultados do presente trabalho, a maioria (85,7%) das amostras apresentou produto de amplificação para pelo menos um dos genes pesquisados.

É reconhecido que as amostras da espécie *E. faecalis* estão associadas a um maior potencial de virulência, sendo esse o principal agente etiológico das enterococcias (SAVA *et al.*, 2010; SHARIFI *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013). Os resultados deste estudo demonstraram que tanto as amostras pertencentes à espécie *E. faecalis*, quanto à *E. faecium* albergavam múltiplos genes de virulência, apesar da primeira apresentar frequências muito mais elevadas para maioria dos fatores investigados.

O gene *ace*, responsável pela produção de uma proteína de superfície bacteriana ligadora de colágeno e, portanto, pertencente à família MSCRAMM (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*), já foi associado a quadros de endocardite, apesar de ter sido também identificado em amostras de *E. faecalis* comensais (DUH *et al*., 2001; KOCH *et al.*, 2004). A presença de *ace* em nosso estudo foi identificada apenas nas espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, em uma frequência extremamente mais elevada na primeira (68,6% e 5,4%, respectivamente). A presença do gene *ace* em frequência elevada em amostras de *E. faecalis* está de acordo com outros estudos relatados na literatura (LYSAKOWSKA *et al.*, 2012; STRATEVA *et al.*, 2016).

A substância de agregação, codificada pelo gene *asa1* provoca a aglomeração de células de *E. faecalis* e medeia a troca eficiente de DNA entre bactérias doadoras e receptoras e é induzida por ferormônio(ARIAS; MURRAY *et al.*, 2012; BARBOSA RIBEIRO *et al.*, 2016). Ressaltamos o elevado percentual de amostras de *E. faecalis* isoladas de hemoculturas portadoras do gene *asa1*. Além deste, frequências elevadas de *eep, efaA* e *gelE* também foram observadas neste estudo. Estes dados estão de acordo com o divulgado na literatura que também aponta uma prevalência destacada destes fatores em amostras clínicas de *E. faecalis* (FLORENCE *et al.*, 1999; FRANK *et al.*, 2012; GASPAR *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2010; STRATEVA *et al.*, 2016; UDO; AL-SWEIH, 2011; UPADHYAYA *et al.*, 2009). Entretanto, neste estudo foi identificada a presença de *cylA* em frequência moderada entre as amostras de *E. faecalis*. MEDEIROS e colaboradores (2014), em um estudo também realizado em nosso país ressalta a menor frequência de *cylA*, se comparado aos demais fatores avaliados, porém

retrata a importância clínica de amostras albergando este atributo de virulência em infecções graves.

A proteína de superfície EfaA atua na adesão bacteriana aos tecidos do hospedeiro e apresenta extensa semelhança com adesinas de *Streptococcus*. Essa proteína é apontada como um antígeno comumente detectado no soro de pacientes apresentando endocardite causada enterococos (SEDGLEY *et al.*, 2005) e foi identificada em frequência elevada em nosso estudo. Nossos dados estão de acordo com um estudo recente realizado, no Irã, identificou a presença de *efaA* em todas as amostras clínicas de *E. faecalis* (HEIDARI *et al.*, 2017). Além deste, estudos anteriores já haviam declarado a elevada frequência de *efaA* em amostras de *E. faecalis* (CRETI *et al.*, 2009; EATON; GASSON, 2001). Além disso, CONSENTINO e colaboradores (2010) associaram a presença de *efaA* a um elevado percentual de resistência aos aminoglicosídeos e quinolonas. A associação entre a frequência desse determinante de virulência com o elevado percentual de resistência a esses antimicrobianos, também, foi identificada neste estudo.

SHARIFI *et al*. (2013) associaram a alta prevalência de *gelE* (90%) seguido de *asa1* (69,6%) e *ace* (75,4%) com as taxas de resistência a rifampicina e eritromicina em *E. faecalis*. De forma similar, este fato também pode ser observado entre os resultados obtidos em nosso estudo. Além destes, outros dados disponíveis na literatura relatam uma relação entre a presença de determinantes de virulência com a frequência de resistência aos antimicrobianos. Arabestani e colaboradores (2017) identificaram uma associação entre a frequência de *esp* e a resistência a ciprofloxacina, eritromicina e tetraciclina em *E. faecium*; e a resistência ao cloranfenicol em *E. faecalis*. Também, os mesmos autores correlacionaram à prevalência de *hyl* com a resistência aos glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) em *E. faecium*; e a resistência à ampicilina e ao cloranfenicol em *E. faecalis*.

Recentemente, Biswas *et al*. (2016) correlacionaram a presença de determinantes de virulência com a resistência à vancomicina. Os autores observaram uma elevada frequência de *esp* e *hyl* entre amostras de *E. faecium* VRE. Este fato também foi observado em nosso estudo, onde uma frequência considerável de amostras de *E. faecium* VRE albergaram *esp* (71,9%) e *hyl* (37,5%).

A proteína de superfície enterocócica ESP está presente na parede celular em *Enterococcus* e parece contribuir para a colonização e persistência da bactéria nas infecções. Além disso, parece estar envolvida na interação com superfícies bióticas e abióticas na formação de biofilmes, o que aumenta de maneira substancial a sobrevivência da bactéria em biopolímeros; além de estar também relacionada com a resistência a certos antimicrobianos

(CHUANG *et al*., 2009; CHUANG-SMITH *et al*., 2010; LINDENSTRAU *et al*., 2011; SCHLIEVERT *et al*., 2010).

Adicionalmente, recentes estudos moleculares e epidemiológicos identificaram a emergência de uma subpopulação de E. *faecium*, denominada complexo clonal 17 (CC17), identificada por metodologia de sequenciamento de múltiplos loci (ou MLST) que apresenta como marcador o gene *esp*. Essa subpopulação de *E. faecium* (CC17) se mostra adaptado ao ambiente hospitalar e emergiu como o resultado de um processo evolutivo de ajuste dessa espécie a esse ambiente. Diversos estudos ressaltam que a aquisição de uma ilha de patogenicidade que carreia o gene *esp* facilitou a disseminação dessas amostras que são comuns em surtos hospitalares (AKPAKA *et al*., 2017; LOPEZ *et al*., 2013; SILVA *et al*., 2013; TOP *et al*., 2008; VALDEZATE *et al*., 2009; WOODFORD *et al*., 2003).

A clonalidade das amostras de *Enterococcus* que compuseram este estudo foi determinada pelo emprego da metodologia de eletroforese em campo pulsado, PFGE. Os resultados obtidos revelaram que entre as amostras de *E. faecium*, o grupo clonal nomeado $GC1_{fcium}$ reuniu a maioria das amostras VRE incluídas nesta análise. Estas foram isoladas nos anos de 2006 a 2008 e em 2013 e foram provenientes de quatro instituições hospitalares distintas. Assim, considera-se que esses dados sugerem que esse GC esteve envolvido em disseminação inter-hospitalar. Já em relação às amostras de *E. faecalis* avaliadas por PFGE pode-se observar uma maior heterogeneidade nos GC identificados (mesmo considerando-se o maior número de amostras desta espécie avaliadas). Entretanto, amostras provenientes de instituições hospitalares distintas também foram reunidas em um mesmo GC.

A dispersão clonal de amostras de enterococos multirresistentes já foi demonstrada em diversos estudos. Sabe-se que, uma vez estabelecidos em uma unidade hospitalar, esses clones bem adaptados a esse ambiente são extremamente difíceis de serem erradicados. Em nosso estudo, consideramos a importância da identificação desses clones entre amostras obtidas de hemoculturas, considerando a gravidade das patologias associadas e a suposta origem exógena. Somam-se a isso, as características de resistência aliadas a atributos de virulência que invariavelmente estão presentes nesses grupos clonais melhor adaptados e mais competentes em causar doença, disseminação e sobrevivência. Também, a presença de determinantes de resistência para antimicrobianos que constituem classicamente o regime terapêutico de escolha nessas infecções, como a associação de um aminoglicosídeo com um agente ativo em parede celular, contribui para falha terapêutica e, portanto, maiores índices de morbidade e mortalidade nesses pacientes (CEREDA *et al*., 2002; CHAVERS *et al*., 2003; DADA *et al*., 2013; JAIN *et al*., 2011).

Assim, este estudo pretendeu contribuir com dados brasileiros que possam vir a ser utilizados como mais um suporte para o desenvolvimento de medidas de contenção da dispersão da resistência bacteriana e do controle da disseminação dessas amostras, que albergam importantes características de resistência e de virulência e se mostram capazes de determinar a etiologia de infecções graves.

CONCLUSÃO

Neste estudo foram identificadas amostras pertencentes às espécies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. durans*, *E. gallinarum* e *E. raffinosus*. Assim, fica evidente que amostras de diferentes espécies de *Enterococcus*, albergando importantes atributos de resistência aos antimicrobianos e de virulência podem determinar o desenvolvimento de infecções de maior gravidade como as associadas à corrente sanguínea.

Em ambientes hospitalares, o potencial infeccioso dos *Enterococcus* pode ser devido a vantagens seletivas conferidas pela sua resistência aos antibióticos. Este estudo encontrou uma taxa elevada de amostras resistentes a múltiplas drogas.

No entanto, não parece ser apenas o perfil de multirresistência aos antimicrobianos o responsável pelo sucesso de *Enterococcus* na etiologia das infecções da corrente sanguínea. Neste estudo, foi também identificado um elevado percentual de amostras carreando pelo menos um determinante genético de virulência.

As análises por PFGE identificaram a presença de grupos clonais associados a disseminação de resistência a elevados níveis de aminoglicosídeos e a vancomicina, estando relacionado a habilidade desses microrganismos atuarem em eventos de disseminação horizontal de elementos genéticos, como plasmídeos e transposons, favorecida pela pressão seletiva em ambientes onde ocorre uma maior utilização de antimicrobianos, como o hospitalar.

Diante do número reduzido de dados brasileiros, este estudo pretendeu agregar conhecimento a esta temática e reforça a necessidade do monitoramento sistemático dessas amostras bacterianas, passo crucial para o desenvolvimento de estratégias de controle dessas infecções.

REFERÊNCIAS

AAKRA, A. *et al*. The response of *Enterococcus faecalis* V583 to chloramphenicol treatment. *Int J Microbiol*. v.2010. 2010.

AAMODT, H. *et al.* Genetic relatedness and risk factor analysis of ampicillin-resistant and high-level gentamicin-resistant enterococci causing bloodstream infections in Tanzanian children. *BMC Infect Dis*. v.15, n.1, p. 107. 2015.

AFSHARI, A. *et al.* Bench-to-bedside review: Rapid molecular diagnostics for bloodstream infection- a new frontier? *Critical Care.* V.16, n.3, p.1186-1202. 2012.

AGER, S.; GOULD, K. Clinical update on linezolid in the treatment of gram-positive bacterial infections. *Infect Drug Resist.* v.5, n.1, p. 87-102. 2012.

AKPAKA, P. E.; KISSOON, S.; JAYARATNE, P. Molecular analysis of vancomycin-resistant enterococci isolated from regional hospitals in Trinidad and Tobago. *Adv Med*. v. 2016, p. 8762691.

AKPAKA, P. E. *et al*. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Bermuda. *PLos One.* v.12, n.3, p. e 0171317. 2017.

AKSOY, D. Y.; UNAI, S. New antimicrobial agents for the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Microbiol Infect*. v.14, n.5, p. 411-420. 2008.

ANVISA. Critérios nacionais de infecções relacionadas à assistência a saúde. 2009. Disponível em : <http://portal.anvisa.gov.br/> Acesso em: 14 de janeiro de 2017.

ANVISA. Medidas de prevenção de infecções relacionada a assistência a saúde. Módulo 4. Série: Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde. 2013. Disponível em : <http://portal.anvisa.gov.br/> Acesso em: 14 de janeiro de 2017.

ANVISA. Prevenção de infecções em unidades de terapia intensiva. Disponível em : <http://portal.anvisa.gov.br/> Acesso em: 14 de janeiro de 2017.

ARABESTANI, M. R.; NASAJ, M.; MOUSAVI, S. M. Correlation between infective factors and antibiotic resistance in *enterococci* clinical isolates in west of Iran. *Chonnam Med J.* v.53, n.1, p. 56-63. 2017.

ARAOKA, H.; KIMURA, M.; YONEYAMA, A. A surveillance of high-level gentamicin-resistant enterococcal bacteremia. *J Infect Chemother*. v.17, n.3, p. 433-434. 2011.

ARIAS, C.A. Cotransfer of antibiotic resistance genes and a *hylEfm*-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. v. 53, n. 10, p. 4240-4246. 2009.

ARIAS, C. A, CONTRERAS, G. A. MURRAY, B. E. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect.* v.16, n.6, p. 555-562. 2010.

ARIAS, C. A, *et al*. Unmet needs and prospects for oritavancin in the management of vancomycin-resistant enterococcal infections. *Clin Infect Dis.* v.54, n.3, p. 233-238. 2012.

ARIAS, C. A, MURRAY, B. E. The rise of the *enterococcus*: beyond vacomycin resistance. *Nat Rev Microbiol*. v.10, n. 4, p. 266- 278. 2012.

ARIAS, C. A. *et al.* Genetic basis for *in vivo* daptomycin resistance in enterococci. *N Engl J Med.* v.365, n.10, p. 892-900. 2011.

ASLANGUL, E. *et al*. Relationship between the level of acquired resistance to gentamicin and synergism with amoxicillin in *Enterococcus faecalis. Antimicrob Agents Chemother*. v.49, n.10, p. 4144-4148. 2005.

BALLERING, K. S. *et al.* Functional genomics of *Enterococcus faecalis*: multiple novel genetic determinants for biofilm formation in the core genome. *J Bacteriol*. v.191, n.8, p. 2806- 2814. 2009.

BALLI, E. P.; VENETIS, C. A.; MIYAKIS, S. Systematic review and meta-analysis of linezolid versus daptomycin for treatment of vancomycin-resistant enterococcal bacteremia. *Antimicrob Agents and Chemother*. v.58, n.2, p. 734-739. 2014.

BARBER, K. E. *et al*. Therapeutic options for vancomycin- resistant enterococcal bacteremia. *Expert Rev Anti Infect Ther.* v.13, n.3, p. 363-377. 2015.

BARBOSA- RIBEIRO, M. *et al.* Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of *Enterococcus faecalis* Isolates from teeth with failure of the endodontic treatment. *J Endod.* v.42, n.7, p. 1022-1028. 2016.

BARON, E. J. *et al.* A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clin Infect Dis*. v.57, n.4, p. 22-121. 2013.

BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*. v.27, n.4, p. 870-926. 2014.

BENAGLI, C. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS One*. v.6, n.1, p. e16424.

BENDER, E. A. *et al.* Identification, antimicrobial resistance and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated in Porto Alegre, Brazil. *Braz J Microbiol*. v.40, n.3, p. 693-700. 2009.

BERSOS, Z. *et al.* First report of a linezolid-resistant vancomycin resistant *Enterococcus faecium* strain in Greece. *J Antimicrob Chemother*. v.53, n.4, p. 685-686. 2004.

BILLINGTON, E. O. *et al*. Incidence, risk factors, and outcomes for *Enterococcus* spp. Blood stream infections: a population-based study. *Int J Infect Dis*. v. 26, p. 76-82. 2014

BISWAS, P. P. *et al.* Molecular characterization of virulence genes in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive enterococci. *J Global Infect Dis*. v.8, n.1, p. 16. 2016.

BONORA, M. G. *et al.* Emergence of linezolid resistance in the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* multilocus sequence typing C1 epidemic lineage. *J Clin Microbiol*. v.44, n.3, p. 1153-1155. 2006.

BOUZA, E.; FINCH, R. Infections caused by gram-positive bacteria: Situation and challenges of treatment. *Clin Microbiol Infect*. v.7, n. 4. 2001.

BRITT, N. S. *et al.* Comparison of the effectiveness and safety of linezolid and daptomycin in vancomycin- resistant enterococcal bloodstream infection: A national cohort study of veterans affairs patients. *Clin Infect Dis*. v.61, n.6, p. 871-878. 2015.

BRODRICK, H. J. *et al*. Whole-genome sequencing reveals transmission of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a healthcare network. *Genome Med*; v. 8, n. 1, p. 4, 2016.

BROWN, D. F. *et al*. Non-susceptibility trends among enterococci and non-pneumococcal streptococci from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06. J *Antimicrob Agents Chemother*. v.62, n. suppl 2, p. ii75-ii85, 2008.

BROWN, J.; FREEMAN, B. B. Combining quinupristin/dalfopristin with other agents for resistant infections. *Annals of Pharmacotherapy.* v.38, n.4, p. 677-685. 2004.

BROWN, S. D.; TRACZEWSKI, M. M. Comparative in vitro antimicrobial activity of a new carbapenem, doripenem: tentative disc diffusion criteria and quality control. *J Antimicrob. Chemother*. v. 55, p. 944-949, 2005.

CASAPAO, A. M. *et al.* Multicenter study of high-dose daptomycin for treatment of enterococcal infections. *Antimicrob Agents Chemother*. v.57, n.9, p. 4190–4196. 2013.

CATTOIR V.; GIARD J. C. Antibiotic resistance in *Enterococcus faecium* clinical isolates. *Exp Rev AntiInfect Ther*. v. 12, p.239-248. 2014.

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

CEREDA, R. F. *et al*. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol*. v.23, n.1, p. 19-22. 2002.

CETTI, R. J.; VENN, S.; WOODHOUSE, C. R. The risks of long-term nitrofurantoin prophylaxis in patients with recurrent urinary tract infection: a recent medico-legal case. *BJU Int.* v.103, n.5, p. 567-569. 2009.

CHA, J. O. *et al*. Diversity of Tn*1546* in *vanA*- positive *Enterococcus faecium* clinical isolates with VanA, VanB, and VanD phenotypes and susceptibility to vancomycin. *J Appl Microbiol*. v. 115, p.969-976. 2013.

CHAUDHRY, L. A. *et al.* Antimicrobial susceptibility patterns: a three-year surveillance study in a rehabilitation setting. *Pan Afr Med J.* v.23, n.1. 2016.

CHAVERS, L. S. *et al.* Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. *J Hosp Infect* v.53, n.3, p. 159-171. 2003.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. v.62, n.2, p. 232-260. 2001.

CHRIST, A. P. G. *et al.* Characterization of *Enterococcus* species isolated from marine recreational waters by MALDI-TOF MS and Rapid ID API® 20 Strep system. *Mar Pollut Bull.* 2017.

CHUANG, O. N. *et al.* Multiple functional domains of *Enterococcus faecalis* aggregation substance Asc10 contribute to endocarditis virulence. *Infection and Immunity.* v.77, n.1, p. 539-548. 2009.

CHUANG, Y. C. *et al.* Daptomycin versus linezolid for treatment of vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. v.14, n.1, p. 687. 2014.

CHUANG-SMITH, O. N. *et al*. Acceleration of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by aggregation substance expression in an *ex vivo* model of cardiac valve colonization. *PLoS One.* v.5, n.12, p. e15978. 2010.

CLSI. Perfomance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. Clinical Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2016; 31:84-87.

COBURN, P. S.; GILMORE, M. S. The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell Microbiol*. v. 5, n. 10, p. 661-669. 2003.

CONSENTINO, S. *et al*. Molecular detection of virulence factors and antibiotic resistance pattern in clinical *Enterococcus faecalis* strains in Sardinia. *J Prev Med Hyg.* v.51, n.1, p. 31-36. 2010.

COOMBS, G. W. *et al.* Molecular epidemiology of enterococcal bacteremia in Australia. *J. Clin Microbiol*. v.52, n.3, p. 897-905. 2014.

CORDINA, C. *et al.* Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* associated with omeprazole use in a surgical patient. *J. Antimicrob Chemother*. v.67, n.7, p. 1806-1807. 2012.

COURVALIN, P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis*. v. 42, p. S25-S34. 2006.

CRETI, R. *et al.* Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *J Med Microbiol.* v.53, n.1, p. 13-20. 2004.

DA SILVA, L. P. *et al*. Genetic features and molecular epidemiology *of Enterococcus faecium* isolated in two university hospitals in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* v.74, n.3, p. 267-271. 2012.

DADA, A. C. et al. High-level aminoglycoside resistance and virulence characteristics among Enterococci isolated from recreational beaches in Malaysia. *Environ Monit Assess*. v.185, n.9, p. 7427-7443. 2013.

DAHLEN, G. *et al.* Virulence factors and antibiotic susceptibility in enterococci isolated from oral mucosal and deep infections. *J Oral Microbiol*. v.4, 2012.

DANIEL, D. S. *et al.* Public health risks of multiple-drug-resistant *Enterococcus* spp. In southeast Asia. *App Environ Microbiol.* v. 81, n.18, p. 6090-6097. 2015.

DEEN, J. *et al*. Community-acquired bacterial bloodstream infections in developing countries in south and southeast Asia: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. v.12, n.6, p. 480-487. 2012.

DEPARDIEU, F.; PERICHON, B.; COURVALIN, P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*; v. 42, n. 12, p. 5857-5860, 2004.

DEPARDIEU, F.*et al.* Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin Microbiol Rev*. v.20, n.1, p. 79-114. 2007.

DESHPANDE, L. M. *et al*. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis*. v.58, n.2, p. 163-170. 2007.

DIAZ, L. *et al*. Whole-genome analyses of *Enterococcus faecium* isolates with diverse daptomycin MICs. *Antimicrob Agents Chemother.* v.58, n.8, p. 4527- 4534. 2014.

DIAZ GRANADOS, C. A. *et al*. Comparison of mortality associated with vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bloodstream infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. v.41, n.3, p. 327-333. 2005.

DIPERSIO, L. P. *et al.* Prevalence of the *erm*(T) gene in clinical isolates of erythromycin-resistant group D *Streptococcus* and *Enterococcus. Antimicrob Agents Chemother*. v.52, n.4, p. 1567-1569. 2008.

DOROBAT, O. M. *et al.* Antibiotic resistance of Gram-positive cocci isolated in 2008. *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol*. v.55, n.2, p. 83-92. 2010.

DOWNIE, L. *et al*. Community-acquired neonatal and infant sepsis in developing countries: efficacy of WHO's currently recommended antibiotics-systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child.* v.98, n.2, p. 146-154. 2013.

DUH, R. W. *et al*. In vitro activity of 19 antimicrobial agents against enterococci from healthy subjects and hospitalized patients and use of an ace gene probe from *Enterococcus faecalis* for species identification. *Microb Drug Resist*. v.7, n.1, p.39-46. 2001.

DUPRE, I. *et al.* Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J Med Microbiol.* v.52, n.6, p. 491-498. 2003.

DUTKA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol*; v. 33, n. 1, p. 24-27, 1995.

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

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm. 2015.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. Point prevalence survey of healthcare associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Stockholm. 2013.

EMANEINI, M. *et al.* Prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus* in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. v.35, n.9, p. 1387-1392. 2016.

ESMANHOTO, C. G. *et al*. Microorganisms isolated from patients on hemodialysis by central venous catheter and related clinical evolution. *Acta Paul Enferm.* v.26, n.5, p. 413-420, 2013.

FALAGAS, M. E. *et al.* Fosfomycin for the treatment of infections caused by gram-positive cocci with advanced antimicrobial drug resistance: a review of microbiological, animal and clinical studies. *Expert Opin Investig Drugs.* v.18, n.7, p. 921-944. 2009.

FANTIN, B. *et al*. Influence of inducible cross-resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin B-type antibiotics in *Enterococcus faecium* on activity of quinupristin-dalfopristin in vitro and in rabbits with experimental endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*. v.41, n.5, p. 931-935. 1997.

FERNANDES, S. C.; DHANASHREE, B. Drug resistance & virulence determinants in clinical isolates of *Enterococcus* species. *Indian J Med Res*. v.137, n.5, p. 981-985. 2013.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus. Microbiology*. v.155, n.6, p. 1749-1757. 2009.

FLORENCE, Y.; SULAVIK, M. C.; CLEWELL, D. B. Identification and characterization of a determinant (eep) on the *Enterococcus faecalis* chromosome that is involved in production of the peptide sex pheromone cAD1. *J Bacteriol*. v.181, n.19, p. 5915-5921. 1999.

FRANCIA, M. V.; CLEWELL, D. B. Amplification of the tetracycline resistance determinant of pAM1 in *Enterococcus faecalis* requires a site-specific recombination event involving relaxase. *J Bacteriol.* v.184, n.18, p. 5187-5193. 2002.

FRANK, K. L. *et al*. Use of recombinase-based *in vivo* expression technology ro characterize *Enterococcus faecalis* gene expression during infection identifies *in vivo*-expressed antisense RNAs and implicates the protease Eep in pathogenesis. *Infect Immun.* v.80, n.2, p. 539-549. 2012.

GALES, A. C. *et al.* Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2005-2008). *Braz J Infect Dis.* v.13, n.2, p. 90-98. 2009.

GALLOWAY-PENA, J. R.; RICE, L. B.; MURRAY, B. E. Analysis of PBP5 of early US isolates of *Enterococcus faecium*: sequence variation alone does not explain increasing ampicillin resistance over time. *Antimicrob Agents Chemother*. v. 55, p. 3272-3277. 2011.

GASPAR, F. B.; CRESPO, M. T.; LOPES, M. F. Proposal for a reliable enterococcal cytolysin production assay avoiding apparent incongruence between phenotype and genotype. *J Med Microbiol.* v.58, n.8, p. 1122-1124. 2009.

GILMORE, M. S. *et al*. Enterococcal disease, epidemiology, and implications for treatment. Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection. 2014.

GOMES, B. C. *et al*. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol*; v. 25, n. 5, p. 668-675, 2008.

GOMINET, M. *et al*. Central venous catheters and biofilms: where do we stand in 2017? APMIS v.125, n.4, p. 365-375. 2017.

GONZALEZ , R. D. *et al.* Infections due to vancomycin resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *The Lancet*. v.357, n.9263, p. 1179. 2001.

GORDON, S. *et al*. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. *J clin Microbiol.* v. 30, n.9, p. 2373-2378. 1992.

GOULD, C. V. *et al*. Chloramphenicol resistance in vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: impact of prior fluoroquinolone use? *Infect Control Hosp Epidemiol.* v.25, n.2, p. 138-145. 2004.

GRADEL, K. O. *et al*. Seasonal variation of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus pneumoniae* bacteremia according to acquisition and patient characteristics: A population-based study. *Infect Control Hosp Epidemiol.* v.37, n.8, p. 946-953. 2016.

GROSSI, P. A. Early appropriate therapy of Gram-positive bloodstream infections: the conservative use of new drugs. *Int J Antimicron Agents*. v.34, p. S31-S34. 2009.

GUZMAN PRIETO, A. M. *et al.* Emergence and dissemination of Enterococci as nosocomial pathogens: Attack of the clones? *Front Microbiol*. v.7. p. 788. 2016.

HAMMERUM, A. M. Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clin Microbiol Infect.* v.18, n.7, p. 619- 625. 2012.

HAYAKAWA, K. *et al.* Comparison of the clinical characteristics and outcomes associated with vancomycin- resistant *Enterococcus faecalis* and vancomycin- resistant *E. faecium* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*. v.56, n.5, p. 2452-2458. 2012.

HAYDEN, M. K. Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis*. v. 31, n. 4, p. 1058-1065. 2000.

HAYES, J. R. *et al*. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. *Appl Environ Microbiol*. v. 69, n. 12, p. 7153-7160. 2003.

HEIDARI, H. *et al*. High incidence of virulence factors among clinical *Enterococcus faecalis* isolates in southwestern Iran. *Infect Chemother*. v. 49, n. 1, p. 51-56. 2017.

HENRIQUE, P. M. *et al*. Molecular characterization of enterococci harboring genotype and phenotype incongruence related to glycopeptide resistance isolated in Brazilian hospitals. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 103, p.301-305. 2008.

HERSHBERGER, E. *et al*. Quinupristin-dalfopristin resistance in gram-positive bacteria: mechanism of resistance and epidemiology. *Clin Infect Dis*. v. 38, n. 1, p. 92-98. 2004.

HIGUITA , N. I. A; HUYCKE, M. M. Enterococcal disease, epidemiology, and implications for treatment. In: GILMORE, M. S. *et al*. (eds), *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190420/>

HOENIG, M. *et al.* Characteristics of hospital-acquired and community-onset blood stream infections, south-east austria. *PLoS One.* v.9, n.8, p. 104702. 2014 resistance mechanism in *enterococcus. Virulence.* v.3, n.5, p. 421-433. 2012.

HOLLAND, R. D. *et al.* Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time of-flight mass spectrometry. *Rapid Commum Mass Spectrom*. v.10, n.10, p. 1227-1232. 1996.

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

HÖRNER, R. *et al.* Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. *J. Bras. Patol. Med. Lab*. v.41, n.6, p.391-395, 2005.

HUSON, M. A. *et al.* Community-acquired bacterial bloodstream infections in HIV-infected patients: a systematic review. *Clin Infect Dis*. v.58, n.1, p. 79-92. 2014.

HUYCKE, M. H.; SHAM, D. F.; GILMORE, M. S. Multiple drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis*. v. 4 p. 239-249. 1998.

ILAS. Sepse grave e choque séptico 2005-2015. Relatório Nacional. 2015. Disponível em: <http://www.ilas.org.br/materiais-adulto.php> Acesso em: 12 de fevereiro de 2017.

ISOGAI, N. *et al.* Characterization of *Enterococcus faecium* with macrolide resistance and reduced susceptibility to quinupristin/dalfopristin in a Japanese hospital: detection of extensive diversity in erm(B)-regulator regions. *Microb Drug Resist.* v.19, n.4, p. 298-307. 2013.

JAIN, S. *et al*. Clinico-epidemiological profile and high-level aminoglycoside resistance in enterococcal septicemia from a tertiary care hospital in east Delhi. *Int J Appl Basic Med Res.* v.1, n.2, p. 80-83. 2011.

JENKINS, I. Linezolid and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* endocarditis: successful treatment with tigecycline and daptomycin. *J Hosp Med.* v.2, n.5, p. 343-344. 2007.

JIA, W.; LI, G.; WANG, W. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species: a hospital-based study in China. *Int J Environ Res Public Health.* v.11, n.3, p. 3424-3442. 2014.

JUREEN, R. *et al*. Role of penicillin- binding protein 5 C- terminal amino acid substitutions in conferring ampicillin resistance in Norwegian clinical strains of *Enterococcus faecium*. *APMIS* v. 112, p. 291-298. 2004.

KAÇMAZ, B.; AKSOY, A. Antimicrobial resistence of enterococci in Turkey. *Int J Antimicrob Agents* v. 25, p. 535-538. 2005.

KARANIKA, M. Reduced susceptibility to quinupristin/dalfopristin in *Enterococcus faecium* in Greece without prior exposure to the agent. Int *J Antimicrob Agents*. v.31, n.1, p. 55-57. 2008.

KARPMAN, E.; KURZROCK, E. A. Adverse reactions of nitrofurantoin, trimethoprim and sulfamethoxazole in children. *J Urol*. v.172, n.2, p. 448-453. 2004.

KAYE, K. S. *et al.* Reference group choice and antibiotic resistance outcomes. *Emerg Infect Dis.* v.10, n.6, p. 1125-1128. 2004.

KOCH, S. *et al.* Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vacine*. v.22, n.7, p. 822-830. 2004.

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

KRISHNAMURTHY, T.; ROSS, P. L.; RAJAMANI, U. Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* v.10, n.8, p. 883-888. 1996.

KRISTICH, C. J.; RICE, L. B.; ARIAS, C. A. Enterococcal infection-treatment and antibiotic resistance. In: GILMORE, M. S. *et al*. (eds), *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190420/>

LAI, N. M. *et al*. Skin antisepsis for reducing central venous catheter-related infections. *Cochrane Database Syst Rev*. v. 7, p. CD010140. 2016.

LANDERSLEV, K G. *et al.* Polyclonal spread of *vanA Enterococcus faecium* in Central Denmark Region, 2009-2013, investigated using PFGE, MLST and WGS. *Int J Antimicrob Agents*. v. 48, n. 6, p. 767-768. 2016

LAUPLAND, K. B. *et al*. Burden of community-onset bloodstream infections, Western Interior, British Columbia, Canada. *Epidemiol Infect.* v.114, n.11, p. 2440-2446. 2016.

LAUPLAND, K. B. *et al.* The changing burden of pediatric bloodstream infections in Calgary, Canada, 2000-2006. *Pediatr Infect Dis.* v.28, n.2, p. 114-117. 2009.

LAUPLAND, K. B.; CHURCH, D.L. Population-based epidemiology and microbiology of community-onset bloodstream infections. *Clinical Microbiology Reviews.* v.27, n.4, p. 647–664. 2014.

LAUTENBACH, E. *et al.* The role of chloramphenicol in the treatment of bloodstream infection due to vancomycin-resistant *Enterococcus. Clin Infect Dis.* v.27, n.5, p. 1259-1265. 1998.

LAVERDE GOMEZ, J. A, *et al.* A multiresistance megaplasmid pLG1 bearing a hylEfm genomic island in hospital Enterococcus faecium isolates. *Int J Med Microbiol*. v. 301, n. 2, p. 165-175. 2011

LEAVIS, H. L.; BONTEN, M. J. M.; WILLEMS, R. J. L. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Current Opinion Microbiol.* v.9, n.5, p. 454-460. 2006.

LEAVIS, H. L.; WILLEMS, R. J. L.; BONTEN, M. J. M. High-level ciprofloxacin resistance from point mutations in gyrA and parC confined to global hospital-adapted clonal lineage CC17 of *Enterococcus faecium*. J *Clin Microbiol*. v.44, n.3, p. 1059-1064. 2006.

LECLERCQ R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis.* v. 34, n. 4, p. 482-492. 2002.

LI, W. *et al.* Characterization of aminoglycoside resistance and virulence genes among *Enterococcus spp.* isolated from a hospital in China. *Int J Res Public Health*. v.13, n.3, p. 3014-3025.

LINDEN, P. K. Treatment options for vancomycin-resistant enterococcal infections. *Drugs.* v. 62, n. 3, p. 425-441. 2002.

LINDENSTRAU, A. G. *et al.* Comparison of genotypic and phenotypic cluster analyses of virulence determinants and possible role of CRISPR elements towards their incidence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Syst Appl Microbiol.* v.34, n.8, p. 553-560. 2011.

LIU, P. *et al.* Clinical outcomes of linezolid and vancomycin in patients with nosocomial pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* stratified by baseline renal function: a retrospective, cohort analysis. *BMC Nephrol.* v.18, n.1, p. 268. 2017.

LOPES, H. V. Daptomycin: finally available in South America. *Rev Panam Infectol*. v.10, n.3, p. 70-71. 2008.

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

LOPEZ, M. *et al*. Glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium.* Analysis of the resistance genotype, virulence and genetic lines. *Enf Infec Microbiol Clin*. v. 31, n. 1, p. 10-14. 2013.

LUTHER, M. K. *et al.* Activity of daptomycin or linezolid in combination with rifampin or gentamicin against biofilm-forming *Enterococcus faecalis* or *E. faecium* in an in vitro pharmacodynamic model using simulated endocardial vegetations and an in vivo survival assay using Galleria mellonella larvae. *Antimicrob Agents Chemother*. v. 58, n. 8, p. 4612-4620. 2014.

LYSAKOWSKA, M. E.; DENYS, A.; SIENKIEWICZ, M. Frequency of *ace, epa* and *eldrA* genes in clinical and environmental strains of *Enterococcus faecalis. Indian J Microbiol.* v.52, n.4, p. 612-616. 2012.

MANNU, L. *et al*. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int J Food Microbiol*; v. 88, n. 2, p. 291-304, 2003.

MARTINEZ, R. M.; Wolk, D.M. Bloodstream Infections. *Microbiol Spectr*. v.4, n.4. 2016.

MASTROIANNI, A. *Enterococcus raffinosus* endocarditis. First case and literature review. *Infez Med*. v. 17, n. 1, p. 14-20. 2009.

MCBRIDE, S. M. *et al.* Genetic diversity among *Enterococcus faecalis. PLoS One. v.2, n.7, p. e582. 2007.*

McCRACKEN, M. *et al.* Nosocomial infection surveillance program. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococcal bacteraemia: results from the Canadian nosocomial infection surveillance program, 1999-2009. *J Antimicrob Chemother.* v.68, n.7, p. 1505-109. 2013.

MCKINNELL, J. A. *et al.* Observational study of the epidemiology and outcomes of vancomycin-resistant *Enterococcus* bacteraemia treated with newer antimicrobial agents. *Epidemiol Infect.* v.139, n.9, p. 1342-1350. 2010.

MEDEIROS, A. W. et al. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. *Braz J Microbiol*. v.45, n.1, p. 327-332. 2014.

MEKA, V. G.; GOLD, H, S. Antimicrobial resistance to linezolid. *Clin Infect Dis.* v.39, n.7 , p. 1010-1015. 2004.

MENDES, R. E. *et al.* Summary of linezolid activity and resistance mechanism s detected during the 2012 LEADER surveillance program for the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* v.58, n.2, p. 1243-1247. 2014.

MEROUEH, S. O. *et al.* Structural aspects for evolution of beta-lactamases from penicillin-binding proteins. *J Am Chem Soc.* v.125, n.32, p. 9612-9618. 2003.

MICHALOPOULOS, A. S.; LIVADITIS, I. G.; GOUGOUTAS, V. The revival of fosfomycin. *Int J Infect Dis*. v. 15, n. 11, p. e732-739. 2011.

MIKALSEN, T. *et al.* Investigating the mobilome in clinically important lineages of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *BMC Genomics.* v. 16, n. 1, p. 282. 2015.

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

MOELLERING JR, R. C. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin Infect Dis*. v.14, n.6, p.1173-1176. 1992.

MUNDY, L. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* v.13, n.4, p. 513-522. 2000.

MUNITA, J. M; MURRAY,B. E.; ARIAS, C. A. Daptomycin for the treatment of bacteraemia due to vancomycin- resistant enterococci. *Int J Antimicrob Agents.* v.44, n.5, p. 387-395. 2014.

MUNITA, J. M. *et al.* Correlation between mutations in *liaFSR* of *Enterococcus faecium* and MIC of daptomycin: revisiting daptomycin breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother*. v. 56, n.8, p. 4354–4359. 2012.

MUNITA, J. M. *et al.* Failure of high-dose daptomycin for bacteremia caused by daptomycin-susceptible *Enterococcus faecium* harboring LiaSR substitutions. v.59, n.9, p. 1277-1280. 2014a.

MUNITA, J. M.; MURRAY, B. E.; ARIAS, C.A. Daptomycin for the treatment of bacteraemia due to vancomycin-resistant enterococci. *Int J Antimicrob Agents.* v.44, n.5, p. 387-395. 2014b.

MURRAY, B. E. Diversity among multidrug-resistant Enterococci. *Emerg Infect Dis*. v.4, n.1, p. 37-47.1998.

MURRAY, B. E. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev.* v.3, n.1, p. 46-65. 1990.

MUTSCHLER, M. *et al.* Severe sepsis caused by a linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in a 10-year-old girl after multiple trauma. *Int J Infect Dis*. v. 17, n.6, p. 466-467. 2013.

MUTTERS, N. T. *et al.* Control of the spread of vancomycin-resistant enterococci in hospitals. *Epidemiol Clin Relev.* v.110, n.43, p. 725-731. 2013.

NAILOR , M. D.; SOBEL, J. D. Antibiotics for gram-positive bacterial infections: vancomycin, teicoplanin, quinupristin/dalfopristin, oxazolidinones, daptomycin, dalbavancin, and telavancin. *Infect Dis North Am*. v. 23, n.4, p. 965-982. 2009.

NARAYANASWAMY, A.; RAJALAKSHMI, K.; VARADHARAJAN, M. Speciation and antimicrobial susceptibility pattern of *Enterococci* from a tertiary health care center of south *India. J Pharmacy Research.* v.4, n.4, p. 989-990. 2011.

NIU, H. *et al*. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme and virulence genes among enterococci with high-level aminoglycoside resistance in Inner Mongolia, China. *Braz J Microbiol.* v.47, n.3, p. 691-696. 2016.

NOVILLO, F. L. *et al*. Community-acquired bacteremia in adult patients. analysis of 645 episodes. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*. v.73, n.4, p. 233-239. 2016.

O`DRISCOLL, T.; CRANCK, C. W. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect Drug Resist*. v.8, p. 217-230. 2015.

OLSEN, R. H. *et al. Enterococcus faecalis* of human and poultry origin share virulence genes supporting the zoonotic potential *of E. faecalis*. *Zoonoses Public Health.* v.59, n.4, p. 256-263. 2012.

ONODERA, Y. *et al.* Inhibitory activities of quinolones against DNA gyrase and topoisomerase IV of *Enterococcus faecalis. Antimicrob Agents Chemother*. v. 46, n.6, p. 1800-1804. 2002.

OPREA, S. F. *et al*. Molecular and clinical epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis. J Antimicrob Chemother.* v.53, n.4, p. 626-630. 2004.

PADILLA, E. C. *et al.* Virulence genes and bacteriocins in *Enterococcus faecalis* strains isolated from different clinical samples in Maule region, Chile. *Rev Chil Infect.* v.29, n.1, p. 55-61. 2012.

PADMASINI, E.; PADMARAJ, R.; RAMESH, S. S. High level aminoglycoside resistance and distribution of aminoglycoside resistant genes among clinical isolates of *Enterococcus* species in Chennai, India. *Scientific Word Jounal*. v. 2014. Article ID329157. 2014.

PALAVENCINO R.E. Puesta al día en enterococos-año 2001: Identificação de especies y estudio de susceptibilidade antimicrobiana. *Rev Chilena Infectol*. v. 18, p. 95-100. 2001.

PALMER, K. L.; KOS, V. N.; GILMORE, M. S. Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol.* v.13, n.5, p. 632-639. 2010.

PANESSO, D. *et al.* First characterization of a cluster of *vanA*-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* in Colombia. *Emerg Infec Dis.* v. 8, n. 9, p. 961-965. 2002.

PARK, I. J. *et al*. Genetic rearrangements of Tn*1546* like elements in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates collected from hospitalized patients over a seven-year period. *J Clin Microbiol*. v. 45, p. 3903-3908. 2007.

PEREZ, D. Q. *et al*. Susceptibilidad antimicrobiana y bases genéticas de la resistencia de cepas de *Enterococcus* causantes de infecciones en Cuba. *Rev Panam Salud Publica.* v.30, n.6, p. 549-554. 2011.

PINHOLT, M. *et al*. Multiple hospital outbreaks of *vanA Enterococcus faecium* in Denmark, 2012–13, investigated by WGS, MLST and PFGE. *J Antimicrob Chemother*; v. 70, n. 9, p. 2474-2482, 2015.

PINTO, T.C. *et al*. Phenotypic and molecular characterization of optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae*isolates from Brazil, with description of five novel mutations in the *atpC* gene. *J Clin Microbiol*; v. 51, n. 10, p. 3242-3249, 2013.

POLIDORI, M. *et al.* Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) bacteremia in infective endocarditis successfully treated with combination daptomycin and tigecycline. *J Chemother.* v.23, n.4, p. 240-241. 2011.

PORTILLO, A. et al. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* v.44, n.4, p. 967-971. 2000.

RAFII, F.; HANSEN JR., E. B. Isolation of nitrofurantoin-resistant mutants of nitroreductase-Producing *Clostridium* sp. strains from the human Intestinal tract. *Antimicrob Agents Chemother.* v. 42, n. 5, p. 1121-1126. 1998.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat.* v. 13, n. 6, p. 151-171. 2010.

RASMUSSEN, R. V. *et al*. Future challenges and treatment of *Staphylococcus aureus* bacteremia with emphasis on MRSA. *Future Microbiol.* v.6, n.1, p. 43-56. 2011.

RAVEN, K. E. *et al*. A decade of genomic history for healthcare-associated *Enterococcus faecium* in the United Kingdom and Ireland. *Genome Res*. v. 26, n. 10, p. 1388-1396. 2016

REWA, O. *et al*. Coagulase-negative *Staphylococcus*, catheter-related, bloodstream infections and their association with acute phase markers of inflammation in the intensive care unit: An observational study. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. v.23, n. 4, p. 204-0208. 2012.

REYES, K.; BARDOSSY, A. C.; ZERVOS, M. Vancomycin-resistant enterococci: epidemiology, infection prevention, and control. *Infect Dis Clin North Am.* v.30, n.4, p. 953-965. 2016.

RICE, L. B. Emergence of vancomycin-resistant Enterococci. *Emerg Infect Dis*. v.7, n.2, p. 183-187. 2001.

RICE, L. B. *et al.* Beta-lactam antibiotics and gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci. *J Infect Dis*. v.189, n.6, p. 1113-1118. 2004.

RICE, L. B. The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Curr Opinion Microbiol.* v. 12, p. 476-481. 2009.

ROBERTS, M. C. *et al*. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* v.43, n.12, p. 2823-2830. 1999.

RODVOLD, K. A.; McCONEGHY, K. W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus therapy*: past, present, and future. *Clin Infect Dis*. v.58, n. suppl 1, p. S20- S27. 2014.

ROLSTON, K. V. I. *et al.* Daptomycin use in neutropenic patients with documented gram-positive infections. *Support Care Cancer.* v.22, n.1, p. 7-14. 2014.

ROSA, R. G. *et al.* Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* Bacteremia in a tertiary care hospital: epidemiology, antimicrobial susceptibility, and outcome. *Biomed Res Int.* 2014.

ROSE, W. E.; RYBAK, M. J. Tigecycline: first of a new class of antimicrobial agents. *Pharmacotherapy.* v.26, n.8, p.1099- 1010. 2006.

RUIZ-GARBAJOSA, P. *et al.* Genetic and phenotypic differences among *Enterococcus faecalis* clones from intestinal colonization and invasive disease. *Clin Microbiol Infect.* v.12, n.12, p. 1193-1198. 2006

RYAN, L. *et al*. Epidemiology and molecular typing of VRE bloodstream isolates in an Irish tertiary care hospital. *J Antimicrob Chemother*. v. 70, n. 10, p. 2718-2724. 2015

SADER, H. S. *et al*. Tigecycline antimicrobial activity tested against clinical bacteria from Latin American medical centres: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2011–2014). *Int J Antimicrob Agents.* v.48, n.2, p. 144-150. 2016.

SADER, H. S.; MOET, G.J.; JONES, R. N. Antimicrobial resistance among gram-positive bacteria isolated in latin american hospitals. *J Chemother.* v.21, n.6, p. 611-620. 2009.

SALES JUNIOR, J. A. L. et al. An epidemiological study of sepsis in intensive care units sepsis brazil study. *Rev. Bras Tter. Intensiva.* v.18, n.1, p. 9-17. 2006.

SALIPANTE, S. J. *et al*. Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology. *J Clin Microbiol*. v. 53, n. 4, p. 1072-1079, 2015.

SALMERÓN, J. P. *et al.* Comparación de la eficacia de quinupristina-dalfopristina en monoterapia y combinada con gentamicina, teicoplanina, imipenem o levofloxacino en un modelo experimental de endocarditis por *Enterococcus faecium* multirresistente. *Rev Esp Quimioterap*. v.19, n.3, p. 258-266. 2006.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res Int*. 2016.

SAVA, I. G.; HEIKENS, E.; HUEBNER, J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect.* v.16, n.6, p. 533-540.

SCAPELLATO, P. G. *et al.* Meningitis due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* successfully treated with combined intravenous and intraventricular chloramphenicol. *J Clin Microbiol.* v.43, n.7, p. 3578-3579. 2005.

SCHLIEVERT, P. M. *et al.* *Enterococcus faecalis* endocarditis severity in rabbits is reduced by IgG Fabs interfering with aggregation substance. *PLoS One*. v.5, n.10, p. e13194. 2010.

SCHWARZ, S. *et al.* Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol rev*. v.28, n.5, p.519-542. 2004.

SEDGLEY, C. M. *et al.* Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral Microbiol Immunol.* v.20, n.1, p.10-19. 2005.

SEMEDO, T. *et al.* Virulence factors in food, clinical and reference Enterococci: A common trait in the genus? *Syst Appl Microbiol*. v.26, n.1, p.13-22. 2003.

SHANKAR N *et al*. Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int J Med Microbiol*. v. 293, p. 609-618. 2004.

SHANKAR, V. *et al.* Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun*. v.67, n.1, p. 193-200. 1999.

SHARIFI, Y. *et al.* Survey of virulence determinants among vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from clinical specimens of hospitalized patients of north west of Iran. *Open Microbiol J*. v.6, n.1, 2012.

SHARIFI, Y. *et al.* Virulence and antimicrobial resistance in enterococci isolated from urinary tract infections. *Adv Pharm Bull*. v.3, n.1, p. 197-201. 2013.

SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes and Infection* v. 4, p. 215-224. 2002.

SILVA, J. *et al.* Detección de genes de virulencia en cepas de *Enterococcus faecalis* susceptibles y resistentes a aminoglucósidos. *Rev Chil Infectol.* v.30, n.1, p. 17-22. 2013.

SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* v.315, n.8, p. 801–810, 2016.

SINGH, K. V. *et al.* Importance of the collagen adhesin ace in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis. *PLoS Pathog.* v.6, n.1, p. e1000716. 2010.

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

SIQUEIRA-BATISTA, R. *et al.* Sepsis: an update. *Rev Bras Ter Intensiva*. v.23, n.2, p. 207.-216, 2011.

SIT, P. S. *et al.* Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection and the molecular characteristics of MRSA bacteraemia over a two-year period in a tertiary teaching hospital in Malaysia. *BMC Infect Dis*. v.17, n.1, p. 274. 2017.

STRATEVA, T. *et al*, Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. *Braz J Infect Dis.* v.20, n.2, p. 127-133.

SUZUKI, H. *et al*. A 10-year profile of enterococcal bloodstream infections at a tertiary-care hospital in Japan. *J Infect Chemother*. v.23, n.6, p. 390-393. 2017.

SUZUKI, M. *et al.* Bacteremia in hemodialysis patients. *World J Nephrol*. v.5, n.6, p. 489-496. 2016.

TACCONELLI, E.; CATALDO, M. A. Vancomycin-resistant enterococci (VRE): transmission and control. *Int J Antimicrob Agents* v. 31, p. 99-106 2008.

TAN, C. K. *et al.* Bacteremia caused by non-*faecalis* and non-*faecium Enterococcus* species at a Medical center in Taiwan, 2000 to 2008. *J Infect*. v. 61, n. 1, p. 34-43. 2010.

TEIXEIRA, L. M. *et al*. *Enterococcus*. In: Manual of Clinical Microbiology. 11. ed. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C, p.403-.421, 2015.

TEIXEIRA, L. M, CARVALHO M. G.; FACKLAM, R. R. *Enterococcus*. In: Murray BE, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH (eds). Manual of Clinical Microbiology, 9th ed. *ASM Press*. Washington DC, EUA; p. 430-442, 2007.

TEIXEIRA, L. M. *et al*. Phenotypic and genotypic characterization of *Vagococcus fluvialis*, including strains isolated from human sources. *J Clin Microbiol.* v.35, n.11, p. 2778-2781. 1997.

TOP, J. *et al.* Emergence of clonal complex 17 *Enterococcus faecium* in the Netherlands. *J Clin Microbiol.* v.46, n.1, p. 214-219. 2008.

TSAI, H. Y. *et al.* Trends in susceptibility of vancomycin- resistant *Enterococcus faecium* resistant to tigecycline, daptomycin, and linezolid and molecular epidemiology of the isolates: results from the Tigecycline in vitro surveillance in taiwan (TIST) study, 2006 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother.* v. 56, n. 6, p. 3402-3405. 2012.

TSAKRIS, A. *et al*. Increasing prevalence of high-level gentamicin resistance among enterococci isolated in Greece. *Chemotherapy.* v.47, n.2, p. 86-89. 2001.

TSIKRIKONIS, G. *et al*. Differences in biofilm formation and virulence factors between clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin. *Microb Pathog*. v.52, n.6, p. 336-343. 2012.

UDO, E. E.; AL-SWEIH, N. Frequency of virulence-associated genes in *Enterococccus faecalis* isolated in Kuwait hospitals. *Med Princ Pract*. v.20, n.3, p. 259-264. 2011.

UPADHYAYA, P. M. G.; RAVIKUMAR, K. L.; UMAPATHY, B. L. Review of virulence factors of *Enterococcus*: an emerging nosocomial pathogen. *Indian J Med Microbiol.* v.27, n.4, p. 301-305. 2009.

UTTLEY, A. H. *et al.* Vancomycin- resistant enterococci. *Lancet.* v.9, n.1, p. 57-58. 1988

VALDEZATE, S. *et al.* Large clonal outbreak of multidrug-resistant CC17 ST17 *Enterococcus faecium* containing Tn5382 in a Spanish hospital. *J antimicrob Chemother.* v.63, n.1, p. 17-20. 2009.

VAN TYNE, D.; MARTIN, M. J.; GILMORE, M. S. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins* (Basel). v. 5, n. 5, p. 895-911. 2013.

VAN WIJK, P. T. *et al.* Differences between hospital- and community-acquired blood exposure incidents revealed by a regional expert counseling center. *Infection*. v.34, n.1, p. 17-21. 2006.

VANKERCKHOVEN, V. *et al.* 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*. *J Clin Microbiol*. v.42, n.10, p. 4473-4479. 2004.

VOGKOU, C. T. *et al.* The causative agents in infective endocarditis: a systematic review comprising 33,214 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. v. 35, n.8, p. 1227-1245. 2016.

WANG, S. *et al.* Characteristic of *Enterococcus faecium* clinical isolates with quinupristin/dalfopristin resistance in China. BMC Microbiol. v.16, n.1, p. 246. 2016.

WARDAL, E. *et al.* Molecular analysis of *vanA* outbreak of *Enterococcus faecium* in two warsaw hospitals: the importance of mobile genetic elements. *Biomed Res Int.* v. 2014, Article ID 575367. 2014.

WERNER, G. *et al.* Improved identification including MALDI-TOF mass spectrometry analysis of group D streptococci from bovine mastitis and subsequent molecular characterization of corresponding *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. *Vet microbiol.* v.160, n.1, p. 162-169. 2012.

WERNER, G. *et al.* Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from a German intensive care unit patient. *J Antimicrob Chemother.* v.61, n.5, p. 1182-1183. 2008.

WHANG, D. W. *et al.* Systematic review and meta-analysis of linezolid and daptomycin for treatment of vancomycin-resistant enterococcal bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother*. v.57, n.10, p. 5013-5018. 2013.

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

WILLEMS, R. J.; SCHAIK, W. V. Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. *Future Microbiol.* v.4, n.9, p. 1125-1135. 2009.

WINSTON, D. J. *et al.* Quinupristin/dalfopristin therapy for infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin Infect Dis.* v.30, n.5, p. 790-797. 2000.

WOODFORD, N. *et al.* Two widely disseminated strains of *Enterococcus faecalis* highly resistant to gentamicin and ciprofloxacin from bacteraemias in the UK and Ireland. *J antimicrob Chemother.* v.52, n.4, p. 711-714. 2003.

XU, Z. *et al.* Longitudinal surveillance on antibiogram of important Gram-positive pathogens in Southern China, 2001 to 2015. *Microbiol Pathog*. v.103, p. 80-86. 2017.

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

YIM, J.; SMITH, JR.; RYBAK, M. J. Role of combination antimicrobial therapy for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* Infections: Review of the current evidence. *Pharmacotherapy*. v.37, n.5, p. 579-592. 2017.

ZARRILLI, R. *et al*. Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. J Antimicrob Chemother. v. 56, p. 827-835. 2005.

ZHANEL, G. G.; HOBAN, D. J.; JAMES, A. K. Nitrofurantoin is active against vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* v.45, n.1, p. 324-326. 2001.

ZHANG, Q.; ZHOU, S.; ZHOU, J. Tigecycline Treatment Causes a Decrease in Fibrinogen Levels. *Antimicrob Agents Chemother.* v.59, n.3, p. 1650-1655. 2015.

ZHANG, T. *et al*. Cardiolipin prevents membrane translocation and permeabilization by daptomycin. *J Biol Chem*. v.289, n.17, p. 11584-11591. 2014.

ZHANG, X. *et al*. Genome-wide identification of ampicillin resistance determinants in *Enterococcus faecium*. *PLoS One.* v.8, n.6, p. e1002804. 2012.

ZHU, W; ZHANG, Q; ZHANG, J. The changing epidemiology and clinical features of infective endocarditis: A retrospective study of 196 episodes in a teaching hospital in China. *BMC Cardiovasc Disord.* v.17, n.1, p.113, 2017.

ZIAKAS, P. *et al*. Trends and significance of VRE colonization in the ICU: a meta-analysis of published studies. *PLoS One*. v.8, n.9, p. 75658. 2013.