



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Adriana Rocha Faria

**Diversidade e estrutura populacional de *Enterococcus faecalis* resistentes a
níveis elevados de aminoglicosídeos**

Rio de Janeiro

2017

Adriana Rocha Faria

Diversidade e estrutura populacional de *Enterococcus faecalis* resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadoras: Prof.^a Dra. Vânia Lúcia Carreira Merquior

Prof.^a Dra. Lucia Martins Teixeira

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F224 Faria, Adriana Rocha.
Diversidade e estrutura populacional de *Enterococcus faecalis* resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos / Adriana Rocha Faria. – 2017.
185 f.

Orientadora: Vânia Lúcia Carreira Merquior.

Coorientadora: Lucia Martins Teixeira.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. *Enterococcus faecalis* – Patogenicidade – Teses. 2. *Enterococcus faecalis* – Efeito dos fármacos – Teses. 3. Aminoglicosídeos – Resistência em microorganismos – Teses. I. Merquior, Vânia Lúcia Carreira. II. Teixeira, Lucia Martins. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 579.86:615.33:615.015.8

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

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

Assinatura

Data

Adriana Rocha Faria

Diversidade e estrutura populacional de *Enterococcus faecalis* resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 02 de junho de 2017.

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

Banca Examinadora: _____
Prof.^a Dra. Vânia Lúcia Carreira Merquior (Orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Elizabeth de Andrade Marques
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Ana Claudia de Paula Rosa Ignacio
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Beatriz Meurer Moreira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2017

DEDICATÓRIA

A Deus! Seu fôlego de vida em mim me foi sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela fiel presença em minha vida. Só tenho a agradecer por tudo.

À minha amada família, meus pais Rosemary e Manoel, por todo amor, por me proporcionar oportunidades de buscar meus sonhos; as minhas irmãs Aline e Andressa, por todo carinho, amizade e companheirismo; ao meu irmão gêmeo Adriano, cuja benção em dividir desde a gestação a alegria de vir acompanhada de um amigo. Obrigada principalmente por sempre serem meus melhores amigos, pelo afeto, apoio, incentivo, preocupação e cumplicidade a mim dedicados.

Ao meu sobrinho Guilherme por trazer luz e alegria aos meus dias. Obrigada por todo amor. Meu cheirinho.

A minha cunhada Verônica e cunhados Robson e Renato, por estenderem todo amor e cuidado a mim também! Sou grata pela harmoniosa família que constituímos! Obrigada por todo carinho, respeito e zelo! Obrigada pela torcida, incentivo e ajuda!

Aos mestres, que nos abreviam a procura do conhecimento. Meu reconhecimento e gratidão a todos que fizeram parte do meu crescimento e trajetória acadêmica. Sem esses profissionais o mundo não teria o último suspiro de esperança.

À minha orientadora Prof.^a Vânia Lúcia Carreira Merquior, pelos ensinamentos, apoio, paciência e amizade. Minha eterna gratidão.

À professora Lúcia Martins Teixeira, pela acolhida em seu laboratório e por proporcionar auxílio a execução do projeto. Sou imensamente grata.

Aos Professores do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UERJ pelo carinho e atenção com que sempre me trataram.

Aos membros da banca, a Prof.^a Dra. Ana Cláudia Rosa, a Prof.^a Dra. Elizabeth Marques, a Prof.^a Dra. Beatriz Meurer e a Prof.^a Dra. Ana Paula D'Alincourt que se dispuseram em participar da finalização desta etapa. Meu muito obrigada.

Meu obrigada mais que especial ao Prof. Robson de Souza Leão pela revisão desse trabalho. Obrigada pela solicitude.

À equipe do Lab2 da UERJ, pessoas especiais que me acolheram e ajudaram nos passos iniciais da minha jornada na microbiologia, a Márcia Jones, Rosana Helena, Alex Ferreira, meu muito obrigada. Também a nova geração a qual nutro muito carinho: Gessica Araujo, Daniele Lima, Beatriz Godoy e Selma Santos, pelo carinho, amizade, troca de aprendizado, experiência e incentivo. Não poderia deixar de mencionar, a Profa. Elizabeth

Marques por me receber na Microbiologia junto com a Profa. Vânia com muito carinho, sou grata por poder ter aprendido muito com vocês.

Às amigas que ganhei na Microbiologia UERJ, Carolina Dietrichie, Mizia Martins e Andreia Rocha. Obrigada por todo carinho.

À amiga de Graduação e Microbiologia UERJ, Emanuela Araujo. Obrigada pelo estímulo e apoio para estudar e fazer a prova do mestrado com a loucura de término de graduação, você faz parte dessa trajetória, não poderei deixar de agradecer.

E como ganhei amigas na Microbiologia, me sinto imensamente recompensada por cada amizade e afeto. A minha amiga, comadre, parceira e carinhosa Sabrina Ferreira. Obrigada por todo afeto, por me fazer parte da sua linda família e madrinha do príncipe Dante, meu lindo sobrinho que traz alegria para essa jornada que as vezes não é só feita de triunfos e alegrias. Como é lindo ver a sua realização e transformação em mãe. Obrigada pelos vários momentos “xô stress” durante a jornada acadêmica.

Seguindo a lista, a divertidíssima e afetuosa Carolina Gomes, pelos momentos de descontração, carinho e risadas, por trazer alegria em parte dessa jornada. Ter alguém que transborda alegria no dia-a-dia não tem preço. A Priscila Ribau pelo incentivo e carinho. O congresso de Natal ficará guardado com muito carinho no meu baú de boas recordações. A Stephanie Rodrigues pelo carinho, risadas e por transformar as jornadas noturna no Lab sempre alegres. Obrigada pelas palavras de entusiasmo com que sempre me incentivou. A Mariana e Luciana, por todo carinho, admiração, afeto e amizade, muito bom tê-las como amigas. A Mari especialmente por ter abraçado o projeto dos plasmídeos, é uma enorme satisfação fazer parte do seu crescimento profissional.

E nessa lista não poderia faltar, a amiga Beatriz Monteiro. Obrigada por fazer parte dessa trajetória e pelas ótimas conversas científicas que nos rendeu enriquecimento e progresso. Obrigada por ser a excelente companhia de volta para casa por grande parte dessa jornada, é sempre bom ter alguém tão cheia de amor pela ciência para conversar e fazer do tempo gasto no trânsito um momento útil e divertido também, quantas histórias. Obrigada pelas palavras de incentivo e apoio.

Também quero agradecer a amiga Filó por todo carinho e auxílio com o material para os experimento. À amiga Andrea Freitas, meu muito obrigada pelo carinho, amizade, parceria de bancada, partilha de experiência, informações científica e aprendizado. À amiga Clarissa por todo cuidado e carinho, receber afeto de graça não tem preço.

Aos Colegas Felipe, Guilherme e Paulo, pelo afeto e as boas conversas sobre o mundo, política, vida, cinema, evolução, religião, novidades científicas, Microbiologia Esses momentos não tem preço. Obrigada pelo carinho.

Ah, e a todos os amigos e colegas mencionados, obrigada pelos almoços memoráveis, festinha de aniversário, lanche da tarde, ida ao cinema, ao bandeirão, ao estádio de futebol, a patinação no gelo, Outbacks, Mc Donalds, docinho da tarde, caronas, risadas, companhia de final de semana e/ou saída noturna no lab. Vocês fizeram a jornada bem mais leve.

As amigas, mais chegadas que irmãs, Elenice, Fabiana, Nathalia e Viviane. Obrigada por todo o carinho, amizade, atenção, companheirismo, parceria, descontração, incentivo, torcida, injeção de ânimo, celebração e cuidado. Sou muito grata e imensamente feliz por vocês fazerem parte da minha vida.

Aos colegas da Microbiologia UFRJ, Jaqueline, Sandrine, Aline, Natália, Tatiana, Luciana, Laura e Carol o meu obrigada.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UERJ pelos ensinamentos e carinho.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível. Em especial ao pessoal do Serviço de Sequenciamento da Biofísica da UFRJ pela ajuda.

As agências FAPERJ e CNPq pelo apoio financeiro à realização desta proposta.

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

Queria deixar aqui também uma mensagem de amor a meu filho canino, o famoso Branco. Por aliviar qualquer estresse e desânimo com seu jeito carinhoso e brincalhão.

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.

Arthur Schopenhauer

RESUMO

FARIA, Adriana Rocha. Diversidade e estrutura populacional de *Enterococcus faecalis* resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos. 2017. 185 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Dentre as espécies de *Enterococcus*, *E. faecalis* se destaca pelo elevado percentual de amostras associadas a quadros clínicos de maior gravidade, como as infecções da corrente sanguínea. O objetivo deste estudo foi avaliar amostras portadoras de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLAR), quanto a fenótipos e genótipos de resistência aos antimicrobianos, virulência e diversidade populacional. Foram selecionadas 306 amostras de *E. faecalis* HLAR, provenientes de instituições hospitalares localizadas no estado do Rio de Janeiro, no período de Jan/2005 a Jan/2013. Perfis de susceptibilidade a 14 antimicrobianos foram avaliados por disco difusão e a concentração inibitória mínima para gentamicina (GEN) e estreptomicina (EST) foi determinada por diluição em ágar. Genes associados às características de HLAR e de virulência foram identificados por metodologia de PCR. Análises da diversidade genotípica e estrutura populacional foram realizadas pelo emprego dos métodos de eletroforese em campo pulsado (PFGE) e tipificação por sequenciamento de múltiplos loci (MLST). Nas amostras resistentes a níveis elevados de gentamicina HLR-G o gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* foi prevalente, seguido de *aph(2'')-Ic*. Já naquelas HLR para estreptomicina (HLR-S), *ant6'-Ia* foi prevalente. Amostras resistentes a vancomicina (VREfa) apresentaram elevadas taxas resistência aos 14 antimicrobianos testados. De 42 amostras VREfa, 38 apresentaram genótipo *vanA* e quatro *vanB*. Os genes *efaA*, *eep*, *gelE*, *ace*, *asa1* e *agg* foram identificados na quase totalidade das amostras, e uma frequência moderada foi observada para *cylA* e *esp*. O gene *hyl* não foi observado nessas amostras. As análises por PFGE resultaram na identificação de 36 grupos, sendo GP8, GP3 e GP5 os prevalentes em amostras HLR-G; GP1, GP8, GP16, GP3 e GP19 em HLR-GS; e GP22, GP2 e GP24 em HLR-S. A análise por MLST revelou 17 STs associados as amostras clínicas de *E. faecalis* e dois STs novos foram descritos nesse estudo (ST769 e ST770). O ST6, ST21, ST4 e o novo ST769 foram os mais frequentes. Amostras VRE foram relacionadas ao ST6, ST9, ST97, ST103 e ao novo ST769. Os genes *eep* e *efaA* foram associados a todos os STs; porém *cylA* foi correlacionado ao CC2 (ST6 e ST2), *esp* aos ST21, ST26 e ST40; *gelE* a CC2, CC21, CC388, CC30, ST4, ST9, ST40, ST97 e ST330; *asa1* ao CC2, CC388, ST4, ST9, ST26, ST55, ST97, ST330 e ST21; *agg*, ao CC2, CC388, ST4, ST9, ST26, ST55, ST97 e ST330; e *ace* ao CC2, CC388, ST4, ST9, ST26, ST55, ST97 e ST330. A circulação de HLAR em nosso meio em clones descritos mundialmente como de alto risco e a expansão clonal de algumas dessas linhagens, que incluiu a aquisição de resistência à vancomicina e a penicilina e a participação de genes de virulência, chama a atenção para emergência de clones mais adaptados e potencialmente patogênicos dispersos no ambiente hospitalar.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*. Resistência aos antimicrobianos. Resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos. Tipificação por sequenciamento em múltiplos loci. Eletroforese em campo pulsado. Diversidade bacteriana.

ABSTRACT

FARIA, Adriana Rocha. Diversity and population structure of *Enterococcus faecalis* high-levels aminoglycosides resistant. 2017. 185 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Enterococcus faecalis stands out for the high percentage of isolates associated with more serious clinical conditions such bloodstream infections. The aim of this study was to evaluate *E. faecalis* isolates showing high-level aminoglycosides resistance (HLAR), as their phenotypes and genotypes of antimicrobial resistance, virulence traits and population diversity. A total of 306 bacterial *E. faecalis* HLAR strains isolated from patients attended at hospital institutions located in the State of Rio de Janeiro, during the period of Jan/Jan 2005/2013 were selected. Susceptibilities profiles have been assessed by disk diffusion to 14 antimicrobials, and the minimum inhibitory concentration for gentamicin (GEN) and streptomycin (EST) was determined by agar dilution. Genes associated to the characteristics of HLAR and to virulence were identified by PCR assay. Analysis of genotypic diversity and population structure were carried out by pulsed-field electrophoresis (PFGE) and multiple loci sequencing typing (MLST). Among the isolates showing high-level gentamicin resistance (HLR-G), the gene *aac(6')-Ie-aph (2'')Ia* was prevalent followed by *aph (2)-Ic*. Moreover, among HLR to streptomycin isolates (HLR-S), the gene *ant6'-Ia* was the prevalent. Vancomycin resistant *E. faecalis* (VREfa) showed high rates of resistance to the 14 antimicrobials tested. Among the 42 VREfa isolates, 38 and four isolates harbored *vanA* and *vanB* genotypes, respectively. The genes *efaA*, *eep*, *gelE*, *ace*, *asa1* and *agg* have been identified in almost all of the samples, and a moderate frequency was observed for *cyl* the *esp* gene. The gene *hyl* was not detected from these *E. faecalis* HLAR isolates. The PFGE analysis resulted in the identification of 36 groups, being GP8, GP3 and GP5 the prevalent among HLR-G isolates; GP1, GP8, GP16, GP3 and GP19 among HLR-GS; and GP22, GP2 and GP24 among HLR-S. The MLST analysis revealed 17 STs besides two new STs that were described in this study (ST769 and ST770). The ST6, ST21, ST4 and new ST769 were the most frequent. VRE samples were related to ST6, ST9, ST97, ST103 and to the new ST769. Genes *eep* and *efa* were associated with all STs; however *cyl* was correlated to the CC2 (ST6 and ST2), *esp* to ST21, ST26 and ST40; *gelE* to CC2, CC21, CC388, CC30, ST4, ST9, ST40, ST97 and ST330; *asa1* to mapped to CC2, CC388, ST4, ST9, ST26, ST55, ST97, ST21 and ST330; *agg* to CC2, CC388, ST4, ST9, ST26, ST55, ST97 and ST330; and *ace* to CC2, CC388, ST4, ST9, ST26, ST55, ST97 and ST330. *E. faecalis* HLRA high-risk clones have been described worldwide and the clonal expansion of some of these lineages that included resistance to vancomycin and penicillin including the presence of virulence , highlights the attention to the emergence of more adapted and potentially pathogenic clones in the hospital environment.

Keywords: *Enterococcus faecalis*. Antimicrobial resistance. High-level aminoglycoside resistance. Multilocus sequencing typing. Pulsed-field gel electrophoresis. Bacterial Diversity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Genes, oligonucleotídeos iniciadores e tamanhos dos produtos obtidos nas reações de PCR multiplex utilizadas para caracterização genotípica da resistência e virulência de amostras de <i>Enterococcus faecalis</i>	61
Quadro 2 –	Genes de manutenção celular, oligonucleotídeos iniciadores e tamanhos dos produtos obtidos nas reações de PCR integrantes do esquema de tipificação de amostras de <i>Enterococcus faecalis</i> por metodologia de MLST.....	68
Figura 1 –	Frequência do fenótipo de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLAR) por ano (período de 2005 a 2013), de 742 amostras de <i>E. faecalis</i> oriundas de 11 instituições hospitalares localizadas no estado do Rio de Janeiro.....	70
Figura 2 –	Percentual por ano (A) e curva de distribuição (B) de amostras de <i>E. faecalis</i> de HLAR isoladas em instituições hospitalares do Estado do Rio de Janeiro no período de 2005 a 2013	78
Figura 3 –	Distribuição das amostras de <i>E. faecalis</i> HLAR nas instituições hospitalares de origem	79
Figura 4 –	Distribuição dos fenótipos HLAR de amostras de <i>E. faecalis</i> em relação aos espécimes clínicos de origem	80
Figura 5 –	Gel representativo da caracterização de genótipos de resistência aos glicopeptídeos em 42 amostras de <i>E. faecalis</i> HLAR	82
Figura 6 –	Correlação dos fenótipos HLAR ¹ em amostras de <i>E. faecalis</i> com a concomitante não susceptibilidade a outros antimicrobianos determinada por testes de disco-difusão	85
Figura 7 –	Distribuição dos perfis de multirresistência em amostras de <i>Enterococcus faecalis</i> HLAR isoladas de pacientes hospitalizados em 11 instituições hospitalares localizadas no estado do Rio de Janeiro.....	86

Figura 8 –	Géis representativos dos genótipos de virulência encontrados associados às amostras de <i>E. faecalis</i> HLAR isoladas em instituições hospitalares no Estado do Rio de Janeiro do período de 2005 à 2013..	87
Figura 9 –	Distribuição dos genes de virulência em genótipos de amostras de <i>E. faecalis</i> HLAR isoladas em instituições hospitalares no Estado do Rio de Janeiro no período de 2005 à 2013	88
Figura 10 –	Dendrograma representativo do relacionamento genético de amostras de <i>E. faecalis</i> resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos isoladas de pacientes atendidos em 11 hospitais localizados no estado do Rio de Janeiro, no período de 2005 a 2013.....	97
Figura 11 –	Dados de MLST e a correlação com ano, hospital, origem clínica, fenótipo e genótipo de HLRA, genótipo de resistência à vancomicina, não susceptibilidade penicilina e grupos de PFGE de amostras de <i>E. faecalis</i>	100
Figura 12 –	Dados de MLST e a correlação com ano, hospital, origem clínica, fenótipo e genótipo de HLRA, genótipo de resistência à vancomicina, não susceptibilidade penicilina e grupos de PFGE de amostras de <i>E. faecalis</i> – Complexos Clonais definidos por análise de MLST de amostras <i>E. faecalis</i> resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos isoladas em instituições hospitalares do Estado do Rio de Janeiro no período de 2005 a 2013.....	101
Figura 13 –	Complexos Clonais definidos por análise de MLST de amostras <i>E. faecalis</i> resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos isoladas em instituições hospitalares do Estado do Rio de Janeiro no período de 2005 a 2013	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Distribuição das 306 amostras de <i>E. faecalis</i> resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos em relação ao espécime clínico de origem e ano de isolamento	71
Tabela 2 –	Distribuição das 306 amostras de <i>E. faecalis</i> resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLAR) em relação as instituições hospitalares de origem	72
Tabela 3 –	Distribuição dos genes associados a expressão da resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos em relação aos fenótipos relacionados a essas características identificadas em 306 amostras de <i>E. faecalis</i> isoladas de instituições hospitalares localizadas no estado do Rio de Janeiro no período de 2005 a 2013.....	74
Tabela 4 –	Perfis genotípicos identificados em 306 amostras de <i>Enterococcus faecalis</i> resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLAR)	77
Tabela 5 –	Perfil de susceptibilidade a um painel de 14 antimicrobianos de 306 amostras de <i>E. faecalis</i> HLAR isoladas de instituições hospitalares do Estado do Rio de Janeiro, no período de 2005 a 2013	81
Tabela 6 –	Distribuição das taxas de não susceptibilidade de amostras de <i>E. faecalis</i> HLAR isoladas de instituições hospitalares do Estado Rio de Janeiro por ano de estudo	84
Tabela 7 –	Correlação entre o número de marcadores de virulência e categoria de resistência aos aminoglicosídeos, espécime clínico de origem e resistência a vancomicina em amostras de <i>Enterococcus faecalis</i>	89
Tabela 8 –	Caracterização e distribuição de perfis de virulência entre amostras de <i>E. faecalis</i> HLAR isoladas de pacientes atendidos em instituições do Rio de Janeiro no período de 2005 a 2013.....	91
Tabela 9 –	Distribuição de perfis de virulência entre amostras de <i>E. faecalis</i> HLAR isoladas de pacientes atendidos em instituições do Rio de Janeiro no período de 2005 a 2013.....	92

Tabela 10 – Distribuição dos grupos de PFGE em relação às categorias de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos, ano de isolamento instituições de origem, número de marcadores de resistência e de virulência de amostras de <i>E. faecalis</i> HLAR	96
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAC	Acetiltransferases
Ace	Proteína de superfície
Agg	Substância de agregação
AMC	Amicacina
AMP	Ampicilina
ANT	Nucleotidiltransferases
APH	Fosfotransferases
aroE	chiquimato 5-desidrogenase
AS	Agar Sangue
asaI	substância de agregação;
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BAPS	<i>bayesian analysis of the population structure</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Too</i>
CC	Complexo Clonal
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CHCA	ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
CIM	Concentração inibitória mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
cylA	Citolisina
DHB	2,5-di-hidroxibenzóico
DIB	Dibecamicina
DLV	<i>Double Locus Variable</i>
DNA	Ácido dexosiribinucléico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo Trifosfatado
EARS-Net	Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe
EC	Solução composta de Tris, NaCl, EDTA e Sarcosyl

<i>E. casseliflavus</i>	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
eeP	Determinante de feromônio
efaA	Antígeno A
EMAS	Enzima Modificadora de Aminoglicosídeos
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>E. gallinarum</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>
<i>E. raffinosus</i>	<i>Enterococcus raffinosus</i>
ERI	Eritromicina
ESP	Solução composta de EDTA, Sarcosyl e proteinase K
Esp	proteína de superfície de enterococos
EST	Estreptomicina
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOS	Fosfomicina
FV	Fator de virulência
Gdh	glicose-6-fosfato desidrogenase
geIE	gelatinase;
GEN	Gentamicina
Gki	glicose quinase
GP	Grupo de PFGE
GTP	Guanosina Trifosfato
Gyd	gliceraldeídeos-3-phosphate desidrogenase
H	hora
HiRECCs	<i>high-risk enterococcal CCs</i>
HLGR	Resistência a Níveis Elevados de Gentamicina
HLGSR	Resistência a Níveis Elevados de Gentamicina e Estreptomicina
HLRA	Resistência a Níveis Elevados de Aminoglicosídeos
HLSR	Resistência a Níveis Elevados de Estreptomicina
hyl,	Hialuronidase
IACS	Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde

IS	<i>Insertion sequence</i>
ITU	Infecções do Trato Urinário
KAN	Canamicina
KDa	<i>kilodalton</i>
LAP	L-leucina- β -naftilamida
LEV	Levofloxacina
LPSN	<i>List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature</i>
MALDI-TOF MS	<i>Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight</i>
MHA	Ágar Müeller-Hinton
Min	minuto
MLEE	<i>multilocus enzyme electrophoresis</i>
MLST	<i>multilocus sequence typing</i>
MSCRAMM	<i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>
MSTs	<i>standard minimum spanning trees</i>
N	Número
NET	Netilmicina
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NHSN	<i>National Healthcare Safety Network</i>
NIT	nitrofurantoína;
NOR	Norfloxacina
PAMS	<i>Periodic Antibiotic Monitoring and Supervision</i>
Pb	pares de base
PBPs	Proteína ligadora de Penicilina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEN	Penicilina
PFGE	<i>pulsed-field gel electrophoresis</i>
pH	potencial de hidrogénio iónico
PIV	Solução composta de NaCl e Tris
PM	padão de peso molecular
PMF	<i>peptide mass fingerprint</i>
PRASEF	<i>E. faecalis</i> resistente à penicilina e sensível à ampicilina
pstS	proteína transportadora de cassete de ligação de ATP fosfato
PYR	L-pirrolidonil- β -naftilamida

QRDR	<i>quinolone resistance-determining regions</i>
RAPD-PCR	<i>random-amplified polymorphic DNA-PCR</i>
REA	<i>restriction endonuclease analysis</i>
REP-PCR	<i>repetitive extragenic palindromic sequence – PCR</i>
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RGD	Arg-Gly-Asp
RIF	Rifampicina
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotações por Minuto
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossomal
rRNA 16S	Ácido Ribonucléico ribossomal subunidade 16
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Seg	Segundo
SENTRY	Programa de Vigilância Antimicrobiana
SI	Sem informação
SLV	Solução contendo Tris e EDTA
ST	<i>sequence type</i>
TBE	<i>Single Locus Variable</i>
TE	Tampão composto de Tris, Ácido Bórico e EDTA
TEI	Teicoplanina
TET	Tetraciclina
Tn	Transposon
TOB	Tobramicina
TOF	<i>Time of Flight</i>
U	Unidade
UDP	Uridina-Difosfato
UPGMA	<i>unweighted pair group method of averages</i>
USA	<i>United States of America</i>
UV	Ultra Violeta
V	Versão
VAN	vancomicina
VRE	<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina

VRE	<i>Vancomycin-Resistant Enterococci</i>
VREfa	<i>E. faecalis</i> resistente à vancomicina
VSEfa	<i>E. faecalis</i> sensível à vancomicina
WGS	<i>Whole-Genome Sequencing</i>
Xpt	xantina fosforibosiltransferase
Yqil	acetil-CoA acetiltransferase

LISTA DE SIMBOLOS

H ⁺	Prótons
L	Litro
Mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mM	Milimolar
m/z	massa/carga
NaCl	Cloreto de sódio
Ng	Nanograma
>	Maior
≥	Maior e igual
≤	menor e igual
%	Porcento
°C	Grau Celsius
μ	Micro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	22
1	OBJETIVOS	54
1.1	Geral	54
1.2	Específicos	54
2	MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1	Amostragem	55
2.2	Confirmação da espécie bacteriana e do fenótipo de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLAR)	56
2.2.1	<u>Testes fisiológicos para caracterização de <i>E. faecalis</i></u>	56
2.2.2	<u>Aplicação da metodologia de espectrometria de massas MALDI-TOF (<i>matrix associated laser desorption-ionization time of flight</i>) na caracterização das amostras de <i>E. faecalis</i></u>	58
2.2.3	<u>Caracterização do fenótipo HLAR pelo teste de disco difusão e determinação da concentração inibitória mínima (CIM)</u>	58
2.3	Caracterização dos perfis de resistência aos antimicrobianos, por testes de disco difusão das amostras de <i>Enterococcus faecalis</i> HLAR	59
2.4	Detecção de amostras produtoras de beta-lactamase	60
2.5	Detecção de genótipos de resistência e de virulência	60
2.5.1	<u>Obtenção do DNA molde</u>	62
2.5.2	<u>Detecção dos genótipos associados à resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos</u>	62
2.5.3	<u>Detecção dos genótipos associados à resistência aos glicopeptídeos</u>	63
2.5.4	<u>Detecção dos genótipos associados à expressão de fatores de virulência</u>	64
2.5.5	<u>Eletroforese e análise dos produtos amplificados</u>	65
2.6	Caracterização da Diversidade e Estrutura Populacional de <i>E. faecalis</i>	65
2.6.1	<u>Perfis de fragmentação do DNA cromossômico por eletroforese em campo pulsado (PFGE, <i>pulsed-field gel electrophoresis</i>)</u>	65
2.6.2	<u>Tipificação por sequenciamento de múltiplos loci (MLST, <i>multilocus sequence typing</i>)</u>	66
3	RESULTADOS	69
4	DISCUSSÃO	104

CONCLUSÕES	125
REFERÊNCIAS	127

INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* foi instituído por Schleifer e Kilpper-Bälz, em 1984, respaldados em ferramentas moleculares recém-introduzidas à Taxonomia Bacteriana, para reunir microrganismos até então pertencentes à *Streptococcus*, mas que já eram reconhecidos por diferir em certas características. *Enterococcus* é composto de cocos Gram-positivos, anaeróbicos facultativos e que crescem na faixa de 10°C a 45°C, sendo 36°C a temperatura ótima de crescimento. De forma característica, os membros do gênero são homofermentativos e o ácido lático é o produto final do catabolismo da glicose ou de outros carboidratos. Também, não possuem a enzima citocromo oxidase, sendo negativos no teste da catalase. Entretanto, algumas espécies podem formar uma catalase citoplasmática, quando há aquisição de heme do meio externo. Os principais testes fenotípicos utilizados para a caracterização do gênero incluem a detecção do crescimento em elevadas concentrações de cloreto de sódio (NaCl a 6,5%), hidrólise da esculina em presença de sais biliares e produção das enzimas pirrolidonilarilamidase e leucina aminopeptidase (que hidrolisam os substratos L-pirrolidonil- β -naftilamida - PYR e L-leucina- β -naftilamida - LAP, respectivamente). Entretanto, algumas poucas espécies podem apresentar variações em um ou mais destes testes (BAUREDOR; BARANE; HEDERSTEDT, 2014; SVEC et al., 2001; TEIXEIRA; FACKLAM, 2003, 2007).

As ferramentas moleculares têm contribuído para melhor delinear o arranjo filogenético de *Enterococcus*, que até o momento ainda não está completamente elucidado. Neste ano de 2016, o gênero *Enterococcus* encontra-se composto de 55 espécies, segundo o sítio *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* (LPSN).

A caracterização fisiológica das espécies de enterococos é complexa e o esquema atualmente utilizado é baseado no comportamento destes microrganismos frente às seguintes provas fisiológicas: produção de ácidos a partir do metabolismo de carboidratos (arabinose, manitol, metil- β -D-glicopiranosídeo, rafinose, sacarose, sorbitol e sorbose), descarboxilação do aminoácido arginina, utilização do piruvato de sódio, crescimento em meio contendo 0,04 % de telurito de potássio, produção de pigmento e motilidade (TEIXEIRA et al., 2015).

A ocorrência frequente de amostras atípicas e a grande similaridade entre algumas espécies do gênero, que ampliam a complexidade da caracterização por métodos fenotípicos, levaram ao desenvolvimento de métodos moleculares confirmatórios, menos demorados e laboriosos (KAWALEC et al., 2007; MASTROIANNI, 2009). Dentre as metodologias já sugeridas, a análise dos perfis de proteínas totais, obtida por *Sodium Dodecyl Sulfate-*

PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE), se apresentou como uma ferramenta confiável na caracterização das espécies desse gênero, segundo demonstrado inicialmente no estudo de Merquior et al. (1994).

Entretanto, os protocolos uniplex ou multiplex da metodologia de reação *polimerase chain reaction* (PCR, em português: reação em cadeia da polimerase) são os mais difundidos, permitindo de maneira prática a detecção do gênero e das espécies, principalmente as de maior relevância em infecções humanas (ANGELETTI et al., 2001; DEPARDIEU; PERICHON; COURVALIN, 2004; DUTKA-MALEN; COURVALIN, 1995; FANG et al., 2012; JACKSON; FEDORKA-CRAY; BARRETTT, 2004).

Para a caracterização do gênero *Enterococcus* por metodologia de PCR destacam-se protocolos que buscam sequências alvo dos genes *rrs*, que codifica para o rRNA 16S, ou *tuf*, que é responsável pela expressão do fator de enlogação EF-Tu envolvido na formação da cadeia peptídica durante a síntese protéica (FORTINA et al., 2007; JURKOVIC et al., 2006; KE et al., 1999; PATEL et al., 1998; TEIXEIRA et al., 1995). Para identificação simultânea do gênero e espécies, as propostas disponíveis combinam diferentes oligonucleotídeos iniciadores desenhados a partir do sequenciamento de fragmentos de genes conservados e envolvidos com a manutenção celular. Assim, além do alvo utilizado para caracterização do gênero (frequentemente *tuf*), os genes específicos mais utilizados para detecção das espécies são *ddl*, *sodA* e *groESL*. Tais protocolos têm sido constantemente aprimorados e se mostram úteis até mesmo na caracterização de amostras com comportamento atípico nos testes fenotípicos convencionais (EISNER et al., 2005; FANG et al., 2012; RAHIMI et al., 2007; TSAI et al., 2005; YEAN et al., 2007;).

Outra metodologia que cada vez mais vem sendo empregada é a *matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS, em português: espectrometria de massa por tempo de voo com ionização de dessorção a laser assistida por matriz). A idéia de usar a espectrometria de massa para identificação de bactérias foi proposta em 1975 (ANHALT; FENSELAU, 1975), embora na época não fosse possível analisar proteínas intactas porque eram fragmentadas no processo. Nos anos 1980, foi desenvolvida tecnologia para a análise de macromoléculas intactas, permitindo a análise de proteínas inteiras. A metodologia de MALDI foi reportada em 1985 por Hillenkamp ; Karas, que descreveram o método de alta sensibilidade pela utilização de pequenos compostos orgânicos como uma matriz que absorve a radiação a laser. Em sequência, Tanaka et al. (1988) descreveram um método de ionização por dessorção ultrafina usando pó de metal e glicerol que permitiu a análise espectrométrica de massa de macromoléculas biológicas, para a qual

foi laureado com o Prêmio Nobel de Química, em 2002. Ainda no final dos anos 1980, Karas e Hillenkamp (1988) relataram ionização de desorção ultrafina usando uma matriz de composto orgânico.

A partir de então, a metodologia de MALDI passou a ser cada vez mais eficaz, sendo possível a geração de íons individualmente protonados a partir de analitos, que são detectados e medidos utilizando diferentes analisadores de massas (BEAVIS; CHAIT; STANDING, 1989; BIER et al., 2010; KARAS; BAHR, 1990; KRUTCHINSKY et al., 2001; PASATOLIC et al., 1995). Em estudos de Microbiologia, analisadores TOF têm sido os mais utilizados bem como as matrizes constituídas de ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico (ácido sinapínico), ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA, alfa-ciano ou alfa-matriz) e 2,5-dihidroxibenzóico (DHB) representam as de maior aplicação (KORFMACHER; WALTER, 2009; RUOTOLO et al., 2004). Os avanços em tecnologia da informação/ciência da computação e desenvolvimento de bancos de dados abrangentes e bem validados de espectros de massa representando diversos tipos de bactérias e fungos possibilitaram a automação do MALDI-TOF MS e análise de dados associados, fornecendo uma ferramenta para identificação de organismos e aplicação ao diagnóstico microbiológico. Para microrganismos utiliza-se uma gama de massa de 2 kDa a 20 kDa, que representam principalmente proteínas ribossômicas, que representam de 60% a 70% do peso seco da célula microbiana nesta faixa de massa (MURRY, 2012).

Os sistemas disponíveis e mais utilizados para a caracterização bacteriana empregando MALDI-TOF são: *MALDI Biotyper Systems*, comercializado pela Bruker Co. (Billerica, MA, EUA); e *VITEK® MS*, da bioMérieux (Marcy-l'Étoile, França) (FANG et al., 2012; LUO et al., 2015; PATEL, 2015; RYCHERT et al., 2013). É reconhecido que o emprego desses sistemas comerciais na caracterização bacteriana, particularmente no diagnóstico das infecções humanas, tem representado um avanço nessa área, por conjugar a rapidez dos resultados com o baixo custo do teste, apesar do equipamento ainda apresentar um valor elevado (BAILLIE et al., 2013; EIGNER et al., 2009; GIEBEL et al., 2008; RYCHERT et al., 2013; SEGAWA et al., 2014; SENG et al., 2009, vAN VEEN et al., 2010;). Diversos estudos têm demonstrado que o seu emprego é eficaz na caracterização das espécies de *Enterococcus*. Sendo particularmente útil na identificação precisa a partir de amostras de hemoculturas, onde a rapidez e eficácia na caracterização são de destacada relevância, definindo precocemente condutas terapêuticas que podem vir a determinar um melhor prognóstico para infecções graves (BIZZINI; GREUB, 2010; BUCHAN et al., 2014; SANTOS et al., 2015; STEVENSON et al., 2010).

Os enterococos podem causar uma variedade de infecções monomicrobianas e polimicrobianas, principalmente em pacientes imunodeprimidos. As principais são: as infecções do trato urinário, bacteremias, endocardites, de feridas cirúrgicas e crônicas (incluindo úlceras de decúbito), intra-abdominais e do trato biliar (DESHPANDE *et. al.*, 2007; GOŁĘBIEWSKA; DEBSKA-ŚLIZIENÍ; RUTKOWSKI, 2014; HOLLAND; FOWLER; SHELBURNE, 2014; ZIRAKZADEH; PATEL, 2006). Além destas, estes microrganismos também podem estar associados às infecções trato respiratório ou do sistema nervoso central, porém os registros na literatura são mais raros (HANCOCK; GILMORE, 2000; RICHARD *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2014).

Dados publicados em 2013 no documento do *National Healthcare Safety Network* (NHSN, divulgado por *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC, Atlanta, EUA), apontam o gênero *Enterococcus* como o segundo patógeno em prevalência dentre os causadores de infecções associadas aos cuidados de saúde (IACS) nos Estados Unidos da América (SIEVERT *et al.*, 2013). Dados europeus de 2011 e 2012 informaram que *Enterococcus* foram um dos microrganismos mais comumente isolados em IACS (*European Center for Disease Prevention and Control*, 2013). Em estudos mais abrangentes, reunindo informações de diversas regiões geográficas, os enterococos já foram apontados como responsáveis por aproximadamente 10% de todas as bacteremias de etiologia bacteriana (PINHOL *et al.*, 2013).

A grande maioria das IACS de etiologia enterocócica é historicamente atribuída à espécie *Enterococcus faecalis*, correspondendo a 80% – 90% dos casos, seguida por *Enterococcus faecium*, responsável por 5%-10%. Entretanto, desde o início da década de 1990, a proporção dessas infecções associadas à espécie *E. faecium* tem aumentado consideravelmente em diversos países (BILLINGTON *et al.*, 2014; SIEVERT *et al.*, 2013, vAN HAL *et al.*, 2016; WILLEMS *et al.*, 2012). Provavelmente, deve-se a isto o reconhecimento de que, em geral, a espécie *E. faecium* apresenta taxas de resistência mais elevadas a diversos antimicrobianos, incluindo ampicilina e vancomicina (BILLSTRÖM *et al.*, 2008; GALLOWAY-PEÑA *et al.*, 2011; LEAVIS *et al.*, 2006; LESTER *et al.*, 2008; 2010; TOP *et al.*, 2008, vAN SCHAİK *et al.*, 2010).

Outras espécies, tais como *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus raffinosus*, quando em frequência elevada estão envolvidas em surtos específicos (CHIRURGI *et al.*, 1992; GORDON *et al.*, 1992; JETT *et al.*, 1994; KAWALEC

et al., 2007; PATTERSON et al., 1995; RUOFF et al., 1990). Além destas, as espécies *Enterococcus cecorum* e *Enterococcus canintestini* também já foram relatadas em casos de bacteremia em humanos (TAN et al., 2010).

Entretanto, fatores e mecanismos de virulência que possam contribuir para o esclarecimento da capacidade dos enterococos de causar doenças em humanos, ainda não foram completamente elucidados. Nos últimos 20 anos, diversos estudos tem se dedicado a identificar esses determinantes de virulência e caracterizar seus mecanismos de ação e envolvimento na patogênese das infecções humanas (ANDERSON et al., 2016; FRANK et al., 2015; KOCH et al., 2004; LEBRETON et al., 2009; PINKSTON et al., 2011; RICH et al., 1999; SHANKAR, et al., 2001; SINGH; NALLAPAREDDY; MURRAY, 2007; SINGH et al., 2010, vAN TYNE, MARTIN, ; GILMORE, 2013). O uso de modelos experimentais (cultura de células, modelos animais e outros) têm gerado resultados promissores; porém, suas inerentes limitações restringem as possibilidades de extrapolação dos resultados para patogênese das infecções humanas (ENGLEMANN et al., 2011; GUITON et al., 2010; LEBRETON et al., 2009; ZISCHKA et al., 2015).

Genes responsáveis pela expressão de virulência mais comumente encontrados em enterococos são os responsáveis por codificar para adesinas, enzimas proteolíticas e para uma toxina com atividade citolítica. São eles: *asa1*, *asc10*, *asa373* e *ash701* que codificam para uma estrutura proteica de superfície que promove a formação de agregados celulares, a substância de agregação (Agg), e pode aumentar a adesão às células do hospedeiro (GALLI; LOTTSPREICH; WIRTH, 1990); *efa* que codifica para uma proteína de adesão denominada antígeno A ou *E. faecalis* endocarditis antigen (EfaA) (LOWE; LAMBERT; SMITH, 1995); *ace* corresponde a proteína adhesin to collagen of *E. faecalis* (Ace), que é uma adesina específica para componentes da matriz celular, como por exemplo colágeno, fazendo portanto parte da família de proteínas *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMM) (NALLAPAREDDY et al., 2000; RICH et al., 1999); *esp* é responsável pela expressão de uma proteína de superfície, dita *enterococcal surface protein* (Esp), que acredita-se contribuir para a colonização e persistência no hospedeiro (SHANKAR et al., 2001); *hyl* codifica para uma enzima hialuronidase, que em outros gêneros de bactérias Gram-positivas está melhor caracterizada, sendo capaz de degradar componentes da matriz extracelular, facilitando o processo de invasão (RICE et al., 2003); *gelE*, que codifica para uma metaloendopeptidase extracelular, também reconhecida como gelatinase, capaz de hidrolisar gelatina, caseína e colágeno (KOCH et al., 2004); *eep* que codifica uma proteína de membrana, a *enhanced expression of pheromone* (Eep), que foi primeiramente relacionada a

regulação da expressão de feromônio, porém está também associada a outras funções como formação de biofilme e resistência à lisozima (FRANK et al., 2013); operon *cyl* (composto pelos genes *cyl-A*, *-B*, *-I*, *-LL*, *-Ls*, *-M*, *-R1* e *R2*) responsável pela expressão de uma toxina citolítica (SEMEDO et al., 2003).

Em geral, a maior incidência de fatores de virulência é descrita na espécie *E. faecalis*, se comparado com as demais espécies do gênero. Como esta espécie é a mais frequente nas infecções graves (como bacteremias e endocardites), considera-se que tal fato reforce a evidência de que tais fatores estejam envolvidos na patogenicidade destes microrganismos (ABRIOUEL et al., 2008; EATON; GASSON, 2001; GUZMAN PRIETO et al., 2016; SAVA; HEIKENS; HUEBNER, 2010).

Características de virulência podem ser transmitidas entre linhagens de *Enterococcus*, visto que estes microrganismos são eficientes quanto aos mecanismos de transferência horizontal de genes. O sistema de conjugação envolvendo trocas de plasmídeos e transposons é frequente entre os enterococos contribuindo na transmissão tanto de genes de virulência, como também de resistência aos antimicrobianos. A linhagem doadora, quando exposta a feromônios (produzidos e liberados pela linhagem receptora) é induzida a sintetizar uma proteína de superfície específica, a Agg, codificada por genes plasmidiais. Já foram descritos quatro plasmídeos que carregam genes que codificam para Agg na espécie *E. faecalis*, são eles: pAD1, pCF10, pPD1 e pAM373. Além do feromônio, o soro humano também induz a produção de Agg, sugerindo que estes microrganismos possam formar grandes agregados celulares *in vivo*. Também, já foi observado que Agg confere adesão às células do túbulo renal; promove a interação direta (independente de opsonização) de *E. faecalis* com neutrófilos humanos e aumenta a sobrevivência dos microrganismos dentro destas células; e facilita a internalização de *E. faecalis* por enterócitos (BHATTY et al., 2014; CLEWELL et al., 2014; GUZMAN PRIETO et al., 2016; MUNDY et al., 2000; WARDAL; SADOWY; HRYNIEWICZ, 2010).

A proteína EfaA foi primeiramente identificada no soro de um paciente apresentando endocardite por *E. faecalis*. Possui homologia de 55% a 60%, em sua sequência de aminoácidos, com adesinas reconhecidas em espécies de *Streptococcus*, como FimA de *S. parasanguis*, SsaB de *S. sanguis*, ScaA de *S. gordonii* e PsaA de *S. pneumoniae* (LOWE, LAMBERT ; SMITH, 1995). Estudos anteriores já identificaram a presença de *efaA* na quase totalidade das amostras de *E. faecalis* de origem hospitalar (CREAT et al., 2004; EATON; GASSON, 2001), como também das isoladas de infecções endodônticas (SONG et al., 2012; ZOLLETI et al., 2011).

A proteína Ace está presente na superfície celular de amostras de *E. faecalis* e é característica desta espécie. Como já mencionado anteriormente, é responsável pela interação da bactéria com proteínas da matriz extracelular, particularmente colágeno dos tipos I e IV, além de laminina e dentina (KOCH et al., 2004; KOWALSKI et al., 2006; NALLAPAREDDY et al., 2000). Singh et al. (2010) confirmaram através de um modelo de endocardite animal que a deleção do gene *ace* resulta em uma significativa atenuação da capacidade de *E. faecalis* em colonizar válvulas aórticas e causar endocardite, desempenhando uma importante função nos estágios iniciais da colonização, possivelmente, por mediar aderência de *E. faecalis* ao colágeno exposto no sítio de injúria vascular. É reconhecido, também, que a expressão de Ace é aumentada em presença de soro, sais biliares, urina, colágeno e na temperatura de 46°C (HENDRICKX et al., 2009; SHEPARD; GILMORE, 2002). Entretanto, os mecanismos de regulação dessa expressão ainda não estão completamente elucidados. Lebreton et al. (2009) propuseram que a expressão do gene *ace* é negativamente controlada por um regulador transcricional, o *enterococcal regulator of survival* (Ers, em português: regulador transcricional de sobrevivência de enterococos). Mais tarde, Cohen et al. (2013) refutaram essa hipótese, demonstrando níveis similares de expressão em mutantes obtidos pela deleção do gene (Δ ers). Mais recentemente, Roh et al. (2015) atribuíram a regulação de Ace a um sistema regulador de dois componentes, designado *global regulator of virulence* (GrvRS), e homólogo aos já descritos em outros patógenos Gram-positivos, como CovRS de *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus agalactiae* e LisRK de *Listeria monocytogenes*. Cabe ressaltar que ambos apresentam importância destacada na patogênese desses microrganismos e que o sistema CovRS também responde a estímulos ambientais determinados por componentes, ainda não identificados, presentes no sangue (CHURCHWARD, 2007).

A proteína de superfície de enterococos Esp foi descoberta e descrita a partir de uma linhagem de *E. faecalis* responsável por diversas infecções em pacientes hospitalizados em uma instituição nos EUA (SHANKAR et al., 1999). O gene estrutural (*esp*) é único, mas pode permitir formas alternativas da expressão da proteína, contribuindo, assim, para a habilidade de *E. faecalis* em não ser facilmente detectado pelo sistema imunológico do hospedeiro, permitindo sua persistência no sítio infeccioso. Esp é uma proteína grande (~ 202 kDa ou cerca de 1.873 aminoácidos) com uma estrutura muito interessante, apresentando em sua região central unidades repetidas *in tandem*, um domínio C-terminal e um domínio globular N-terminal. Acredita-se que a região repetida central desempenhe o papel de “um braço” capaz de retrair e estender o domínio globular N-terminal através da parede celular para a

superfície da célula. As principais funções atribuídas a esta proteína são: promover adesão, colonização e evasão do sistema imune e contribuir para a formação de biofilmes (FISHER; PHILLIPS, 2009; HEIKENS et al., 2007; LATASA et al., 2006;). Apesar de estudos mais recentes questionarem a importância de Esp na formação de biofilmes por enterococos (BISWAS et al., 2016; IRA; SUJATHA; CHANDRA, 2013).

Além disso, a proteína Esp é considerada um marcador de linhagens multirresistentes de *E. faecium*, associadas ao ambiente hospitalar e mundialmente dispersas. Sabe-se também que é codificada em ilhas de patogenicidade distintas em *E. faecalis* e em *E. faecium* (neste caso designada Esp_{fm}) e que é uma adesina importante para células epiteliais (TOP; WILLEMS; BONTEN, 2008). Um estudo recente de Zou e Shankar (2016), utilizando uma amostra de *E. faecalis* produtora de Esp, seu mutante isogênico deficiente desta proteína e a proteína purificada demonstrou que a sua presença é suficiente para ativar NF- κ B e subsequente produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF α por macrófagos *in vitro*. Os mesmos autores também avaliaram a participação desta proteína em infecção experimental em ratos. Os resultados revelaram que a amostra selvagem determinou a presença de níveis mais elevados de TNF α , IL-1 β e IL-6, além de um maior grau de dano tissular hepático, do que o observado com a amostra bacteriana mutante deficiente de Esp. Assim, concluíram que Esp deva ser um importante fator de virulência em enterococos, podendo modular o processo inflamatório durante a infecção, possivelmente desempenhando papel fundamental na patogênese das enterococcias.

Hialuronidases são enzimas reconhecidas como importantes fatores de virulência já relacionados a outros patógenos Gram-positivos como, por exemplo, diferentes espécies de *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* entre outros (HENNINGHAM et al., 2014; HISCOX et al., 2011; IBBERSON et al., 2014; LO; CHENG, 2015; MANEERAT et al., 2013; WANG et al., 2014). Atuam de forma degradativa sobre a fração mucopolissacarídica (ácido hialurônico) do tecido conjuntivo estando, portanto, associadas ao dano tissular no hospedeiro e a disseminação do microrganismo, bem como de suas toxinas (FISHER; PHILLIPS, 2009). Em enterococos, a descoberta do gene responsável pela expressão de hialuronidase foi registrada primeiramente por Rice et al., em 2003, em uma amostra clínica de *E. faecium* apresentando resistência múltipla aos antimicrobianos. Estudos posteriores têm relatado uma forte associação entre a presença do gene *hyl* e a espécie *E. faecium* (FREITAS et al., 2010; PANESSO et al., 2011; PADMASINI et al., 2014; GULHAN et al., 2015; YANG et al., 2015). Dados na literatura que registrem a presença

deste gene em amostras de *E. faecalis* ou em outras espécies de enterococos são extremamente raros (NASAJ et al., 2016).

A gelatinase (GelE) é uma zinco metaloendopeptidase extracelular codificada pelo gene *gelE*, cotranscrita com uma serina protease (SprE) codificada pelo gene *sprE*. Hidrolisa a gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros compostos bioativos (VERGIS et al., 2002). Em enterococos, Eaton e Gasson (2001) demonstraram a presença de gelatinase tanto em amostras clínicas, quanto nas utilizadas como probióticos e como culturas *starter* em processos fermentativos. Neste mesmo estudo, os autores demonstraram que o gene *gelE* também foi detectado em amostras que não apresentaram a atividade enzimática e sugeriram que a expressão da gelatinase é deflagrada por fatores ambientais específicos. Sabe-se, entretanto, que a expressão de gelatinase é regulada por um sistema de *quorum sensing* e que sua regulação, mediada pelo complexo gênico *fsr* (*fsrA*, *B*, *C* e *D*), que está localizado a montante (no inglês, *upstream*) de *gelE* e *sprE*. Este complexo gênico se assemelha ao sistema *accessory gene regulator* (Agr) que é importante na regulação da expressão da virulência de *S. aureus* (DESOUKY et al., 2013). A ocorrência de mutação, inserção ou deleção, em um ou mais destes quatro genes do complexo *fsr*, pode comprometer a expressão da gelatinase (PEREZ et al., 2015; STRZELECKI; HRYNIEWICZ; SADOWY, 2011). A gelatinase enterocócica já foi, também, apontada como responsável pela estabilidade de Asc10 (substância de agregação), desempenhando a função de remover da parede celular bacteriana as proteínas deficientes (WATERS et al., 2003). Roberts et al. (2004) demonstraram que a presença do locus *fsr* e gelatinase agravam as infecções causadas por *E. faecalis* em modelos animais, porém estudos clínicos mais controlados são necessários para determinar se estes fatores afetam o curso das infecções humanas.

A proteína Eep é uma zinco metaloprotease ligada à membrana celular que, como já comentado anteriormente, está associada à regulação de feromônios (principalmente, cAD1, cPD1 e cCF10), bem como na produção de peptídeos inibidores (como, iCF10 e iAD1). O mecanismo de regulação ainda não está completamente esclarecido, mas aparentemente ocorre por clivagem enzimática intramembrana, durante a exportação dessas moléculas para o meio extracelular (CHANDLER; DUNNY, 2008). Frank et al. (2012) relataram que Eep se mostrou como um importante fator de virulência de enterococos, em infecção experimental de válvula cardíaca, por uma amostra de *E. faecalis* apresentando o gene *eep*. Em outros estudos do mesmo grupo (FRANK et al., 2013; 2015) foi observado que esta proteína está associada à formação de biofilme em válvula cardíaca e infecções por cateteres, em modelos experimentais de endocardite em coelhos e trato urinário em ratos, respectivamente, pois

amostras mutantes *Δeep* foram incapazes de formar estruturas maduras e mostraram-se fortemente atenuadas, quando comparadas à amostra selvagem.

Também, Varahan et al. (2013) demonstraram que a proteína Eep auxilia na resistência de *E. faecalis* ao estresse ambiental, principalmente pela presença de lisozima, um importante componente da imunidade inata. Os autores demonstraram que Eep atua na proteólise intramembrana do fator anti-sigma RsiV, levando a maior ativação e produção de SigV. Este último (SigV) é um fator sigma *extracytoplasmic function* (ECF), que está relacionado à regulação de enzimas modificadoras voltadas à renovação (no inglês, *turnover*) da parede celular. Assim, os autores concluíram que uma maior concentração de SigV, determinada pela ação proteolítica de Eep em RsiV, contribui para resistência frente à lisozima.

A citolisina foi descrita em amostras da espécie *E. faecalis* atuando em células eucarióticas, incluindo leucócitos polimorfonucleares e enterócitos humanos, além de atividade hemolítica contra eritrócitos de cavalo, bovinos, de coelho e humanos. Também possui atividade de bacteriocina contra diversos gêneros e espécies de bactérias Gram-positivas. O operon *cyl* é encontrado em plasmídeos, cuja propagação e indução são determinadas por feromônios; podendo também estar localizado em uma ilha de patogenicidade no cromossomo (TYNE; MARTIN; GILMORE, 2013).

A expressão dos genes da citolisina, que ocorre normalmente em níveis basais, é realizada por um par de promotores divergentes e que se sobrepõem. A proteína efetora da lise (codificada pelos genes *cylL_L* e *cylL_S*) é heterodimérica, apresentando uma subunidade maior, denominada CylL_L, e outra menor, a CylL_S, que possuem resíduos de lantionina. Estas subunidades sofrem modificação pós-traducional por ação de CylM (produto de *cylM*), sendo em seguida secretadas com auxílio da proteína transmembrana CylB (codificada por *cylB*). Uma vez no exterior da célula as subunidades de CylL sofrem remoção proteolítica de seis resíduos aminoterminais, conferida por CylA (codificada por *cylA*), uma serina protease da classe das subtilisinas. Essa clivagem determina que as subunidades interajam, formando um complexo oligomérico sem atividade citolítica; porém, com afinidade por CylR1 (codificada por *cylR1*), que em sequência ativa CylR2 (codificada por *cylR2*), que se liga a uma das regiões promotoras, reprimindo a expressão das proteínas efetoras em concentrações elevadas (COX; COBURN; GILMORE, 2005; RUMPEL et al., 2004; SHANKAR et al., 2004).

Na presença do alvo, a fração CylL_L da proteína oligomérica se liga, preferencialmente, a essa célula por possuir maior afinidade por resíduos de fosfatidilcolina e colesterol presente nas membranas de procariotos e eucariotos, respectivamente, deixando

CylL_S livre. A transcrição em altas concentrações das proteínas efetoras da lise celular é então desreprimida por um processo de *quorum sensing*, onde CylL_S ativo, decorrente dos dois processos de proteólise (passando a ser designado como CylL_S''), funciona como autoindutor que se acumula no meio e liga-se de maneira diferencial a CylR1, não permitindo ativação de CylR2, deixando o promotor livre para transcrição. A proteína transmembrana CylI (codificada pelo gene *cylI*) confere imunidade à célula produtora, conforme foi observado em estudos envolvendo mutagênese por deleção, clonagem e análises por complementação (GARSIN, 2004; TYNE; MARTIN; GILMORE, 2013). Entretanto, o mecanismo que leva a tal proteção ainda não foi completamente elucidado.

Amostras de *E. faecalis* produtoras de hemolisina têm sido associadas aos quadros infecciosos de maior gravidade, destacando-se em clones característicos que exibem uma maior capacidade de virulência (ANDERSON et al., 2016; TYNE, MARTIN ; GILMORE, 2013). Também, Day et al. (2003) descreveram a importância da tensão de oxigênio para a expressão dos genes *cylLL* e *cylLS* e, ainda, descrevem que a identificação de um possível fator de transcrição pode ser alvo para desenvolvimento de novas terapias ou, até mesmo, inibir infecções por *E. faecalis*.

Portanto, considerando as avaliações a cerca das características de virulência de enterococos sabe-se que, apesar desse aspecto ainda não estar bem esclarecido, diversos estudos epidemiológicos têm demonstrado a existência da relação de alguns clones específicos com a ocorrência de surtos hospitalares. Esses clones correspondem a linhagens virulentas, que também exibem características de resistência a vários antimicrobianos, sendo descritas como responsáveis por infecções de proporções epidêmicas (DE MELLO et al., 2016; OCHOA et al., 2013; PANESSO et al., 2010, vAN HAL et al., 2016; YANG et al., 2015).

Uma característica importante dos enterococos é a presença de resistência intrínseca, além da progressiva resistência adquirida aos antimicrobianos, particularmente os que frequentemente são utilizados no tratamento de infecções por bactérias Gram-positivas. Os vários perfis intrínsecos exibidos pelos enterococos incluem a resistência aos beta-lactâmicos, ao trimetoprim-sulfametoxazol, a concentrações baixas de aminoglicosídeos, clindamicina, vancomicina (nas espécies móveis, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*), e a quinupristina/dalfopristina (apenas em *E. faecalis*) (BIEDENBACH et al., 2010; HIGUITA; HUYCKE, 2014; LECLERCQ et al., 1992; MURRAY et al., 1990). Mecanismos adquiridos, decorrentes de mutações ou aquisição de DNA extracromossômico, como plasmídeos e transposons, quando expressos, induzem resistência a níveis elevados de beta-lactâmicos,

aminoglicosídeos (como gentamicina e estreptomicina), glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina), cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, clindamicina, fluoroquinolonas (por exemplo, ciprofloxacina), linezolida e quinupristina/dalfopristina (MURRAY, 1998; SOLTANI et al., 2000, vALDEZATE et al., 2009).

A elevada frequência de *Enterococcus* em ICAS está diretamente associada à aquisição de resistência aos antimicrobianos pertencentes às classes aminoglicosídeos, glicopeptídeos e beta-lactâmicos. Nessas infecções, as altas taxas de resistência aos antimicrobianos, particularmente decorrentes da presença de mecanismos adquiridos, que facilitam a disseminação contínua dos diferentes elementos genéticos relacionados, permanecem um grande desafio ao seu controle, sendo um problema de saúde pública mundial (BRODRICK et al., 2016; CHEAH et al., 2013; DIAZ GRANADOS et al., 2005; EARS-Net, 2012; JONES et al., 2013).

Amostras de enterococos apresentando *high-level aminoglycoside resistance* (HLAR, em português: resistência adquirida a níveis elevados de aminoglicosídeos) são relatadas mundialmente e é reconhecido que a avaliação contínua da distribuição desta característica tem elevado valor epidemiológico, sendo necessária ao seu controle (DADA et al., 2013; OSUKA et al., 2016; QU et al., 2006; SAEEDI et al., 2004; SIMONSEN et al., 2003; ZARRILLI et al., 2005;).

As enterococcias graves (bacteremia, endocardite e todas as IACS complicadas) têm sido comumente tratadas com antimicrobianos ativos na parede celular, tais como beta-lactâmicos e glicopeptídeos, associados aos aminoglicosídeos. Esta combinação determina um efeito sinérgico muito recomendado nesses casos (ARIAS et al., 2010; BODMANN et al., 2005; GRAHAM et al., 2002; NGUYEN et al., 2006; PERICÁS et al., 2015; RAO et al., 2006). O sinergismo ocorre, presumivelmente, como o resultado da maior captação do aminoglicosídeo, devido ao aumento da permeabilidade exercida por inibidores da síntese de parede celular (MOELLERING et al., 1971). Por outro lado, infecções causadas por amostras apresentando HLAR não respondem positivamente, sendo refratárias ao efeito sinérgico, resultando em uma importante redução das opções terapêuticas, particularmente para os casos graves (AGARWAL; KALYAN; SINGH, 2009; ARIAS et al., 2010; CETINKAYA et al., 2000; LEONE; NOVIELLO; ESPOSITO, 2016).

A estreptomicina (EST) foi amplamente utilizada em um esquema terapêutico combinada à penicilina no período de 1945 a 1970 (NOSKIN et al., 1991). Entretanto, já no início dos anos 1970 foi observada a emergência de amostras de enterococos apresentando resistência a níveis elevados de estreptomicina, reconhecidas por *high-level streptomycin*

resistance (HLSR) (MOELLERING et al., 1971). Como consequência, a combinação de penicilina (ou ampicilina) e gentamicina (GEN) passou a ser a escolha para o tratamento das enterococcias; porém logo em seguida, foi detectada a emergência de amostras apresentando níveis elevados de resistência a este aminoglicosídeo, comumente designadas *high-level gentamicin resistance* (HLGR). Amostras de enterococos apresentando HLAR são, geralmente, caracterizadas por apresentarem concentração inibitória mínima (CIM) para gentamicina $\geq 500 \mu\text{g/mL}$ e/ou para estreptomicina $\geq 2.000 \mu\text{g/mL}$ (LOW et al., 1994; MOELLERING et al, 1980;).

As chamadas enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, ou EMAs, constituem o principal mecanismo associado a resistência a níveis elevados desses antimicrobianos. Essas enzimas podem ser fosfotransferases (APH), que têm ação catalítica na fosforilação (GTP ou ATP-dependente) de um grupo hidroxila do antimicrobiano; acetiltransferases (AAC), que têm ação catalítica na reação de acetilação (acetil CoA-dependente) de um grupo amino do antimicrobiano; e nucleotidiltransferases (ANT), que catalisam a adenilação (ATP-dependente) de um grupo hidroxila do antimicrobiano. Os respectivos genes responsáveis pela expressão destas enzimas são amplamente dispersos por mecanismos de transferência horizontal (KLARE et al., 2003; KOTRA et al., 2000). Adicionalmente, o fenótipo HLSR pode também ser decorrente de mutação no sítio alvo ribossomal (MURRAY, 1990). Dentre as EMAs já identificadas em enterococos, destacam-se: AAC(6')-APH(2''), codificada pelo gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, é uma enzima bifuncional que confere resistência a níveis elevados para todos os aminoglicosídeos disponíveis comercialmente, exceto para EST; APH(2'')-Ib (detectada somente em amostras clínicas de *E. faecium*) e APH(2'')-Id, codificadas por *aph(2'')-Ib* e *aph(2'')-Id*, respectivamente, conferem resistência a GEN, tobramicina (TOB), canamicina (KAN), netilmicina (NET) e dibecamicina (DIB); APH(2'')-Ic, codificada por *aph(2'')-Ic*, confere resistência a DIB, GEN, TOB e KAN, mas não a NET; APH(3')-IIIa, codificada por *aph(3')-IIIa*, confere resistência a KAN e amicacina (AMC), e apesar de resultar em valores de CIM de $64 \mu\text{g/mL}$ a $256 \mu\text{g/mL}$, as amostras bacterianas mostram-se *in vivo* resistentes à terapia combinada com beta-lactâmico; AAC(6')-Ii, codificada pelo gene *aac(6')-Ii*, confere resistência a KAN, NET, sisomicina (SIS) e TOB e foi encontrada somente em *E. faecium*; ANT(4')-Ia, codificada por *ant(4')-Ia*, confere resistência a AMC, DIB, KAN e TOB; e as enzimas ANT(6')-Ia, ANT(3')-Ia, ANT(9')-Ia e ANT(9')-Ib [codificadas por *ant(6')-Ia*, *ant(3')-Ia*, *ant(9')-Ia* e *ant(9')-Ib*, respectivamente] conferem resistência somente a estreptomicina (LEE et al., 2002; KLARE et al., 2003; MAHBUB et al., 2005; RAMIREZ; TOLMASKY, 2010).

Já foi descrita uma variedade de plasmídeos conjugativos e não-conjugativos codificando EMAs responsáveis pela característica HLGR em *E. faecalis*, que também se mostram bastante diversos para áreas geográficas distintas (HEGSTAD et al., 2010; HODEL-CHRISTIAN; MURRAY, 1992). Também, os genes responsáveis por esta característica de resistência já foram relacionados à transposons, como: Tn5281 que é similar a Tn4001 e Tn4031 já descritos em *Staphylococcus*; e Tn924, Tn5384 e Tn5385 que foram identificados inseridos em plasmídeos (HALLGREN et al., 2003; HEGSTAD et al., 2010; MIKALSEN et al., 2015).

Os dados epidemiológicos apontam que apesar de uma relativa redução na frequência de amostras de enterococos apresentando HLAR, essa característica de resistência está bastante difundida em instituições hospitalares em várias partes do mundo, incluindo o Brasil, resultando em limitações no tratamento das enterococcias, particularmente as de maior gravidade e de origem hospitalar. Considerando as taxas de *Enterococcus* HLAR nas Américas, o Programa *SENTRY Antimicrobial Surveillance Program* (SENTRY), que é um programa mundial e longitudinal de vigilância, reportou valores de 37,2%, 43,7% e 45,5% para amostras de *E. faecalis* HLGR isoladas de infecções da corrente sanguínea nos Estados Unidos, Canadá e países da América Latina, respectivamente, no ano de 1997 (PFALLER et al., 1999). Já em 2003, as taxas compiladas foram de 48,7% para *E. faecalis* HLGR isoladas em hospitais de países norte-americanos (DESHPANDE et al. 2007). Em 2006, Andrade et al. reportaram taxas de 23,5% para HLGR e 29,4% para HLSR em amostras de *Enterococcus* isoladas em hospitais da América Latina, a partir de quadros de infecção do trato urinário. Ainda considerando países da América Latina, um estudo avaliando o período compreendido entre os anos de 2003 a 2008 registrou valores de frequência de 31% e 27,2% para HLGR e HLSR, respectivamente (SADER; MOET; JONES, 2009). Na Argentina, em 2014, dados da *Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos* (ReLAVRA), uma outra rede de monitoramento e vigilância de resistência aos antimicrobianos, registrou índices de 20,7% para HLGR e 14% para HLSR para amostras de enterococos de origem hospitalar. Mais recentemente, de acordo com *Canadian Antimicrobial Resistance Surveillance System Report* (2016), houve uma redução das taxas de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos, considerando-se os anos de 2009 a 2014 e dentre amostras isoladas de hospitais canadenses (de 54% para 38%, HLSR; e de 23% para 10%, HLGR; respectivamente).

Mais especificamente, no Brasil, dois estudos pioneiros de nosso grupo registraram taxas de HLAR que variaram de 30% a 55%, para amostras de enterococos isoladas de

instituições hospitalares localizadas no Estado do Rio de Janeiro (STERN et al., 1994; MERQUIOR et al., 1997). Dados do Programa SENTRY, relativos ao período de 1997 a 1999, registraram que cerca de 30% das amostras brasileiras avaliadas apresentaram HLAR (SADER et al., 2001). Já no período de 2005 a 2008, dados deste mesmo programa compilaram índices de 29,4% para HLGR e 25,3% para HLSR entre amostras de *E. faecalis* (GALES et al., 2009). Porém, neste mesmo estudo, foi observado que dentre as amostras de *E. faecalis* resistentes à vancomicina, os índices de HLGR foram de 63,5%. Dados mais recentes incluem o estudo de Conceição et al. (2011) que cobriu o período de 2006 a 2009 e de Marra et al. (2011) com amostras isoladas de 2007 a 2010, que registraram valores de 41,2% e 43,2%, respectivamente, para amostras de enterococos apresentando HLGR.

Considerando-se alguns exemplos relacionados à distribuição dessa característica de resistência em outras regiões do mundo, os dados compilados pelo *Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe* (EARS-Net), em 2014, que reúne os casos ocorridos em diferentes países europeus, registraram que 28,8% das amostras de enterococos, em geral, obtidas de IACS apresentaram HLAR. Os maiores percentuais foram observados na Romênia (76,5%), seguido da Itália (55,3%) e Hungria (49,8%); e os menores foram obtidos na Islândia (8,3%), França (13,7%) e Suécia (15,8%).

Já em países asiáticos, dados do Programa SENTRY, no período de 1998 a 1999 para amostras isoladas de infecções do trato urinário, revelaram taxas de 41,7% de HLGR (TURNIDGE et al., 2002). Posteriormente, dados do mesmo Programa, para o período de 2003 a 2004, indicaram valores de 37,3% e 16,9% na frequência de amostras de enterococos portadoras de HLGR e de HLSR, respectivamente (BIEDENBACH et al., 2007). Na Coreia, dados relativos aos anos de 2007 e 2008 apontaram taxas superiores a 40% para amostras de *E. faecalis* portadoras de HLGR e isoladas de pacientes em unidades de tratamento intensivo. No Japão, no período de 2003 a 2014, 34% das amostras avaliadas apresentaram HLGR, segundo dados divulgados no estudo de Osuka et al. (2016).

No continente africano, no período de 1999 e 2000, Kholly et al. (2003) registraram no Egito valores de 46% e 52% para HLGR e HLSR, respectivamente. Mais recentemente, um estudo de Abamecha, Wondafrash ; Abdissa (2014), na Etiópia, registrou a frequência de 26,5% para HLGR e 73,5% para HLSR em amostras de *E. faecalis* isoladas do trato intestinal de pacientes hospitalizados.

Por outro lado, os dados do *Australian Group on Antimicrobial Resistance Enterococcus Surveillance Programme*, de 2010, mostraram uma redução na frequência de

HLGR de 57,1% para 20% e HLSR de 11,1% a 7,1% no período de 1995 a 2010, em amostras de *E. faecalis* isoladas em hospitais na Austrália.

Os antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos inibem a biossíntese da parede celular bacteriana por se ligarem de forma covalente às enzimas conhecidas como proteínas ligadoras de penicilina, comumente designadas como *penicillin-binding proteins* (PBPs), que são transpeptidases e carboxipeptidases, inibindo assim as suas atividades. Seis tipos diferentes de PBPs são conhecidos em *Enterococcus*, sendo que a PBP4 e a PBP5 apresentam baixa afinidade pelos beta-lactâmicos (ELIOPOULOS, 2008; ZAPUN et al., 2008; TANG et al., 2014). A presença de PBPs de baixa afinidade pelo antimicrobiano beta-lactâmico reduz os níveis de susceptibilidade, sendo esta característica intrínseca e expressiva em espécies de *Enterococcus*. Outro mecanismo intrínseco é a superprodução destas PBPs de baixa afinidade, que também determina a diminuição da susceptibilidade aos beta-lactâmicos, porém neste caso em níveis (HIRAGA et al., 2008; HSIEH et al., 2006; ONO et al., 2005; POETA et al., 2007).

O mecanismo de resistência adquirida contra estes antimicrobianos ocorre devido a alterações na estrutura das PBPs, sendo nestes casos decorrentes de eventos genéticos pontuais (mutações), que definem resistência a concentrações elevadas do beta-lactâmico (RICE, 2001; WILLIAMSON et al., 1985;). Variações na sequência de aminoácidos dos domínios catalíticos da PBP5, onde ocorre ligação ao beta-lactâmico, estão relacionadas à perda de susceptibilidade concomitante à ampicilina e à penicilina e são específicas da espécie *E. faecium* (FONTANA et al., 1992). Já em *E. faecalis*, quando ocorre a modificação da sequência de aminoácidos nos domínios catalíticos da PBP4, é observada resistência à penicilina, porém os membros desta espécie se mantêm caracteristicamente sensíveis à ampicilina (CONCEIÇÃO et al., 2014; ONO et al., 2005).

Diversos estudos já demonstraram que a resistência adquirida a níveis elevados de ampicilina é muito mais comum em *E. faecium*, atingindo valores de frequência de até 80% das amostras desta espécie; enquanto que, para *E. faecalis*, a frequência de resistência normalmente atinge cerca de 2% das amostras (KRESKEN et al., 2000; LEBRETON, et al., 2013; WERNER, et al., 2013; WILLEMS; BONTEN, 2007).

Nos últimos anos, têm sido observadas variações fenotípicas, que vêm comprometendo a eficácia na interpretação dos testes de susceptibilidade e, conseqüentemente, a escolha terapêutica. De acordo com critérios internacionalmente aceitos, como os do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI de 2006; CLSI de 2016) e do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2016), a

susceptibilidade à ampicilina em amostras de *E. faecalis* é preditiva para amoxicilina, piperacilina e imipenem. No entanto, não deve ser extrapolada para penicilina, em decorrência da existência de tais variações observadas em amostras que expressam resistência para este antimicrobiano e susceptibilidade à ampicilina; um fenótipo denominado *penicillin-resistant, ampicillin susceptible Enterococcus faecalis* (PRASEF) (CONCEIÇÃO et al., 2012; INFANTE et al., 2016; KAJIHARA et al., 2015; MENDES et al., 2015). Apesar de essa recomendação ter sido incluída no documento do CLSI apenas em 2007, pesquisadores da Grécia já haviam relatado essas variações em 31,4% das amostras de *E. faecalis* isoladas no período de 2003 a 2004 (METZIDIE et al., 2005). Entretanto, até o momento há poucos relatos deste fenótipo incongruente na literatura, provavelmente em decorrência de que poucos estudos testam e/ou reportam os resultados para mais de um beta-lactâmico (GUARDABASSI et al., 2010; KRISTICH; ARROZ; ARIAS, 2014). No Brasil, há relatos de isolamento de amostras PRASEF no período entre 2006 e 2016 (CONCEIÇÃO et al., 2012; 2014; INFANTE et al., 2016).

A produção de beta-lactamase também já foi descrita na literatura como um mecanismo de resistência adquirida aos beta-lactâmicos, em amostras de *E. faecalis*. Desde o primeiro relato por Murray e Mederski-Samaroj, em 1983, a ocorrência de amostras produtoras desta enzima é rara, e poucos são os trabalhos disponíveis na literatura (CONCEIÇÃO et al., 2012; INFANTE et al., 2016; KUCH et al., 2012). A beta-lactamase que foi caracterizada em amostras de *E. faecalis* apresenta uma grande similaridade genética com a que foi identificada em amostras de *S. aureus* codificada pelo gene *blaZ* (JUNGERMANN et al., 2011; MCBRIDE et al., 2007; MURRAY et al., 1986; RICE, 2012; TAMAYKO et al., 1986). Entretanto, a expressão em *S. aureus* é induzida; enquanto que, em enterococos, é constitutiva e encontra-se em um plasmídeo, que carrega também genes de resistência a níveis elevados de gentamicina (MURRAY et al., 1986). Amostras de enterococos produtoras de beta-lactamase são caracteristicamente resistentes à penicilina, aminopenicilinas (ampicilina) e ureidopenicilinas (piperacilina), sendo sensíveis ao imipenem e a combinações de beta-lactâmicos com inibidores destas enzimas, como ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (CERCENADO, 2011). A descrição do isolamento de amostras de *E. faecium* produtoras de beta-lactamase, é ainda mais rara (COUDRON; MARKOWITZ; WONG, 1992; TOMAYKO et al., 1996).

Desde 1986, amostras de enterococos exibindo mecanismos de resistência adquirida à vancomicina, reconhecidas como *vancomycin-resistant enterococci* (VRE) vêm sendo relatadas (CDC, 1993; LECLERCQ et al., 1988; UTTLEY et al., 1988). Acredita-se que, nos

EUA, a emergência de amostras resistentes aos glicopeptídeos tenha ocorrido, principalmente, no ambiente hospitalar, diante da pressão seletiva do uso terapêutico e profilático desses antimicrobianos (MANCIN; BOTEN, 2005; TENOVER; MCDONALD, 2005). Entretanto, nos países europeus e asiáticos, esta emergência parece ter sido relacionada ao uso abusivo de avoparcina (um glicopeptídeo) em rações animais, como promotor de crescimento (DEL CAMPO et al., 2003; GOOSSENS et al., 2005; GU et al., 2009; JOHNSEN et al., 2005; JUNG et al., 2006;).

Atualmente, existem nove fenótipos de resistência aos glicopeptídeos, que são denominados VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM e VanN (CHEN et al., 2015; CHUNHUI; XIAOGANG, 2015; BOYD et al., 2008; 2015; FINES et al., 1999; KLARE et al., 2003; LEBRETON et al., 2011; MEZIANE-CHERIF et al., 2012; SONG et al., 2008; WEBER et al., 2009; WOODFORD, 2001; XU et al., 2010).

Dentre eles, o fenótipo VanC é definido pela resistência intrínseca a níveis baixos de vancomicina, porém as amostras permanecem sensíveis à teicoplanina. É característico das espécies móveis *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*. São conhecidos três subtipos denominados: *vanC1*, característico da espécie *E. gallinarum*; e *vanC2* e *vanC3*, identificados em *E. casseliflavus*. Estes genes codificam enzimas ligases que participam da síntese do pentapeptídeo da parede celular, terminando em D-Alanil-D-Serina (D-Ala-D-Ser), que apresentam uma menor afinidade pela vancomicina. (COURVALIN, 2006; LECLERCQ et al., 1992; NAVARRO; COURVALIN, 1994; PÉRICHON; COURVALIN, 2009). Diversos estudos já demonstraram que tanto *E. gallinarum*, quanto *E. casseliflavus* podem apresentar mecanismos de resistência adquirida codificados por *vanA* ou *vanB* de forma concomitante ao genótipo *vanC* (CORSO et al., 2005; MERQUIOR et al., 2008; NEVES et al., 2009; SHIRANO et al., 2011; TOGNERI; CORSO, 2003). Além disso, recentemente o genótipo *vanC* foi observado em outras espécies de enterococos, sendo primeiramente reportado no estudo de Moura et al., em 2013, em uma amostra de *E. faecalis*. Em relatos subsequentes, além de *E. faecalis*, a presença de *vanC* foi também identificada em *E. faecium* (NISHIYAMA et al., 2016; SUN et al., 2014), sugerindo que este gene pode estar sujeito à mecanismos de transferência horizontal.

Entretanto, os genótipos mais difundidos no ambiente hospitalar e, portanto, os de maior importância clínica, são os que codificam para os fenótipos VanA e VanB, e quando se encontram associados às espécies *E. faecalis* e *E. faecium* (BOURDON et al., 2011; PROTONOTARIOU et al., 2010; SIEGEL et al., 2007; SIMNER et al., 2015; SOMILY et al., 2016). Embora, a resistência à vancomicina veiculada por *vanA* ou *vanB*, já tenha sido

também identificada em outras espécies, como *E. avium*, *E. durans*, *E. mundtii* e *E. raffinosus* (CORREIA et al., 2013; JOLIVET et al., 2016; KAWALEC et al., 2007; LAFFAN, 2004; LEE, FERGUSON Jr; SHARIFI-RAD et al., 2016), além daquelas já mencionadas.

O fenótipo VanA é codificado por sete genes (*vanRSHWXYZ*), que constituem o operon *vanA* e duas sequências de leitura aberta, ORF1 e ORF2 (do inglês *open reading frame*), presentes no transposon Tn1546 (ou elemento VanA). Essa característica é induzida, resultando na expressão de resistência a níveis elevados de vancomicina e elevados ou moderados de teicoplanina (ARTHUR et al., 1992; HONG et al., 2008; HUTCHINGS et al., 2006; KOTEVA et al., 2010). Embora o fenótipo VanA seja caracteristicamente identificado em *Enterococcus*, já foi demonstrado por transferência tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, que pode ocorrer disseminação para outros gêneros bacterianos. Assim, a resistência à vancomicina decorrente da expressão do conjunto gênico *vanA* não apresenta barreiras heteroespecíficas (DE NIEDERHÄUSERN et al., 2007; DEZFULIAN et al., 2012; MANDAL; GHOSH; PATI, 2015; ROSSI et al., 2014; WALTERS et al., 2015).

No Brasil, a detecção do primeiro relato da presença de *vanA* ocorreu em 1997, em São Paulo (ZANELLA et al., 1999). Em 2000, nosso grupo descreveu o primeiro caso em nosso Estado (Albuquerque, 2000). Em sequência, foram registrados relatos no Rio Grande do Sul (D' AZEVEDO et al., 2000), Pernambuco (VILELA et al., 2006) e Minas Gerais (RIBAS et al., 2007) e, mais recentemente, em instituições pertencentes a outros estados brasileiros (AZEVEDO, 2013; KERBAUY et al., 2011; PORTO et al., 2013; SOUZA et al., 2012). O surgimento e disseminação dessas amostras no Sul e Sudeste foram precoces em relação às demais regiões do país e curiosamente ocorreu primariamente na espécie *E. faecalis*. O genótipo *vanA* ainda é o mais difundido em nosso meio (CAMARGO et al., 2006; CAMPOS et al., 2014; CONCEIÇÃO et al., 2011; CORREA et al., 2015; DAMACENO; NICOLI; OLIVEIRA, 2015; PALAZZO et al., 2011).

O fenótipo VanB também é resultado da expressão de resistência adquirida e induzida à vancomicina. Este se caracteriza por níveis elevados de resistência à vancomicina e susceptibilidade à teicoplanina. A maioria das proteínas codificadas pelo operon *vanB* possui homólogos codificados pelo *vanA*, com exceção do gene *vanZ*. O conjunto gênico *vanB* pode ser detectado nos transposons Tn1547, Tn1549 ou Tn5382 e, em comparação à *vanA*, apresenta um gene adicional, o *vanW*, cuja a função ainda é desconhecida. Adicionalmente, o gene *vanB* possui regiões variáveis e é classificado em três subtipos, denominados: *vanB₁*, *vanB₂* e *vanB₃* (CARIAS et al., 1998; COURVALIN, 2006; GARNIER et al., 2000; QUINTILIANI; COURVALIN, 1996). O nosso grupo descreveu o isolamento das primeiras

amostras identificadas no Brasil portadoras do gene *vanB*, provenientes de pacientes atendidos em duas Instituições hospitalares do Estado Rio de Janeiro (MERQUIOR et al., 2012). Estas amostras, pertencentes à espécie *E. faecalis*, fazem parte da amostragem caracterizada no contexto desta Tese.

O fenótipo VanD é definido pela resistência a níveis moderados de vancomicina e a níveis baixos de teicoplanina. Foi descrito inicialmente por Perichon, Reynolds ; Courvalin, em 1997, que através do uso da PCR e de sequenciamento do DNA, demonstraram que o gene *vanD* apresenta uma homologia de 69% com ambos os genes *vanA* e *vanB* e de 43% com *vanC*. O gene *vanD* codifica uma D-Alanil-D-Lactato (D-Ala-D-Lac) ligase, semelhante às de *vanA* e *vanB*, porém não é transferível. Alguns poucos estudos têm relatado o isolamento de amostras albergando o genótipo *vanD* associadas a infecção ou colonização em humanos (CASADEWALL; COURVALIN, 1999; FANG et al., 2007; OSTROWSKY et al., 1999; STARLANDER; TELLGREN-ROTH; MELHUS, 2016). Cabe ressaltar que a primeira amostra de enterococos apresentando resistência à vancomicina isolada no Brasil foi caracterizada como portadora do genótipo *vanD* (DALLA COSTA et al., 1998; 2000; DEPARDIEU, REYNOLDS; COURVALIN, 2003).

Diversos estudos têm demonstrado o isolamento de amostras de enterococos apresentando divergências em relação ao fenótipo e genótipo. A principal implicação desses achados é a clara possibilidade de erros no diagnóstico clínico, comprometendo assim o tratamento do paciente. Tais incongruências foram observadas, na maioria das vezes, em amostras portadoras do genótipo *vanA*, que se apresentaram sensíveis à teicoplanina, sugerindo o fenótipo VanB (amostras *vanA*/VanB). Da mesma maneira, já foram descritas incongruências do tipo *vanA*/VanD (CAMARGO et al., 2005; CHA et al., 2013; FARIA, 2012; HASHIMOTO et al., 2000; HENRIQUE et al., 2008; LAUDERDALE et al., 2002; OH et al., 2007; PARK et al., 2007). Tais variações estão relacionadas a polimorfismos em Tn1546, resultantes de mutações, deleções e da integração de sequências de inserção (IS) em diferentes regiões do elemento móvel. A região a montante de *vanR* e a jusante (no inglês, *downstream*) de *vanX* são as que mais frequentemente se apresentam alteradas nas amostras incongruentes atingindo, portanto, os genes *vanS*, *vanY* e/ou *vanZ*, como também em regiões intergênicas. (CHA et al., 2013; FARIA, 2012; LÓPEZ et al., 2012; PARK et al., 2007; SONG et al., 2013; SUNG et al., 2008). No Brasil, amostras de VRE expressando esta relação *vanA*/VanB foram detectadas por Henrique et al., em 2008. Esta condição foi relacionada à presença do elemento genético ISEfa5 na região intergênica *vanX-vanY*.

Em relação aos demais fenótipos já identificados, VanE (*E. faecalis*, Fines et al., 1999), VanG (*E. faecalis*, DEPARDIEU et al., 2007; MCKESSAR et al., 2000) e VanL (*E. faecalis*, BOYD et al., 2008) caracterizam-se pela expressão de níveis baixos de resistência à vancomicina; enquanto que, VanM (*E. faecium*, TEO et al., 2011; XU et al., 2010) resulta em resistência a níveis moderados a elevados de vancomicina e de teicoplanina. Adicionalmente, o fenótipo VanN, o mais recentemente descrito (LEBRETON et al., 2010), foi identificado na espécie *E. faecium*, possui organização gênica semelhante ao operon *vanC* e também expressa resistência a níveis baixos de vancomicina e susceptibilidade a teicoplanina.

Amostras VRE, particularmente as pertencentes aos fenótipos VanA e VanB, apresentam elevada capacidade de disseminação, sendo transmitidas rapidamente de paciente para paciente. Essas amostras estão frequentemente associadas a situações de surto e/ou endemicidade, e a identificação precoce desses microrganismos é fundamental para controlar a sua disseminação (ARIAS, MURRAY, 2012; (MCGOWAN, 2004; MILLER et al., 2016; REYES; BARDOSSY; ZERVOS, 2016). Também, as infecções causadas por VRE estão associadas com aumento da morbidade, da mortalidade, do tempo de permanência hospitalar e dos custos em Saúde, em comparação com infecções por amostras sensíveis à vancomicina (VSE, do inglês, *vancomycin-sensitive enterococci*) (CHEAH et al., 2013; DIAZGRANADOS et al., 2005). Adicionalmente, diversos estudos têm demonstrado que a colonização do trato gastrointestinal por essas amostras, pode ser a responsável pelo desenvolvimento de infecções em pacientes hospitalizados que, uma vez estabelecida, pode persistir por muitos anos (CHANG et al., 2010; CHEAH et al., 2013; GIKAS et al., 2005; HIGUITA; HUYCKE, 2014; KARA et al., 2015; KARKI et al., 2013; KAUSHAL et al., 2016; LEE et al., 2013; OFNER-AGOSTINI et al., 2008; PREMATUNGE et al., 2016). Além disso, a colonização intestinal em pacientes hospitalizados pode se estender para a pele, facilitando a transmissão hospitalar por várias vias, até mesmo através das mãos dos profissionais da saúde, delineando uma “rede” de disseminação dessas amostras (BEEZHOLD et al., 1997; HIGUITA; HUYCKE, 2014).

Como resultado, amostras albergando características de resistência à vancomicina e responsáveis por IACS, particularmente em pacientes hospitalizados em unidades de tratamento intensivo, destacam-se em frequência elevada em diferentes países, inclusive no Brasil, com dados que variam de cerca de 7% a 35%, desde o início dos anos 2000 (ADAM et al., 2011; ARIAS; MURRAY, 2012; BRODRICK et al., 2016; DE KRAKER et al., 2013; JONES et al., 2013; 2014; LEAVIS et al., 2006; MOHN et al., 2000; NNIS, 2000; PFALLER et al., 2007; SADERAND JONES, 2009). Jones et al. (2013), num estudo multicêntrico

realizado em países da América Latina, relataram 27% de resistência à vancomicina em amostras de *Enterococcus* isoladas em instituições brasileiras. Cabe ressaltar que a resistência à vancomicina é encontrada em taxas mais elevadas em amostras da espécie *E. faecium* isoladas de ICAS; porém, nos últimos anos, tem sido observado também um aumento de amostras resistentes pertencentes à espécie *E. faecalis* (EVERT et al., 2013; EARS-Net, 2016; JONES et al., 2014).

As altas taxas de resistência aos beta-lactâmicos em *E. faecium* e aumento da resistência aos aminoglicosídeos e aos glicopeptídeos nas espécies *E. faecium* e *E. faecalis* trouxe a necessidade da disponibilização de novas drogas para o tratamento das infecções causadas por estes microrganismos. Os antimicrobianos linezolid, tigerciclina e daptomicina são as opções, relativamente, mais recentes para o tratamento das infecções por enterococos resistentes, principalmente a terapia sinérgica, e em casos de maior gravidade; porém, também já foram relatadas amostras resistentes (AUCKLAND et al., 2002; BAE et al., 2006; BERSOS et al., 2004; CORDINA et al., 2012; GONZALES et al., 2001; KELESIDIS et al., 2011; SABOL et al., 2005; WANG et al., 2014; WERNER et al., 2008). No Brasil, amostras *linezolid-resistant*, *vancomycin-resistant enterococci* (LRVRE, em português: VRE resistentes à linezolid) pertencentes às espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, já foram identificadas (ALMEIDA et al., 2014; DO PRADO et al., 2016).

Adicionalmente, a aquisição de mecanismos de resistência aos antimicrobianos (principalmente a ampicilina, aminoglicosídeos e glicopeptídeos) e de virulência tem sido relatada como um fator contribuinte para a especialização de clones e complexos clonais de *E. faecalis* e *E. faecium* no âmbito hospitalar (BONTEN, 2008; DE BEEN et al., 2013; FREITAS et al., 2009; MC BRIDE et al., 2007; PALMER et al., 2012; TEDIM et al., 2015; TOP; WILLEMS; WERNER et al., 2010). Assim, estudos de epidemiologia molecular empregando métodos modernos de tipificação de amostras multirresistentes e/ou apresentando atributos específicos de virulência têm contribuído para o conhecimento da estrutura populacional das espécies de *Enterococcus*, especialmente aquelas que se destacam em infecções humanas, como *E. faecalis* e *E. faecium*.

As primeiras técnicas moleculares desenvolvidas para a investigação da diversidade clonal bacteriana que foi aplicada a amostras de enterococos foram: a determinação do perfil plasmidial e a análise de fragmentos obtidos por *restriction endonuclease analysis* (REA, em português: enzimas de restrição e eletroforese convencional) (DONABEDIAN et al., 1992; LACOUX et al., 1992; LUGINBUHL et al., 1987; QUEDNAU, AHRNÉ; MOLIN, 1999; SAHM; GILMORE, 1994; SAVOR et al., 1998). Porém, a inconstância dos plasmídeos,

principalmente por serem sujeitos a pressões seletivas e poderem ser perdidos espontaneamente ou adquiridos de outras bactérias, bem como a dificuldade de interpretação dos perfis resultantes da metodologia de REA, definiram um baixo poder discriminatório dessas metodologias, além da possibilidade de resultados pouco reprodutíveis (FACKLAM et al., 2002).

Em sequência, vários outros métodos moleculares foram sugeridos e avaliados, tais como: *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE, em português: eletroforese de enzima multilocus), ribotipagem, *random-amplified polymorphic DNA-PCR* (RAPD-PCR, em português: amplificação randômica do DNA polimórfico), *repetitive extragenic palindromic sequence - PCR* (REP-PCR, em português: amplificação de sequências palindrômicas extragênicas repetidas) e *restriction fragment length polymorphism* (RFLP, em português: polimorfismos do tamanho de fragmentos de restrição do DNA cromossômico) (BARBIER et al., 1996; CARVALHO et al., 1997; DESCHEEMAERKER et al., 1997; HSUEH et al., 1999; MALATHUM et al., 1998; TURABELIDZE et al., 2000). Estes métodos também apresentam limitações de diferentes ordens, tais como dificuldade de interpretação, baixa reprodutibilidade e/ou alta complexidade técnica (BARBIER et al., 1996; KUHN et al., 1995; LINDSTEDT et al., 2005; MALATHUM et al., 1998; TOMAYKO; MURRAY, 1995).

Sendo assim, a metodologia de análise de perfis de fragmentação do DNA cromossômico, obtidos por enzimas de restrição e *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE, em português: eletroforese em campo pulsado), desde sua implantação, tem sido amplamente utilizada para fins de investigação epidemiológica, devido ao alto grau de diferenciação das amostras, sendo considerada como método "padrão ouro" para a investigação de surtos hospitalares (BARBIER et al., 1996; KUHN et al., 1995; MALATHUM et al., 1998; PEGUES et al., 1997; PINHOLT et al., 2015; SALIPANTE et al., 2015; SWAMINATHAN et al., 2001). Para análise de amostras de enterococos, a enzima de restrição normalmente utilizada para fragmentação do DNA cromossômico é *SmaI*; embora, alguns estudos tenham utilizado *ApaI* e *SfiI* (COOMBS et al., 2014; DESHPANDE et al., 2007; NALLAPAREDDY et al., 2002; 2005; SALIPANTE et al., 2015; TURABELIDZE et al., 2000; ZISCHKA et al., 2015). A restrição do DNA de *Enterococcus* por *SmaI* resulta de 15 a 20 fragmentos, com tamanhos de aproximadamente 5kb a 40kb. Para a interpretação dos resultados, Tenover et al. (1995) definiram os seguintes critérios baseados nos perfis migratórios: quando idênticos, indicam um mesmo clone; diferentes em até seis bandas (que representam de um a dois eventos genéticos), as amostras são consideradas relacionadas e pertencentes a um mesmo grupo clonal; diferentes em sete ou mais bandas (decorrentes de três ou mais eventos

genéticos), amostras sem relação epidemiológica. Mais tarde, devido ao emprego de sistemas de processamento de imagem, a interpretação dos perfis gerados por PFGE passou a ser computadorizada. Neste caso, as análises das imagens dos géis são realizadas por aplicativos específicos, com a transformação dos perfis de bandas em registros densitométricos que, quando sobrepostos, são avaliados pelo emprego de coeficientes de similaridade, sendo os mais comumente empregados Dice ou Pearson. Os dados obtidos são utilizados na construção de matrizes de similaridade, que são utilizadas para gerar dendrogramas, mais frequentemente construídos pelo emprego do *unweighted pair group method of averages* (UPGMA, em português: algoritmo de agrupamento de pares com médias aritméticas não ponderadas) (FREITAS et al., 2011; PINHOLT et al., 2015, vAN BELKUM et al., 2007).

Apesar de satisfatória, quanto à qualidade dos resultados obtidos para tipificação bacteriana, a metodologia de PFGE apresenta importantes limitações como: a necessidade de equipamentos específicos, que resultam em custos elevados; é laboriosa e consome muito tempo entre o preparo e a análise; os resultados obtidos, por diferentes laboratórios, não podem ser facilmente comparados, a não ser com a aplicação de normas rigorosas de controle de qualidade, como ocorre em sistemas de redes interlaboratoriais, por exemplo, PulseNet do CDC, Atlanta, GA, EUA.

Assim, métodos baseados no sequenciamento de genes ou, ainda, do genoma completo, têm sido os recomendados e muitas vezes considerados como padrão ouro na caracterização do relacionamento genético de amostras bacterianas. A metodologia de *multilocus sequence typing* (MLST, em português: tipificação de sequências em múltiplos loci) tem sido referida como a que agrega um maior número de vantagens para as análises de diversidade de microrganismos. A MLST foi proposta por Maiden et al., em 1998, como um método mais prático para identificar relações genéticas em bactérias. Esta metodologia é baseada na caracterização de sequências alélicas em um conjunto de genes de manutenção celular (no inglês, *housekeeping genes*), identificando de forma coerente tipos (ou clones) e complexos clonais (CCs) de relevância clínica, para diversas espécies bacterianas. Em linhas gerais, esta metodologia se baseia na atribuição de números a cada sequência distinta (por um ou mais nucleotídeos) para cada gene analisado (número do alelo). A numeração obtida para cada alelo, do conjunto de genes designado para análise de uma dada espécie (na maioria das espécies são avaliadas as sequências de seis ou sete genes), representará um bionúmero (perfil) que define um *sequence type* (ST) de cada amostra bacteriana avaliada. Os STs podem ser facilmente comparados em bancos de dados internacionais (AANENSEN; SPRATT,

2005; CAMARGO et al., 2004; GETACHEW et al., 2013; MAIDEN et al., 2013; RAVEN et al., 2016; RUIZ-GARBAJOSA et al., 2006).

Esquemas de tipificação por MLST já foram desenvolvidos para as espécies *E. faecium* e *E. faecalis*. Em *E. faecium* são analisados fragmentos internos dos seguintes sete genes de manutenção celular: *adK*, *atpa*, *ddl*, *gdh*, *gyd*, *pstS* e *purk*, que codificam para adenilato quinase, subunidade alfa da ATP sintetase, D- alanina-D-alanina ligase, glicose 6-fosfato desidrogenase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, proteína transportadora de cassete de ligação de ATP e fosforibosilamino-imidazol carboxilase, respectivamente, tendo sido proposto por Homan et al., em 2002. Em relação à *E. faecalis*, Nallapareddy et al., em 2005, foram os primeiros a divulgar um esquema para análise das amostras desta espécie, porém, apesar de ser muito discriminatório, utilizava um conjunto de nove genes, sendo mais extenso do que o comumente empregado nos protocolos dessa metodologia. Assim, Ruiz-Garbijosa et al., em 2006, propuseram um esquema mais curto, que passou a ser amplamente aceito, composto dos seguintes genes: *aroE*, *gdh*, *gki*, *gyd*, *pstS*, *xpt* e *ygil*, que codificam para chiquimato quinase, glicose 6-fosfato desidrogenase, glicoquinase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, proteína transportadora de cassete de ligação de ATP, xantina fosforibosil transferase e acetil-CoA acetil transferase, respectivamente. Um banco de dados internacional de linhagens de *E. faecalis*, analisadas por MLST: PubMLST de *E. faecalis*.

A metodologia de MLST tem sido amplamente empregada, pois permite a troca de dados entre laboratórios via internet, facilitando estudos epidemiológicos globais e análises da estrutura populacional de várias espécies bacterianas. Também, atende com sucesso avaliações epidemiológicas que contemplam períodos longos de análise em estudos de vigilância (AANENSEN; SPRATT, 2005; FEIL et al., 2004; Kuch et al., 2012; RAVEN et al., 2016; RUIZ-GARBAJOSA et al., 2006; URWIN et al., 2003, VAN HAL et al., 2016).

Nos últimos anos, o *whole-genome sequencing* (WGS, em português: sequenciamento do genoma completo) tem se tornado cada vez 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 (BEEN et al., 2013; BRODRICK et al., 2016; HOLDEN et al., 2013, JACKSON et al., 2016; LONG et al., 2014; PRICE et al., 2014; RAVEN et al., 2016; SALIPANTE et al., 2014; WALKER et al., 2013). 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 (HARRIS et al., 2010; KWONG et al., 2015;

LEEKITCHAROENPHON et al., 2014; MUKHOPADHYAY et al., 2009; PENDLETON et al., 2013; PINHOLT et al. 2015; SALIPANTE et al., 2015).

Estudos comparativos realizados entre as metodologias PFGE *versus* WGS e entre MLST *versus* WGS demonstraram que, apesar de uma boa correlação entre os métodos, WGS apresentou uma maior resolução, sendo mais preciso para tipificação bacteriana e superior na realização de análises evolutivas. Entretanto, os estudos realizados apontam que as análises por WGS demandam pessoal especializado, com conhecimento de bioinformática para uma correta avaliação do grande número de dados que são gerados (HARRIS et al., 2010; HOWDEN et al., 2013; PINHOLT et al. 2015; RAVEN et al., 2016). Assim, em geral, a metodologia de PFGE é o método de tipificação empregado pelas redes de vigilância; MLST é utilizado para fins de comparação de dados epidemiológicos globais; e WGS, apesar de ter o custo reduzido nos últimos anos e passar a ser considerado como padrão-ouro para diversos modelos bacterianos, ainda mantém seu uso restrito a alguns centros que conjugam possibilidade de execução do método com competência para análise dos dados (CDC PulseNet 2013; ECDC, 2015; HEATHER; GERNER-SMID, 2016; PINHOLT et al. 2015; SALIPANTE et al., 2015).

Todavia, essas principais metodologias de tipificação molecular têm permitido a realização de estudos abrangentes com o propósito de avaliar a dinâmica populacional de diferentes gêneros e espécies bacterianas, particularmente os patógenos humanos associados às infecções de origem hospitalar. Estudos relativos à estrutura populacional de enterococos têm permitido avaliar a existência, distribuição e dinâmica de linhagens multirresistentes e de linhagens patogênicas em ambientes particulares, como o hospital (DE BEEN et al., 2013; FREITAS et al., 2009; MC BRIDE et al., 2007; PALMER et al., 2012; PINHOLT et al., 2015; TEDIM et al., 2015, vAN HAL et al., 2016; ZISCHKA et al., 2015).

Um dos estudos pioneiros que utilizou o MLST para compreensão da estrutura populacional de *E. faecalis* foi o realizado por Ruiz-Garbajosa et al. (2006). Neste estudo, os autores avaliaram 110 amostras bacterianas, provenientes de diferentes origens, e descreveram as primeiras impressões sobre o arranjo populacional desta espécie, através da detecção de 55 STs distintos que se mostraram distribuídos em quatro complexos clonais: CC10 composto por amostras de diferentes ambientes; CC21 composto majoritariamente por amostras de origem animal; CC2 composto por amostras resistentes à vancomicina, β -lactamase positivos e responsáveis por quadros de endocardites; e o CC9 composto por amostras hospitalares. Como conclusão do estudo, os autores comentaram que tais resultados sinalizavam para a especialização dos complexos CC2 e CC9 no ambiente hospitalar. De fato,

estudos posteriores, conforme descrito a seguir, vieram a corroborar estes achados, confirmando a prevalência de CC2 e CC9 no contexto hospitalar.

Assim, nesta mesma linha de investigação, McBride et al. (2007), aplicando a metodologia de MLST a 106 amostras de *E. faecalis* isoladas ao longo de um período de 100 anos e provenientes de diferentes origens, destacaram CC21 nas amostras de origem animal e dentre as hospitalares que apresentaram uma taxa reduzida de determinantes de resistência e de virulência; e CC2, CC8 e CC9 como aqueles que reuniram as amostras hospitalares com maior número de determinantes de resistência e de virulência. Adicionalmente, os autores sugeriram que o surgimento recente de CC2, pois não foi identificado entre amostras isoladas antes da metade dos anos 1980. Os autores ressaltaram que as amostras desse complexo são as que apresentam um maior potencial patogênico, sendo as mais frequentes em surtos hospitalares e em infecções invasivas como sepse e bacteremias. Também, incluíram CC40 como um importante complexo provenientes de várias fontes (animal, humano, ambiental) e diferentes condições clínicas (como colonização e quadros de infecção).

No mesmo ano, Kawalec et al. (2007) demonstraram, através de um estudo sobre a disseminação de amostras de *E. faecalis* em hospitais na Polônia, que CC2 e CC9 eram prevalentes entre as amostras bacterianas avaliadas e, além disso, descreveram CC87 como um novo complexo associado ao ambiente hospitalar. Dados europeus, além deste, estão representados no estudo de Kuch et al. (2012), abrangendo o período de 2006 a 2009, que determinou que CC2, CC16, CC87 e suas linhagens agruparam majoritariamente amostras multirresistentes aos antimicrobianos. Alguns dos STs encontrados neste estudo e associados a *high-risk enterococcal CCs* (HiRECCs, em português: complexos clonais de alto risco), pois reúnem amostras multirresistentes, virulentas e diretamente relacionadas a IACS.

A supremacia de CC2 e suas linhagens no ambiente hospitalar foi determinada mundialmente e, desde então, diversos estudos tem relatado a importância deste complexo em IACS (CORREIA et al., 2014; DJAHMI et al., 2012; FREITAS et al., 2009; GUARDABASSI et al., 2010; GUZMAN PRIETO et al., 2016; KUCH et al., 2012; MURUZÁBAL-LECUMBERRI et al., 2015; SOLHEIM et al., 2011; WILLEMS et al., 2011; YANG et al., 2015). Neste complexo clonal, ST6 foi relacionado às amostras portadoras de HLGR, em diversos estudos (FREITAS et al., 2009; GUARDABASSI et al., 2010; KUCH et al., 2012; MC BRIDE et al., 2007; SUN et al., 2009;). Além disso, foi observado que a amostra *E. faecalis* V583, que foi o primeiro representante do gênero a ter o genoma totalmente sequenciado, pertencente a ST6/CC2, apresenta diversos elementos genéticos móveis, uma ilha de patogenicidade, um operon para biossíntese de polissacarídeo capsular

(envolvido na resistência à fagocitose) e o genótipo *vanA*, indicando que determinadas subpopulações desta espécie (como ST6) desenvolveram diferentes estratégias de adaptação a habitats hostis, como o hospital (FREITAS et al., 2009; HANCOCK; SHEPARD; GILMORE, 2003; HUO et al., 2015; MCBRIDE et al., 2007; MIKALSEN et al., 2015; PALMER et al., 2012; SOLHEIM et al., 2011, VAN SCHAIK; WILLEMS, 2010).

Estudo realizado por Penas et al. (2013) indicou que o CC2 compreende principalmente o ST6 e o ST2. Agrupamentos empregando algoritmos específicos, como eBURST, demonstraram que ST6, além de ser o prevalente dentro do complexo é considerado o ST fundador. A partir desses achados, os estudos disponíveis na literatura passaram a considerar a terminologia CC6 como sinônimo de CC2 (FEIL et al., 2004; SPRATT et al., 2004).

No Brasil, a prevalência de CC6, recuperados a partir de pacientes hospitalizados, também tem sido relatada, além ST524 e ST9 pertencentes ao CC9 (Penas et al., 2013). Conceição et al. (2012) reportaram a detecção de resistência à penicilina em amostras isoladas no Brasil e pertencentes ao CC9. Entretanto, Guardabassi et al. (2010) identificaram uma maior prevalência de amostras PRASEF associadas ao ST6 (CC6), na Dinamarca. Por outro lado, a resistência a ampicilina, associada a amostras de origem hospitalar, ainda é uma característica pouco frequente em amostras de *E. faecalis*, contrastando com os elevados percentuais observados para *E. faecium* (AAMODT et al., 2015; WILLEMS et al., 2011).

Diferenças na estrutura populacional de *E. faecalis* e *E. faecium*, tem sido frequentemente divulgadas e, aumentaram consideravelmente em número nesta década. Já foi evidenciado que estas espécies diferem quanto aos arranjos obtidos entre populações patogênicas e comensais. Em linhas gerais, na espécie *E. faecalis*, a maioria dos CCs descritos são mistos e agrupam amostras obtidas de casos de infecção e comensais (provenientes de colonização), que expressam reconhecidos fatores de virulência e amostras não virulentas, respectivamente. Este fato é diferente do observado para espécie *E. faecium*. Embora, pode-se identificar CCs de ambas as espécies, significativamente associados a amostras hospitalares, a maioria dos relacionados a *E. faecalis* contém tanto amostras patogênicas, quanto comensais; enquanto que o mesmo não ocorre para *E. faecium* (GUZMAN PRIETO et al., 2016; WILLEMS et al. 2011;).

Sendo assim, tem sido sugerido que amostras de *E. faecalis* comensais e clínicas isoladas de humanos não apresentaram caminhos evolutivos distintos, ao contrário do que tem sido determinado em estudos envolvendo a análise da estrutura populacional de *E. faecium* (Palmer et al., 2014). Estas hipóteses são também pautadas em avaliações dos determinantes

de virulência presentes nas amostras de ambas as espécies. A maioria dos fatores envolvidos na virulência de *E. faecalis*, como Esp, GelE, Agg, EfaA, Ace e Epp já foram identificados tanto em amostras obtidas de quadros infecciosos em humanos e animais, quanto de indivíduos saudáveis e de alimentos (LINDENSTRAUß et al., 2011; POULSEN et al., 2012; SEMEDO et al., 2003; SOLHEIM et al., 2009; TEDIM et al., 2015, vAN SCHAİK; WILLEMS, 2010; WILLEMS et al., 2011; ZISCHKA et al., 2015). Entretanto, marcadores de virulência em *E. faecium* como Esp, Hyl e Acm (adesina de *E. faecium* codificada pelo gene *acm*) estão presentes em amostras pertencentes a STs agrupados pelo CC17, um complexo praticamente restrito ao ambiente hospitalar, globalmente disperso e descrito como HiRECC (CHANG et al., 2010; DE BEEN et al., 2013; LEAVIS et al., 2006; LEBRETON et al., 2013; NALLAPAREDDY et al., 2008; TEDIM et al., 2015, vAN HAL et al., 2016). Uma exceção em *E. faecalis* que vem sendo apontada na literatura é a dispersão do operon da citoliosina e sua associação com amostras de origem hospitalar (LINDENSTRAUß et al., 2011, PALMER et al., 2012; RUIZ-GARBAJOSA et al., 2006).

Análises avaliando diversos genomas sequenciados de *E. faecalis* e *E. faecium* mostraram que ambas as espécies têm um pan-genoma aberto, indicando que os dois organismos podem eficientemente adquirir e integrar DNA externo em seu *pool* genético (LAM et al., 2012; MIKALSEN et al., 2015; NELSON et al., 2010; PAULSEN et al., 2003, vAN SCHAİK ; WILLEMS, 2010). O sistema avançado de feromônios de *E. faecalis*, que permite não só propagação de plasmídeo, mas também a transferência de grandes segmentos de DNA parece ter aumentado a plasticidade do genoma e adaptabilidade da espécie à condições adversas (FREITAS et al., 2013; HEGSTAD et al., 2010; HUO et al., 2015; MANSON, HANCOCK; GILMORE, 2010; MIKALSEN et al., 2015; ROSVOLL et al., 2012; SANTAGATI et al., 2012; SONG et al., 2013; WARDAL et al., 2013; WERNER et al., 2013).

Além dos plasmídeos, outros elementos genéticos móveis têm sido implicados na adaptação ao ambiente hospitalar. Na amostra de *E. faecalis* V583 foram encontradas 38 sequências de inserção (IS) distintas e foi também observado que mais de 1/4 do genoma era constituído de DNA externo (PAULSEN et al., 2003). De fato, o posterior sequenciamento completo de genomas de mais amostras de *E. faecalis* de origem hospitalar, como também de *E. faecium*, tem revelado uma grande quantidade de elementos genéticos pertencentes a família IS256, assim como as IS1542, IS16, ISEf1 e IS1310, dentre outros, que são componentes importantes de muitos transposons compostos que conferem resistência aos antimicrobianos, tais como: Tn5281 e Tn4001, que codificam para HLGR; Tn1547, que

carreia genes para a resistência à vancomicina; e Tn5384, que codifica para resistência à eritromicina e gentamicina (BOURGOGNE et al., 2008; HUO et al., 2015; LAM et al., 2012; MCBRIDE et al., 2007; PAULSEN et al., 2003, vAN SCHAİK; WILLEMS, 2010; PALMER et al., 2012; ZISCHKA et al., 2015). Curiosamente, também já foi observado que representantes da família de IS1182, presentes em Tn5405 (transposon comumente associado à resistência a estreptomicina em estreptococos), têm sido encontrados de forma abundante em amostras de *E. faecalis* ST6, e que a IS1310, membro da família IS256, foi identificada em todas as amostras de *E. faecalis* ST6/CC2 e ST40/CC40 (MIKALSEN et al., 2015).

Diversos estudos, também, já demonstraram a importância de uma *pathogenicity island* (PAI, em português: ilha de patogenicidade) descrita em *E. faecalis*. Este elemento genético é um componente dinâmico no genoma, onde mudanças rápidas em sua estrutura têm refletido em impactos consideráveis na virulência de amostras desta espécie (COBURN et al., 2007; LAVERDE et al., 2011; LEAVIS et al., 2004; OANCEA et al., 2004; MCBRIDE, et al., 2009; SHANKAR, BAGHDAYAN, GILMORE, 2002; SOLHEIM et al., 2009; 2011). Além disso, a presença de genes que codificam para proteínas de integração (relacionadas à excisão de fagos), homólogos aos que codificam para funções de conjugação em plasmídeos, e de terminações repetidas têm sugerido que a PAI de *E. faecalis* se move integrating conjugative element (ICE, em português: elemento conjugativo integrador) (MCBRIDE et al., 2009; PAULSEN et al., 2003; MANSON, HANCOCK; GILMORE, 2010). Assim, a grande abundância de certos genes, carregados por plasmídeos, transposons e PAI, entre os HiRECCs indica que os elementos genéticos móveis, transportando genes de virulência e de resistência, têm contribuído significativamente para o sucesso de *E. faecalis* como agentes etiológicos de infecções de origem hospitalar (LAVERDE et al., 2011; MC BRIDE et al., 2007; MIKALSEN et al., 2015; WARDAL et al., 2013).

Por outro lado, a participação de bacteriófagos na transferência horizontal de gene em enterococos, ainda não é totalmente compreendida (DUERKOP et al., 2012; LA ROSA et al., 2015; MAZAHARI et al., 2011; YASMIN et al., 2010, vAN SCHAİK et al., 2010). Entretanto, sequências pertencentes à profagos (sete elementos distintos) foram identificadas inicialmente na amostra *E. faecalis* V583 e, em sequência, em outras pertencentes a CC2 (MATOS et al., 2013; MCBRIDE et al., 2007; PAULSEN et al., 2003; SOLHEIM et al., 2011). Mais recentemente, Mikalsen et al. (2015) relataram que as sequências de profagos identificadas em *E. faecalis* V583 estavam presentes em todas as amostras de *E. faecalis* ST6/CC2 e ST40/CC40 avaliadas. Da mesma forma, Zischka et al. (2015) identificaram sequências de fagos em genomas sequenciados de amostras *E. faecalis* pertencentes a ST40.

A presença de profagos também já foi detectada em amostras de *E. faecium*, sendo similares aos identificados em *E. faecalis* (GALLOWAY-PEÑA et al., 2012; MAZAHERI; BARTON; HEUZENROEDER, 2010; QIN et al., 2012, vAN SCHAİK et al., 2010;).

O primeiro estudo reunindo múltiplos genomas de *E. faecalis* foi de Palmer et al., em 2010. A partir da avaliação da sequência de 847 genes de manutenção celular, os autores consideraram que as amostras dessa espécie apresentavam uma divergência filogenética limitada, e atribuíram que a diversidade comumente observada era decorrente da variedade de elementos genéticos móveis presentes. Mais tarde, Werner et al. (2013) inferiram que a falta relativa de sinal filogenético poderia ser resultado também da partilha contínua de informação genética entre as amostras de *E. faecalis*, decorrente da atividade de plasmídeos conjugativos induzíveis por feromônios que transferem grandes fragmentos de DNA cromossômico, que poderia estar moldando a estrutura populacional desta espécie.

Além disso, já foi observado através de análises por MLST que tanto *E. faecalis*, quanto *E. faecium*, de fato apresentam taxas elevadas de recombinação. Este achado veio a impactar diretamente as análises realizadas pelo algoritmo eBurst, um método de análise filogenética, que poderia estar simplificando erroneamente a conformação da estrutura populacional dessas espécies. Aparentemente, isso é ainda mais flagrante para a espécie *E. faecalis* que, através de comparações das topologias das árvores construídas para cada um dos genes de manutenção celular, incluídos no protocolo padrão da técnica de MLST, demonstrou ser ainda mais recombinogênica do que *E. faecium* (TURNE et al., 2007; TEDIM et al., 2015; WILLEMS et al., 2005; WILLEMS et al., 2012).

Diante disso, já foi sugerido que para a avaliação da estrutura populacional de espécies que sofrem maior influência evolutiva por eventos de recombinação seja aplicada a análise ou inferência Bayesiana, também conhecida como *bayesian analysis of the population structure* (BAPS) A análise por BAPS usa um modelo genético-estatístico para particionar um conjunto de amostras em grupos, de acordo com padrões de ascendência e recombinações contidas nas variações de sequências de DNA (AAMODT et al., 2015; CHAGUZA et al., 2016; CORANDER et al., 2012; GORDON et al., 2008; HANAGE et al., 2009; MIKALSEN et al., 2015; SHEPPARD et al., 2011; TANG et al., 2009; TEDIM et al., 2014; WILLEMS et al., 2012). O estudo de Tedim et al. (2015) foi o pioneiro na aplicação da análise por BAPS para investigação da estrutura populacional de *E. faecalis*. Os autores avaliaram 1.310 amostras correspondentes a 523 STs, utilizando dados disponibilizados no banco de dados público. Os dados obtidos sugeriram que a maioria das amostras analisadas pertencia a uma única população recombinante, cuja troca de alelos parece ser independentemente de seu

background genético, origem ecológica (fonte de isolamento, hospitalar ou comunitária, humana ou não humana) ou fenótipo de resistência aos antimicrobianos.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Caracterizar a estrutura populacional de amostras de *Enterococcus faecalis* resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLRA), isoladas de pacientes hospitalizados, através da aplicação de testes fenotípicos e genotípicos, visando à análise de aspectos relacionados à resistência aos antimicrobianos, virulência e diversidade.

1.2 Específicos:

- a) caracterizar os perfis de resistência aos antimicrobianos associados as amostras de *E. faecalis* portadoras do fenótipo HLRA;
- b) desenvolver, padronizar e aplicar a metodologia de PCR em protocolos de multiplex para detecção e caracterização de genes associados à expressão do fenótipo HLAR e de virulência;
- c) caracterizar perfis genotípicos de HLAR e de virulência, a partir de um painel desenvolvido para detecção de 12 e 9 genes, respectivamente, para avaliar a dispersão desses determinantes em amostras de *E. faecalis* portadoras do fenótipo HLRA;
- d) aplicar metodologias de tipificação bacteriana, como PFGE e MLST, para determinação da diversidade das amostras de *E. faecalis* e detecção de clones específicos, que estejam associados a aspectos de resistência aos antimicrobianos e de virulência;
- e) contribuir para elucidação dos aspectos evolutivos das amostras de *E. faecalis* portadoras do fenótipo HLRA e a circulação e persistência de determinados clones em instituições de saúde do Estado do Rio de Janeiro, e comparar com dados representativos do cenário mundial disponíveis em bancos internacionais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Este estudo avaliou amostras bacterianas pertencentes à espécie *Enterococcus faecalis* resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLRA) isoladas de diferentes fontes clínicas, provenientes de pacientes atendidos em 11 instituições de saúde localizadas no Estado do Rio de Janeiro, no período de 2005 a 2013. As amostras utilizadas foram selecionadas a partir da coleção de culturas de *Enterococcus* do Laboratório de Apoio Biotecnológico, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a coordenação da Professora Lúcia Martins Teixeira. As amostras bacterianas estavam mantidas a -20°C em solução de leite desnatado a 10% (*Skim Milk*, BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, EUA) acrescida de 10% de glicerol.

A partir do meio de manutenção, as amostras bacterianas foram reativadas por semeadura em meio ágar sangue de carneiro (AS, Plast-Labor Ind e Com. Materiais e Equipamentos de Laboratório, Rio de Janeiro, RJ) e incubação por 18h–24h a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após inspeção visual as culturas puras, apresentando características comuns de enterococos em relação à morfologia colonial e à atividade hemolítica (alfa ou não hemolíticas em ágar sangue de carneiro) foram subcultivadas (nas mesmas condições) para realização dos demais testes. Todos os testes foram realizados a partir de crescimento bacteriano recente (18h a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$), de uma cultura pura semeada por técnica de esgotamento em meio AS.

Foram selecionados 306 amostras representantes da espécie *E. faecalis*, a partir de uma coleção de culturas de 742 amostras isoladas de material clínico de pacientes atendidos em hospitais localizados no Estado do Rio de Janeiro, cujo critério de seleção foram apresentar confirmação da identificação para espécie de interesse do estudo, *E. faecalis*, e o fenótipo HLAR (resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos) através de uma triagem inicial desse atributo de resistência por testes de difusão em ágar e da concentração inibitória mínima, conforme descrito no item 3.2.

2.2 Confirmação da espécie bacteriana e do fenótipo de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLAR)

2.2.1 Testes fisiológicos para caracterização de *E. faecalis*

As amostras foram submetidas a testes convencionais, segundo as recomendações de Teixeira et al. (2012) para a caracterização fisiológica do gênero e espécie. Todos os testes foram realizados sempre a partir de cultivos recentes em meio AS.

Para a caracterização do gênero *Enterococcus* foram realizados os testes de produção de catalase, hidrólise da esculina na presença de 40% de bile (Teste BE), crescimento em presença de NaCl a 6,5%, hidrólise do L-pirrolidonil- β -naftilamida (teste do PYR) e hidrólise de L-leucina- β -naftilamida (teste do LAP). Para controle dos testes, foram utilizadas as seguintes amostras de referência: *Aerococcus viridans* ATCC 11563 (negativa para o teste do LAP), *E. faecalis* ATCC 19433 (como referência para o gênero), *S. aureus* ATCC 25923 (catalase positiva) e *Streptococcus sanguinis* SS 910 (negativa para os testes de catalase, BE, NaCl 6,5% e PYR).

A produção de catalase foi avaliada misturando-se, sobre uma lâmina de vidro, uma gota de uma suspensão bacteriana (em solução salina fisiológica) com uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v). A ausência da formação de bolhas foi considerada indicativa da reação negativa característica de *Enterococcus*. O teste BE foi realizado a partir da semeadura das amostras em ágar Bile Esculina (*Bile Esculin Agar*, BD Diag.). Após incubação a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 h – 24 h, a positividade do teste, característica do gênero *Enterococcus*, foi considerada pelo escurecimento do meio, decorrente da hidrólise da esculina (em presença de 40% de sais biliares) em esculetina, que reage com os íons férricos presentes no meio. A avaliação da tolerância a elevadas concentrações de sais foi verificada inoculando-se as amostras em *Heart Infusion Broth* (HIB, BD Diag.) ajustado para 6,5% de NaCl (Merck S.A., São Paulo, SP) e 0,5% de glicose, acrescido de 0,1% do indicador de pH púrpura de bromocresol (ambos obtidos da Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) e incubado $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 h – 24 h. A turvação do meio e/ou a mudança da cor do indicador de pH de púrpura para amarelo indica crescimento do microrganismo e positividade do teste, como para *Enterococcus*. Os testes do PYR e do LAP foram efetuados a partir do preparo de suspensões bacterianas espessas em 0,2 mL do meio *Todd-Hewitt Broth* (THB), BD Diag, contendo 0,01% ou 0,02% do substrato (ambos obtidos da Sigma-Aldrich Co.), respectivamente. Após incubação a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 4 h, foram adicionadas duas gotas da solução reveladora contendo dimetilamino

cinamaldeído (Sigma-Aldrich Co.) a 1%, em HCl a 10% (v/v). A determinação da atividade enzimática foi evidenciada pela formação da coloração rosa forte ou púrpura. A positividade em ambos os testes é característica da maioria das espécies de *Enterococcus*, incluindo *E. faecalis*.

Para a caracterização de *E. faecalis* foi utilizada uma bateria de testes, recomendada para identificação das espécies do gênero, que inclui a detecção da presença de pigmento, motilidade, decarboxilação da arginina, utilização do piruvato de sódio e utilização de carboidratos, como descrito a seguir. Os testes foram incubados por até sete dias a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, excetuando-se o teste de motilidade que foi incubado a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pelo mesmo período. As amostras de referência *E. casseliflavus* ATCC 12755, *E. faecalis* ATCC 19433 (como referência para a espécie), *E. faecium* ATCC 1943, *E. gallinarum* NCDO 2313 e *E. raffinosus* NCDO 1278 foram utilizadas no controle da qualidade dos testes.

A produção de pigmento foi verificada diretamente a partir de um crescimento recente em AS, pela visualização de colônias apresentando pigmento amarelo. Entretanto, os membros da espécie *E. faecalis* são negativos para este teste. O teste de motilidade foi efetuado a partir da inoculação da amostra bacteriana, com auxílio de uma agulha bacteriológica, em meio semi-sólido *Motility Medium* (BD Diag.) acrescido de 0,04% de caldo nutriente (BD Diag.) e 0,01% de NaCl (Merck S.A., São Paulo, SP). A espécie *E. faecalis* é imóvel, portanto negativa neste teste. A avaliação da decarboxilação da arginina consistiu no inóculo das amostras bacterianas em meio *Decarboxylase Base Möeller* (BD Diag.) acrescido de 1% de L-arginina (Sigma-Aldrich Co.) e, em sequência, foi adicionada uma camada de aproximadamente 10 mm de óleo mineral estéril. No teste negativo, o meio assume coloração amarela (devido à acidificação pela fermentação da glicose, também presente no meio) e no positivo, coloração púrpura (devido à alcalinização do meio, pela liberação de aminas alcalinas devido à decarboxilação da arginina), conseqüente a presença dos indicadores de pH vermelho de cresol e púrpura de bromocresol. A espécie *E. faecalis* é positiva no teste de decarboxilação da arginina. A utilização do piruvato de sódio foi avaliada em meio contendo 1% de Triptona (BD Diag.), 0,5% de extrato de levedura (Difco Labs.), 0,5% de K_2HPO_4 (Merck S.A.), 0,5% de NaCl (Merck S.A.), 0,01% do indicador de pH bromotimol e 1% de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich Co.). Testes positivos são reconhecidos pelo aparecimento da coloração amarela, resultante da utilização do substrato como fonte única de carbono e acidificação do meio. Os testes de utilização de carboidratos foram realizados em meio *Heart Infusion Broth* (HIB, Difco Labs.) acrescido de 1% (p/v) do respectivo carboidrato e de 0,1 % do indicador de pH púrpura de bromocresol. A mudança de cor do indicador de púrpura para amarelo é resultante da utilização do carboidrato e acidificação do meio, determinando a positividade do teste. Os carboidratos testados foram: L-arabinose, manitol, D-rafinose, sacarose, sorbitol, D-sorbose e metil- α -glicopiranosídeo.

2.2.2 Aplicação da metodologia de espectrometria de massas MALDI-TOF (*matrix associated laser desorption-ionization time of flight*) na caracterização das amostras de *E. faecalis*

Para extração das proteínas, a partir de um cultivo recente (18 h – 24 h a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) em meio AS, foram retiradas algumas colônias bacterianas, com auxílio de alças bacteriológicas (1 mm de diâmetro) descartáveis estéreis, que foram depositadas em tubos tipo Eppendorf (Axygen Scientific Inc., Corning Inc., Corning, NY, EUA). Sobre as massas bacterianas foram adicionados 20 μl de ácido fórmico a 70% (Sigma-Aldrich Co.) e as suspensões homogeneizadas em vortex por 10 seg. Em sequência, foram adicionados 20 μl de acetonitrila (Sigma-Aldrich Co.), e as suspensões foram novamente homogeneizadas nas mesmas condições. Após centrifugação a 10.000 g por 5 min, os sobrenadantes, contendo as proteínas, foram utilizados nos testes.

Para obtenção dos espectros, 1 μl de cada sobrenadante (extratos proteicos) foi depositado em placa de aço polido (*MSP 96 target polished steel BC*, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemanha), deixados secar a temperatura ambiente e posteriormente cobertos com 1 μL de uma solução saturada da matriz AHC (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, Sigma-Aldrich Co.). Após secagem em temperatura ambiente, a placa foi submetida as análises em espectrômetro de massa Microflex LT (Bruker Daltonik), utilizando-se o software FlexControl no modo automático (MBT_FC.par) para gerar os espectros. A amostra *E. coli* J53 foi utilizada para calibrar o equipamento.

2.2.3 Caracterização do fenótipo HLAR pelo teste de disco difusão e determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a realização do teste de difusão em ágar, foram seguidas as recomendações do *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2016). Para tal, a partir de um crescimento recente em meio AS, foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina fisiológica (NaCl 0,85%), com turbidez ajustada para a equivalente ao padrão de 0,5 da escala de McFarland. O inóculo padronizado foi semeado com auxílio de um *swab* estéril e de forma semiconfluente em meio ágar Müeller-Hinton (MHA, BD Diag.). Sobre o inóculo

padronizado, foram depositados discos comerciais (Oxoid Ltd., Cambridge, Inglaterra) de gentamicina (120 µg) e de estreptomicina (300 µg), específicos para esse teste, pois contêm concentrações elevadas destes antimicrobianos. Após incubação por 16h–18h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, foi realizada a leitura dos halos de inibição (em mm) para definição da categoria de susceptibilidade. A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com os critérios preconizados pelo documento do CLSI (2016) e para estreptomicina também pelo do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2016), para fins comparativos.

As CIMs foram determinadas por metodologia de diluição em ágar, para amostras com resultados inconclusivos no TDD, ou ainda que tenham apresentado incongruências entre fenótipo e genótipo (conforme item 3.5.2) de HLAR. A metodologia utilizada seguiu as recomendações de execução estabelecidas pelo documento M02-A10 do *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2012) e critérios de interpretação preconizados pelo documento M100-S25 (CLSI, 2016). Para realização do teste, inicialmente foram preparadas placas de MHA contendo diluições duplas seriadas de gentamicina, no intervalo de 0,5 µg/mL a 512 µg/mL, e de estreptomicina (ambos os antimicrobianos obtidos da Sigma-Aldrich Co.), no intervalo de 0,25 µg/mL a 2.048 µg/mL, além de placas sem a adição de antimicrobianos, que foram utilizadas como controle do crescimento bacteriano. Volumes de 1µl de suspensões bacterianas confeccionadas em salina fisiológica (a partir de crescimento recente em AS), correspondendo à turvação equivalente a 0,5 McFarland, foram inoculados nas placas contendo as diferentes concentrações dos antimicrobianos, com auxílio de um multi-inoculador (replicador) do tipo Steers. A CIM foi considerada como a menor concentração onde não foi detectado visualmente crescimento bacteriano, após incubação a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, por até 24h para gentamicina e 48h para estreptomicina. As amostras de referência *E. faecalis* ATCC 29212 (sensível) e ATCC 51299 (portadora de HLAR) foram utilizadas como controles dos testes.

2.3 Caracterização dos perfis de resistência aos antimicrobianos, por testes de disco difusão das amostras de *Enterococcus faecalis* HLAR

A determinação de perfis de resistência, frente a um painel composto por 14 antimicrobianos, foi realizada por metodologia de difusão em ágar, de acordo com o descrito

anteriormente no item 3.2.3, seguindo recomendações do CLSI (2009; 2016) para execução e interpretação dos testes. Foram utilizados discos impregnados com os seguintes antimicrobianos e respectivas concentrações: ampicilina, 10µg; ciprofloxacina, 5µg; cloranfenicol, 30µg; eritromicina, 15µg; fosfomicina, 200µg; levofloxacina, 5µg; linezolida, 30µg; nitrofurantoína, 300µg; norfloxacina, 10µg; penicilina, 10µg; rifampicina, 5µg; teicoplanina, 30µg; tetraciclina, 30µg; e vancomicina, 30µg. A incubação dos testes foi por 18 h a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, exceto para vancomicina, cujo período foi de 24 h. As amostras de referência *E. faecalis* ATCC 29212 e *S. aureus* ATCC 25923 foram incluídas para controle da qualidade dos testes.

2.4 Detecção de amostras produtoras de beta-lactamase

As amostras que apresentaram resistência à penicilina foram testadas para verificação da produção da enzima beta-lactamase, pelo emprego do kit *Beta-lactamase Nitrocefin Touch Sticks* (Oxoid Ltd.), segundo as recomendações do fabricante. O teste consiste de pequenos palitos que apresentam uma das extremidades embebida em nitrocefin (ligado a um cromógeno), que é substrato para a enzima. A extremidade que apresenta o substrato é colocada em contato com colônias da amostra teste, que estejam mais próximas da borda dos halos de inibição em testes de susceptibilidade aos beta-lactâmicos em meio MHA. A realização do teste a partir do crescimento em TDD baseia-se na necessidade prévia de indução da expressão da enzima, em presença do antimicrobiano, que é característico para enterococos. A alteração de cor para púrpura, resultante da degradação do anel beta-lactâmico e liberação do cromógeno, é indicativa de positividade do teste. As amostras *S. aureus* ATCC 25923 (positiva) e *E. faecalis* ATCC 29212 (negativa) foram utilizadas como controles.

2.5 Detecção de genótipos de resistência e de virulência

Para a detecção dos genes envolvidos na resistência aos aminoglicosídeos e aos glicopeptídeos e na virulência de *E. faecalis* foi utilizado protocolos por recomendações anteriores ou ainda foram desenvolvidos e padronizados neste estudo (Quadro 1).

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

Característica / Genes	Sequências iniciadoras (Direção 5'–3')	C pmol	Tamanho do amplicon (pb)	Referência	Protocolo ² da PCR multiplex
Resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLAR):					
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	F: CAGGAATTTATCGAAAATGGTAGAAAAG R: CACAATCGACTAAAGAGTACCAATC	25	369		
<i>aph(2'')-Ib</i>	F: CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC R: GTTTGTAGCAATTCAGAAAACCCCTT	25	867		
<i>aph(2'')-Ic</i>	F: CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC R: CCACAGCTCCGATAGCAAGAG	3,5	444	Vakulenko et al., 2003	Reação 1 _{HLAR}
<i>aph(2'')-Id</i>	F: GTGGTTTTTACAGGAAATGCCATC R: CCCTCTCATACCAATCCATATAACC	5,0	641		
<i>aph(3')-IIIa</i>	F: GGCTAAAAATGAGAATATCACCCGG R: CTTTAAAAAATCATAACAGCTCGCG	3,0	523		
<i>ant(4')-Ia</i>	F: CAAACTGCTAAATCGGTAGAAAGCC R: GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT	2,0	294		
<i>ant(6')-Ia</i>	F: ACTGGCTTAATCAATTTGGG R: GCCTTTCCGCCACCTCACCG	1,25	577	Swenson et al., 1995	
<i>ant(3')-Ia</i>	F: ACCGTAAGGCTTGATGAAACA R: GCCGACTACCTTGGTGATCTC	25	624	Leelaporn et al., 2008	Reação 2 _{HLAR}
<i>ant(9')-Ia</i>	F: GGTTCAGCAGTAAATGGTGGT R: TGCCACATTTCGAGCTAGGGTT	25	476	Mahbub et al., 2005	
<i>ant(9')-Ib</i>	F: CGTCGTATCTGAACCATTGACA R: TCCATAATGGCTCTTCTCAC	25	351		
Resistência aos glicopeptídeos:					
<i>vanA</i>	F: GGGAAAACGACAATTGC R: GTACAATGCGGCCGTTA	25	732	Dutka-Malen et al., 1995	
<i>vanB</i>	F: ACGGAATGGGAAGCCGA R: TGCACCCGATTTTCGTTT	25	647		
<i>vanC1/2</i>	F: ATGGATTGGTAYTKGTATA R: TAGCGGGAGTGMCYMGTAAA	25	815/827	Depardieu, Perichon ; Courvalin, 2004	Reação Única
<i>vanD</i>	F: TGTGGGATGCGATATTCAA R: TGCAGCCAAGTATCCGGTAA	25	500		
<i>vanE</i>	F: TGTGGTATCGGAGCTGCAG R: ATAGTTTAGCTGGTAAC	25	430		
<i>vanG</i>	F: CGGCATCCGCTGTTTTTGA R: GAACGATAGACCAATGCCTT	25	941		
Virulência:					
<i>asaI</i>	F: GCACGCTATTACGAACTATGA R: TAAGAAAGAACATCACACGA	40	375		
<i>cylA</i>	F: ACTCGGGGATTGATAGGC R: GCTGCTAAAGCTGCGCTT	40	688	Vankerckhoven et al., 2004	Reação 1 _{VIR}
<i>Esp</i>	F: AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG R: AATTGATTCTTTAGCATCTGG	40	510		
<i>Hyl</i>	F: ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG R: GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	40	276		
<i>gelE</i>	F: ACCCCGTATCATTGGTTT R: ACGCATTGCTTTTCCATC	40	405	Gomes et al., 2008	
<i>efaA</i>	F: GACAGACCCTCACGAATA R: AGTTCATCATGCTGCTGTAGTA	30	705	Eaton ; Gasson, 2001	
<i>aggA</i>	F: AAGAAAAAGTAGACCAAC R: AACGGCAAGACAAGTAAATA	60	1.553		Reação 2 _{VIR}
<i>eeP</i>	F: GAGCGGGATTTTGTAGTTTCGT R: TACTCCAGCATTGGATGCT	30	937	Bittencourt et al., 2004	
<i>Ace</i>	F: AAAGTAGAATTAGATCCACAC R: TCTATCACATTCCGGTTGCG	60	320	Mannu et al., 2003	

Nota: PCR, reação em cadeia da polimerase; pb, tamanho em pares de base; ²Protocolos de acordo com o item 3.5 de Materiais e Métodos; Concentração em pmol (C); *foward* (F, em português: oligonucleotídeo de ordem direta), *reverse* (R, em português: oligonucleotídeo de ordem reversa); Nucleotídeos: adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T); apenas tautômeros cetos de G ou de T (K); apenas tautômeros amino de A ou de C (M); qualquer pirimidina: T ou C (Y).

Fonte: A autora, 2017.

2.5.1 Obtenção do DNA molde

O DNA molde foi obtido de acordo com as recomendações de Pinto et al. (2013). A partir de um crescimento recente em AS, foi confeccionada uma suspensão bacteriana densa em 200 µL de uma solução aquosa contendo 5% de Chelex p/v (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e 0,2 mg/mL de proteinase K (Invitrogen, Life Technologies do Brasil, São Paulo, SP). As suspensões bacterianas foram incubadas em banho térmico a 56°C por 1 h, homogeneizadas em vortex por 10 seg, submetidas a banho fervente por 10 min e mais uma vez homogeneizadas em vortex por mais 10 seg. Após centrifugação a 10.000 g por 3 min, os sobrenadantes foram estocados em -4°C ou imediatamente utilizados nas reações de PCR, como fonte de DNA molde.

2.5.2 Detecção dos genótipos associados à resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos

A amplificação dos genes que determinam resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLAR) foi pesquisada através do emprego de duas reações de PCR multiplex. Na Reação 1_{HLAR}, foram incluídos oligonucleotídeos iniciadores específicos para a detecção de genes associados a resistência aos antimicrobianos desta classe, excetuando-se à estreptomicina, são eles: *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id*, *aph(3')-IIIa* e *ant(4')-Ia*. O protocolo utilizado seguiu as recomendações de Vakulenko et al.(2003).

Já na Reação 2_{HLAR} foram incluídos iniciadores específicos para a detecção de genótipos relacionados com a resistência a níveis elevados de estreptomicina, como: *ant(6')-Ia*, *ant(3')-Ia*, *ant(9')-Ia* e *ant(9')-Ib*. Nesta, as concentrações e condições utilizadas foram padronizadas neste estudo.

A Reação 1_{HLAR}, para o volume final de 50µl, foi composta por 5µl de DNA molde (obtido conforme descrito no item 3.5.1), 1X tampão PCR [10mM Tris, 50mM KCl (pH 8,3)], 1,5mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 0,1mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), 2U da enzima *Platinum Taq* DNA polimerase e os pares de oligonucleotídeos iniciadores, conforme apresentado no item 2.5. Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador (*Veriti 96-Well Thermal Cycler*, Applied Biosystems, Branchburg, NJ, EUA), partindo-se de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 min, 35 ciclos a 94°C por 40 seg, anelamento a 55°C

por 40 seg e extensão a 72°C por 40 seg. Por fim, foi realizada etapa de extensão final por 10 min a 72°C.

Também para o volume final de 50µl, a mistura da Reação 2_{HLAR} constou de 5µl de DNA molde (obtido conforme item 3.5.1), 1X tampão de PCR, 3mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP e 1,25 U da enzima *Platinum* Taq DNA polimerase, além dos pares de oligonucleotídeos iniciadores conforme especificado na TABELA 1. Todos os reagentes foram obtidos da Invitrogen, Life Tech. Os ciclos utilizados, em termociclador, para reação 2 foram: uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, 30 ciclos a 94°C por 1min, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min e, ao final, uma etapa de extensão por 10 min a 72°C.

2.5.3 Detecção dos genótipos associados à resistência aos glicopeptídeos

As amostras não susceptíveis aos glicopeptídeos (categorias intermediária e resistente), identificadas nos testes disco difusão, foram avaliadas por metodologia de PCR multiplex para detecção dos genes *vanA*, *vanB*, *vanC1/2*, *vanD*, *vanE* e *vanG*. O protocolo utilizado seguiu as recomendações de Depardieu, Perichon ; Courvalin (2004).

A mistura de reação constou de 1µL da suspensão do DNA (obtido como descrito no item 3.5.1), 1X PCR buffer, 2mM de MgCl₂, 0,25mM de cada dNTP e 1U da enzima *Platinum* Taq DNA polimerase, além dos oligonucleotídeos iniciadores, conforme descrito no item 2.5, para o volume final de 25 µL. Todos os reagentes foram obtidos da Invitrogen, Life Tech. As misturas foram submetidas a 1 ciclo de 95°C por 10 min, 30 ciclos de 94°C por 30 seg, para desnaturação do DNA; 54°C por 30 seg, para o anelamento dos iniciadores; e 72°C por 30 seg, para extensão das novas fitas de DNA; além de 1 ciclo de extensão final a 72°C por 10 min, em termociclador.

As amostras *E. faecalis* A256 (*vanA*), *E. faecalis* V583 (*vanB*), *E. gallinarum* SS1228 (*vanC1*), *E. casseliflavus* SS1229 (*vanC2*) e *E. faecium* Dalla 1b (*vanD*) foram utilizadas como controles positivos das reações. Não foram utilizados controles para os genes *vanG* e *vanE*.

2.5.4 Detecção dos genótipos associados à expressão de fatores de virulência

Foi avaliada 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; *efaA*, antígeno A; *aggA*, substância de agregação; e *eep*, determinante de feromônio. Para tal, duas reações em protocolos multiplex foram utilizadas para detecção da presença desses genes.

A Reação 1_{VIR} seguiu as recomendações de Vankerckhoven et al. (2004) e compreendeu a amplificação dos genes *asa1*, *cylA*, *esp*, *hyl*, e *gelE*. As misturas de reação, para um volume final de 25 µL, constaram de 2,5µL da suspensão do DNA molde (conforme item 3.5.1), 1X PCR buffer, 3mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 1,25 U de *Platinum Taq* polimerase e os pares de iniciadores conforme descrito na TABELA 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.

O protocolo de PCR multiplex que originou a Reação 2_{VIR} foi padronizado neste estudo, baseado nas descrições anteriores de Eaton ; Gasson (2001), Mannu et al. (2003) e Bittencourt et al. (2004). Para o volume final de 25 µL, as misturas de reação constaram de 2,5µL da suspensão do DNA molde (segundo item 3.5.1), 1X PCR buffer, 2mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 1 U de *Platinum Taq* polimerase e os oligonucleotídeos iniciadores conforme demonstrado no item 2.5. 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, 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, em termociclador. Todos os reagentes utilizados em ambos os protocolos foram obtidos da Invitrogen, Life Tech.

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_{VIR}; enquanto que, *E. faecalis* CL6738 (*efa*⁺, *agg*⁺, *eep*⁺, *ace*⁺) foi controle positivo para Reação 2_{VIR}.

2.5.5 Eletroforese e análise dos produtos amplificados

Após as etapas em termociclador, os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese, por 1 h a 100V, em gel de agarose (*UltraPure 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 em água pelo mesmo período e em seguida, visualizados e fotografados 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 (100 pb Ladder – Invitrogen Co.) utilizado para estimar o tamanho dos produtos amplificados.

2.6 **Caracterização da Diversidade e Estrutura Populacional de *E. faecalis***

2.6.1 Perfis de fragmentação do DNA cromossômico por eletroforese em campo pulsado (PFGE, *pulsed-field gel electrophoresis*)

O protocolo utilizado seguiu as recomendações de Teixeira et al. (1997). A partir de um crescimento recente, em meio AS, foram preparadas suspensões bacterianas em 500 µL de tampão PIV (1M NaCl, 10mM 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 também em tampão PIV, foi adicionada às suspensões celulares. A mistura foi, imediatamente, vertida em moldes que, após solidificação, deram origem a pequenos blocos contendo as células bacterianas. O DNA cromossômico bacteriano foi obtido pela técnica de lise *in situ*. Para tal, os blocos foram 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.

Em seguida, a solução de lise foi substituída por tampão ESP (0,5mM EDTA, pH 9,5; 1% Sarcosyl; 1mg/mL de proteinase K, esta última obtida da Sigma-Aldrich Co.) e incubação por 18 h – 24 h a 50°C em banho térmico. Os blocos foram, então, submetidos a quatro etapas de lavagem 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 *SmaI* (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EUA). Após a retirada do tampão, cada bloco foi incubado com 2U da respectiva enzima por 18 h – 24 h a 25°C em banho térmico.

Após o período de digestão com *SmaI*, os blocos foram fundidos a 70°C e aplicados em gel de agarose (*UltraPure Agarose*, Invitrogen, Life Tech.) a 1,2% em TBE 0,5X. Os fragmentos foram separados em um sistema de eletroforese em campo pulsado (*CHEF DRIII Variable Angle System*, Bio-Rad Lab.), por 22 h a 13°C com pulsos iniciais de 5 seg e finais de 35 seg, ângulo 120° e a 6V/cm. Os géis foram corados com 0,5 µg/mL brometo de etídeo por 30 min, descorados em água por 2 h e as imagens capturadas como descrito no item 3.6. Os perfis eletroforéticos foram analisados com auxílio do aplicativo *BioNumerics 7.6* (Applied Maths, Bélgica), utilizando-se o coeficiente de Dice para determinação dos percentuais de similaridade e o método de agrupamento UPGMA (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*) para construção dos dendrogramas.

2.6.2 Tipificação por sequenciamento de múltiplos loci (MLST, *multilocus sequence typing*)

A tipificação das amostras de *E. faecalis* por MLST foi realizada segundo as recomendações de Ruiz-Garbajosa et al. (2006). A metodologia utilizada fundamenta-se na amplificação e sequenciamento de regiões internas dos seguintes sete genes de manutenção celular (*housekeeping genes*): *aroE*, *gdh*, *gki*, *gyd*, *pstS*, *xpt* e *yqil*.

O DNA das amostras foi obtido conforme já descrito no item 3.5.1. Para detecção de cada alelo, preparou-se reações de PCR, individuais para cada gene, que constaram de 0,3 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Quadro 2), 0,2 mM de cada dNTP, 1U de *Platinum Taq* polimerase, 2mM de MgCl₂ e 1 µL da suspensão do DNA molde, para um volume final de 30 µL. As condições da PCR foram as seguintes: 1 ciclo de 95°C por 10 min, 30 ciclos de 94°C por 30 seg, para desnaturação do DNA, 50°C por 30 seg, para o anelamento dos iniciadores, e 72°C

por 30 seg, para extensão das novas fitas de DNA, e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5 min, em termociclador.

Os produtos amplificados foram purificados com o reagente ExoSAP IT (Affymetrix and USB Products, Thermo Fisher Scientific, Santa Clara, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, a concentração de cada amplicon foi determinada empregando-se o kit *Quant-IT dsDNA BR Assay* com auxílio de um fluorômetro (Qubit, Invitrogen, Thermo Fisher Sci., Waltham, MA, EUA). As reações de sequenciamento foram preparadas em placas de 96 poços (*MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate*, Applied Biosystems) contendo: 0,32 µM dos oligonucleotídeos iniciadores, 1 µL do kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) e 50-100ng de DNA para um volume final de 10 µL. O ciclo de sequenciamento foi realizado em termociclador com os seguintes parâmetros: 25 ciclos de 96°C por 10 min, 50°C por 5 seg e 60°C por 4 min.

Os produtos da reação foram sequenciados no AB 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências foram editadas com auxílio do aplicativo de domínio público BioEdit (*Biological Sequence Alignment v.7.0.4*, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, EUA). As definições dos alelos de cada gene e do perfil de MLST (ST) foram realizadas através por consulta a banco de dados PubMLST *E. faecalis* (Jolley; Maiden, 2010).

As sequências obtidas foram incluídas no banco de dados, para comparação e determinação do alelo de cada locus. O conjunto dos alelos determina o tipo MLST – tipo ST – correspondente. Os resultados foram importados como valores de caracteres para o software BioNumerics versão 7.6, utilizando-se o coeficiente de agrupamento UPGMA para construção do dendograma usando a medida de distância baseada no número de diferenças de loci entre os perfis. Para visualizar as relações entre as amostras, foram geradas árvores (MSTs, *standard minimum spanning trees*) empregando-se o coeficiente categórico e variações de um a dois loci foram consideradas para evitar a criação de relações hipotéticas. Os complexos clonais (CC) foram criados utilizando-se o método da distância máxima entre vizinhos (*maximum neighbor distance*), que é dada pelas alterações em dois loci, em um mínimo de dois perfis de MLST por CC.

Quadro 2 – Genes de manutenção celular, oligonucleotídeos iniciadores e tamanhos dos produtos obtidos nas reações de PCR integrantes do esquema de tipificação de amostras de *Enterococcus faecalis* por metodologia de MLST¹

Gene	Produto	Sequências iniciadoras (Direção 5'–3')	Tamanho do amplicon (pb)
<i>aroE</i>	Chiquimato quinase	F: TGGAAAAC TTTACGGAGACAGC R: GTCCTGTCCATTGTTCAAAAGC	459
<i>gdh</i>	Glicose 6-fosfato desidrogenase	F: GGCGCACTAAAAGATATGGT R: CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	530
<i>gki</i>	Glicoquinase	F: GATTTTGTGGGAATTGGTATGG R: ACCATTAAAGCAAATGATCGC	438
<i>gyd</i>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	F: CAAACTGCTTAGCTCCAATGG R: CATTTCGTTGTCATACCAAGC	395
<i>pstS</i>	Proteína transportadora de cassete de ligação de ATP	F: CGGAACAGGACTTTTCGC R: ATTTACATCACGTTCTACTTGC	583
<i>xpt</i>	Xantina fosforibosil transferase	F: AAAATGATGGCCGTGTATTAGG R: AACGTCACCGTTCCTTCACTTA	456
<i>yqil</i>	Acetil-CoA acetil transferase	F: CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG R: GAATATCCCTTCTGCTTGTGCT	436

Nota: PCR, reação em cadeia da polimerase; ¹MLST, tipificação por sequenciamento de multilocus; ¹ segundo as recomendações de Ruiz-Garbajosa et al., 2006; pb, tamanho em pares de base; *foward* (F, em português: oligonucleotídeo de ordem direta), *reverse* (R, em português: oligonucleotídeo de ordem reversa); Nucleotídeos: adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T).

Fonte: A autora, 2017.

3 RESULTADOS

As amostras bacterianas incluídas neste estudo foram selecionadas a partir da coleção de culturas do Laboratório de Apoio Biotecnológico, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O critério de seleção foi baseado na identificação prévia da espécie e época de isolamento, determinado como o período compreendido entre Janeiro de 2005 a Janeiro de 2013. A partir do banco de dados do laboratório, foram selecionadas 742 amostras que preenchiam os critérios indicados e que eram provenientes de espécimes clínicos diversos, de pacientes atendidos em 11 diferentes hospitais localizados no estado do Rio de Janeiro. Para identificar a presença de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLAR), as amostras foram avaliadas por metodologia de disco-difusão, utilizando-se discos contendo concentrações elevadas de gentamicina e estreptomicina (120 µg e 300 µg, respectivamente).

De acordo com os resultados obtidos, das 742 amostras bacterianas inicialmente selecionadas, 273 apresentaram resistência a um ou a ambos os aminoglicosídeos. Além destas, 33 amostras apresentaram resultados inconclusivos, sendo 27 para estreptomicina e seis para a gentamicina, de acordo com os critérios de interpretação do CLSI (2016). As 33 amostras apresentaram halos de inibição que variaram de 7 mm a 9 mm.

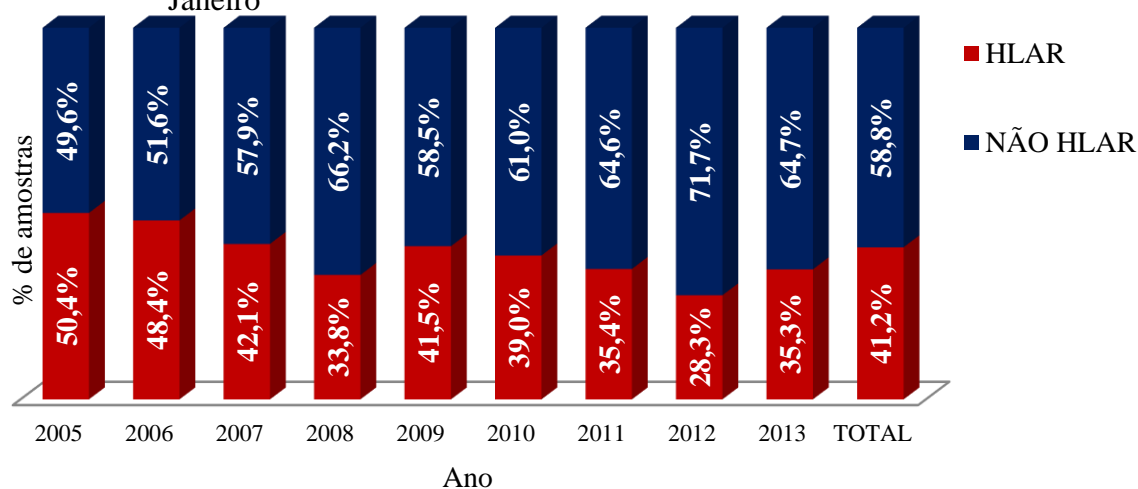
Comparando-se os pontos de corte determinados no CLSI (2016) com os do EUCAST (2016), pode ser observada uma discordância para interpretação dos dados entre os dois documentos. Pelos critérios determinados pelo EUCAST (2016), as 27 amostras consideradas como inconclusivas seriam classificadas como resistentes a níveis elevados de estreptomicina (resistente: halo de inibição <14 mm). Em relação às amostras inconclusivas para caracterização da resistência a níveis elevados para gentamicina, não foi possível estabelecer uma comparação entre os dois documentos, pois a concentração do antimicrobiano no disco que é padronizada pelo EUCAST (30 µg) difere do que foi utilizado, baseado nos critérios do CLSI (120 µg).

As amostras inconclusivas foram avaliadas por metodologia de diluição em ágar, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os resultados revelaram valores de CIM >512 µg/ml para as seis amostras que foram inicialmente consideradas inconclusivas para gentamicina, e CIM >2.048 µg/ml para as 27 amostras avaliadas para estreptomicina. Estes valores de CIM incluíram todas as 33 amostras na categoria resistente e, portanto, portadoras do fenótipo HLAR, tanto pelos critérios do CLSI (2016) quanto do EUCAST (2016).

A caracterização em espécie das 306 amostras exibindo HLAR foi confirmada pelo emprego de um painel de testes fisiológicos e pela metodologia de espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS). Todas as amostras apresentaram o perfil esperado na caracterização por testes fenotípicos, não sendo observado nenhum comportamento atípico. Isto é, foram cocos Gram positivos, catalase negativa, positivas nos testes de bile esculina, crescimento em meio contendo 6,5% de NaCl, PYR e LAP, confirmando a identificação do gênero. Além disso, foram imóveis, não pigmentadas, positivas nos testes de utilização do piruvato de sódio e de decarboxilação da arginina, utilizaram os açúcares manitol, sorbitol e sacarose, com a produção de ácidos, e não o fizeram para arabinose, MGP, rafinose e sorbose, confirmando assim a caracterização da espécie. Pela metodologia de MALDI-TOF MS, 87,3% (267/306) das amostras apresentaram escore acima de 2,3, que segundo o fabricante do equipamento garante a classificação em gênero e espécie. Os 13,7% restantes (39 amostras) apresentaram escores com valores na faixa de 2,0 a 2,299 que assegura a caracterização do gênero e indica como provável a de espécie. Cabe ressaltar que todas as 306 amostras apresentaram valores de escores $\geq 2,049$.

A Figura 1 apresenta a distribuição das 742 amostras por ano, considerando o período de estudo de 2005 a 2013 e a caracterização do fenótipo HLRA. O percentual de amostras portadoras de HLAR por ano variou de 28,3% (n=17/60) em 2012 a 50,4% (n=63/125) em 2005 (Figura 1).

Figura 1 – Frequência do fenótipo de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLAR) por ano (período de 2005 a 2013), de 742 amostras de *E. faecalis* oriundas de 11 instituições hospitalares localizadas no estado do Rio de Janeiro



Fonte: A autora, 2017.

A distribuição das amostras por ano e por espécime clínico de origem está apresentada na Tabela 1. Do total de amostras, 257 (84,0%) foram obtidas de espécimes clínicos sugestivos de quadros infecciosos, 32 (10,5%) de culturas de vigilância (fezes / *swab* retal) e para 17 (5,5%) não foi possível obter essas informações.

As 257 amostras provenientes de espécimes clínicos considerados sugestivos de infecção foram coletadas no período de 2005 a 2013. A maioria foi obtida de urina (44,1%; 135/306), seguida de sangue (18,6%; 57/306). As 32 (10,5%) amostras bacterianas obtidas de culturas de vigilância foram coletadas nos anos de 2006, 2009-2010 e 2013 (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição das 306 amostras de *E. faecalis* resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos em relação ao espécime clínico de origem e ano de isolamento

ESPÉCIME CLÍNICO	ANO / NÚMERO DE AMOSTRAS									TOTAL N° (%)
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	
Urina	26	22	30	8	22	8	12	5	2	135 (44,1)
Sangue	14	11	3	2	7	6	5	9	-	57 (18,6)
Abscessos e outras secreções purulentas	2	2	4	1	-	4	1	-	1	15 (4,9)
Fragmentos de tecidos	3	1	1	1	1	3	2	1	1	14 (4,6)
Secreções abdominais	5	3	2	1	-	1		2	-	14 (4,6)
Secreções respiratórias	2	1	3	3	-	-	-	-	1	10 (3,3)
Feridas	1	-	-	-	1	1	2	-	-	5 (1,6)
Cateteres e drenos	3	1	-	-	-	-	-	-	-	4 (1,3)
LCR	1	-	2	-	-	-	-	-	-	3 (1,0)
Fezes	-	2	-	-	23	6	-	-	1	32 (10,5)
Não determinado	6	2	-	7	-	1	1	-	-	17 (5,5)
TOTAL / N° (%)	63 (20,6)	45 (14,7)	45 (14,7)	23 (7,5)	54 (17,6)	30 (9,8)	23 (7,5)	17 (5,6)	6 (2,0)	306 (100)

Legenda: Fragmentos de tecidos: biópsias em geral, osso e granuloma; Secreções abdominais: líquido ascítico, bile, líquido peritoneal; Secreções respiratórias: secreção traqueal, líquido pleural e secreção de ouvido; Feridas: cirúrgicas, escaras e outras; Fezes: inclui *swab* retal e anal (culturas de vigilância); líquido cefalorraquidiano LCR; Não determinado: não foi possível obter informação quanto a espécime clínico de origem; -, nenhuma amostra.

Fonte: A autora, 2017.

As instituições hospitalares de origem das amostras de *E. faecalis* HLAR foram nomeados neste estudo por letras maiúsculas (de A a L). A maioria (79,4%; 243/306) foi oriunda da instituição A e, neste caso, foram provenientes da quase totalidade das categorias de espécimes clínicos considerados sugestivos de quadros infecciosos. Amostras provenientes de fezes (culturas de vigilância) foram obtidas das instituições hospitalares C, D, E, F, G, J e L. Para 17 amostras não foi possível obter informação quanto ao espécime clínico de origem e estas foram obtidas das instituições A, C, E, F e I. A TABELA 4 apresenta a distribuição dos espécimes clínicos em relação à instituição hospitalar de origem.

Tabela 2 – Distribuição das 306 amostras de *E. faecalis* resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLAR) em relação as instituições hospitalares de origem

ESPÉCIME CLÍNICO	HOSPITAL / NÚMERO DE AMOSTRAS											TOTAL N° (%)
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	
Urina	132	-	-	2	-	-	1	-	-	-	-	135 (44,1)
Sangue	48	-	2	-	-	-	-	5	1	-	1	57 (18,6)
Abscessos e outras secreções purulentas	14	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	15 (4,9)
Fragmentos de tecidos	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14 (4,6)
Secreções abdominais	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14 (4,6)
Secreções respiratórias	9	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10 (3,3)
Feridas	4	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	5 (1,6)
Cateteres e drenos	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4 (1,3)
LCR	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	3 (1,0)
Fezes	-	-	16	3	1	1	1	-	-	1	9	32 (10,5)
Não determinado	3	-	6	-	6	1	-	-	1	-	-	17 (5,5)
TOTAL / N° (%)	243 (79,4)	2 (0,7)	26 (8,4)	6 (2,0)	7 (2,3)	2 (0,7)	2 (0,7)	5 (1,6)	2 (0,7)	1 (0,3)	10 (3,2)	306 (100)

Legenda: A – L, nomenclatura atribuída neste estudo às instituições hospitalares de origem da amostragem avaliada; Fragmentos de tecidos: biópsias em geral, osso e granuloma; Secreções abdominais: líquido ascítico, bile, líquido peritoneal; Secreções respiratórias: secreção traqueal, líquido pleural e secreção de ouvido; Feridas: cirúrgicas, escaras e outras; Fezes: inclui *swab* retal e anal (culturas de vigilância); líquido cefalorraquidiano (LCR); Não determinado: não foi possível obter informação quanto a espécime clínico de origem; -, nenhuma amostra.

Fonte: A autora, 2017.

Os resultados obtidos em testes de difusão em ágar (disco difusão), aplicados para seleção das amostras de *E. faecalis*, foram também utilizados na caracterização dos fenótipos

HLAR para gentamicina e estreptomicina. Das 306 amostras selecionadas, 207 (67,6%) apresentaram resistência a níveis elevados à gentamicina e 204 (66,7%) à estreptomicina. Destas, a expressão do fenótipo de resistência apenas à gentamicina foi identificada em 102 amostras (33,3%), apenas para estreptomicina em 99 amostras (32,4%) e 105 amostras (34,3%) exibiram resistência concomitante aos dois antimicrobianos. Os fenótipos de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos foram nomeados neste estudo como HLR-G_{fen}, HLR-S_{fen} e HLR-GS_{fen}.

As 306 amostras de *E. faecalis* HLAR foram avaliadas quanto a presença de genes associados à expressão desta característica de resistência, pelo emprego de duas reações de PCR em protocolos multiplex. A Reação 1_{HLAR} incluiu oligonucleotídeos iniciadores que contemplaram a amplificação de genes associados à resistência a níveis elevados de gentamicina e de outros aminoglicosídeos, exceto estreptomicina. Já a Reação 2_{HLAR} foi empregada para detecção de genes relacionados apenas a expressão de resistência a níveis elevados de estreptomicina. As 306 amostras foram submetidas a ambas as reações, independente do fenótipo.

O mais frequente foi *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia* que foi encontrado em 67,3% (206/306) das amostras, seguido *ant6'-Ia* que apresentou frequência de 57,8% (177/306). Entretanto, *aph(2)-Ib* foi identificado em apenas uma amostra (0,3%; 1/306) e nenhuma apresentou produtos de amplificação compatíveis com *aph(2'')-Id*. Os genes *aph(3')-IIIa* e *ant(4')-Ia*, associados a resistência a níveis elevados de outros aminoglicosídeos (amicacina e canamicina) foram identificados em 52,3% (160/306) e em 13,4% (41/306) das amostras de *E. faecalis*, respectivamente (Tabela 3).

Nas amostras que apresentaram fenótipo de resistência a níveis elevados de gentamicina, o gene *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia* foi o prevalente, estando presente em 99,0% das amostras HLR-G_{fen} (n=102) e em todas que apresentaram HLR-GS_{fen}. Naquelas que apresentaram HLR-S_{fen} o prevalente foi *ant6'-Ia*, que foi identificado em 84,8% (84/99) dessas amostras e em 81,0% (85/105) das que exibiram HLR-GS_{fen} (Tabela 3).

Entretanto, foram observadas incongruências, quando os resultados dos fenótipos HLAR (identificados por testes de disco difusão) foram comparados com os genótipos (caracterizados por PCR). Em 12,1% (12/99) das amostras que apresentaram HLR-S_{fen} e em 12,4% (13/105) das que expressaram HLR-GS_{fen} não foram detectados produtos de amplificação compatíveis com os genes *ant6'-Ia*, *ant9'-Ia*, *ant9'-Ib* e *ant3'-Ia* (envolvidos na expressão da HLAR para estreptomicina). Por outro lado, em 16 amostras que expressaram HLR-G_{fen} (15,7%; 16/102) foram identificados produtos de amplificação compatíveis com os

genes *ant6'-Ia* (oito amostras), *ant9'-Ia* isoladamente (uma amostra) e este em associação a *ant9'-Ib* (sete amostras) (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição dos genes associados a expressão da resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos em relação aos fenótipos relacionados a essas características identificadas em 306 amostras de *E. faecalis* isoladas de instituições hospitalares localizadas no estado do Rio de Janeiro no período de 2005 a 2013

Características / Genes	Fenótipo / N° de amostras (%)		
	HLR-G _{fen} (n=102)	HLR-S _{fen} (n=105)	HLR-S _{fen} (n=99)
HLR para gentamicina:			
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	101 (99,0%)	105 (100%)	-
<i>aph(2'')-Ib</i>	-	1 (1,0%)	-
<i>aph(2'')-Ic</i>	42 (41,2%)	50 (47,6%)	-
<i>aph(2'')-Id</i>	-	-	-
Nenhum gene	-	-	99 (100%)
HLR para estreptomicina:			
<i>ant6' Ia</i>	8 (7,8%)	85 (81,0%)	84 (84,8%)
<i>ant9'-Ia</i>	8 (7,8%)	11 (10,5%)	10 (10,1%)
<i>ant9'-Ib</i>	7 (6,9%)	-	-
<i>ant3'-Ia</i>	-	3 (2,9%)	1 (1,0%)
Nenhum gene	86 (84,3%)	13 (12,4%)	12 (12,1%)
HLR para outros aminoglicosídeos:			
<i>aph(3')-IIIa</i>	19 (18,6%)	58 (55,25%)	83 (83,8%)
<i>ant(4')-Ia</i>	12 (11,8%)	14 (13,3%)	15 (15,2%)

Legenda: HLR-G_{fen} – fenótipo de resistência a níveis elevados de gentamicina; HLR-S_{fen} – fenótipo de resistência a níveis elevados de estreptomicina; HLR-GS_{fen} – fenótipo de resistência a níveis elevados de gentamicina e de estreptomicina; -, nenhuma amostra. Em destaque os resultados que indicaram incongruência entre fenótipo e genótipo HLR.

Fonte: A autora, 2017.

As 25 amostras que apresentaram HLR-S_{fen} e HLR-GS_{fen}, mas que não demonstraram produtos de amplificação para os genes relacionados à expressão e resistência a níveis elevados de estreptomicina foram avaliadas por metodologia de diluição em ágar para a determinação da CIM. Todas estas amostras apresentaram valores de CIM >2.048 µg/mL, confirmando o fenótipo identificado por disco difusão. Assim sendo, esses resultados sugeriram que, nesses casos a expressão da resistência a níveis elevados de estreptomicina foi decorrente de eventos de mutação no alvo ribossômico. Cabe ressaltar que, três destas amostras haviam apresentado resultados inconclusivos nos testes de disco difusão segundo a interpretação pelo CLSI (2016).

Não foi identificado o fenótipo de resistência a níveis elevados de estreptomicina, segundo os critérios de interpretação do CLSI (2016), em 16 amostras que apresentaram produto de amplificação porque: duas amostras apresentaram halos de inibição de 12 mm; e 14 amostras demonstraram halos de inibição de 16 mm a 24 mm. Com base nesses resultados, essas amostras foram, portanto, classificadas inicialmente como portadoras do fenótipo HLR-G_{fen}. Uma comparação posterior dos dados interpretados pelo CLSI (2016) com os critérios determinados pelo EUCAST (2016) indicou que as duas amostras que apresentaram halos de 12 mm seriam, por este último, consideradas portadoras de HLR-GS_{fen}. Entretanto, as demais 14 amostras permaneceram consideradas como sensíveis por ambos os documentos. Os resultados obtidos por metodologia de diluição em ágar revelaram que: as duas amostras que exibiram halo de inibição (por disco difusão) de 12 mm apresentaram valores de CMI > 2.048 µg/ml; as demais 14 amostras, CIM = 1024 µg/ml. Assim, a interpretação dos valores de CIM pelo CLSI (2016; por diluição em ágar CMI > 2.000 µg/ml) indicou que apenas as duas amostras (CMI > 2.048 µg/ml) demonstraram resultados compatíveis com a presença de resistência a níveis elevados de estreptomicina. Por outro lado, de acordo com o EUCAST, cujo ponto de corte para definição de resistência é de > 512 µg/ml, as 16 amostras foram incluídas como pertencentes ao HLR-GS_{fen}. Diante desses resultados foi considerado que, dentre as 306 amostras incluídas neste estudo, 86 (28,1%) foram HLR-G, 121 (39,5%) HLR-GS e 99 (32,4%) HLR-S.

O percentual de amostras de *E. faecalis* que apresentaram resistência a níveis elevados a estreptomicina por alterações no sítio alvo decorrente de mutação – nomeadas como HLR-S_{MUT} e HLR-GS_{MUT} – foi de 8,2% considerando-se toda a amostragem avaliada (25/306) ou de 11,4% se computado apenas HLR-S (n=99) e HLR-GS (n=121).

O arranjo dos genes responsáveis pela expressão de HLAR deu origem a 41 perfis genotípicos, sendo 13 relacionados às amostras HLR-S, sete à HLR-G e 21 à HLR-GS. Os perfis foram nomeados de acordo com as categorias de HLAR em: S1 a S13 (HLR-S), G1 a G7 (HLR-G) e GS1 a GS21 (HLR-GS).

Dentre os 13 perfis associados às amostras com genótipo HLR-S, o perfil S1, caracterizado pela presença dos produtos de amplificação dos genes *aph(3')-IIIa* e *ant6'-Ia*, foi o prevalente reunindo a maioria dessas amostras (59,6%; 59/99). Os perfis S2 (apenas *aph(3')-IIIa*: 7,1%; 7/99), S7 (nenhum gene: 4,0%; 4/99) e S11 (apenas *ant(4')-Ia*: 1,0%; 1/99) corresponderam às amostras cuja resistência à estreptomicina foi, provavelmente, decorrente de eventos de mutação.

Dos sete perfis que reuniram as amostras HLR-G, o perfil G1 e o G3 foram os mais frequentes, agrupando 37,2% (32/86) e 36,1% (31/86) dessas amostras. O perfil G1 agrupou amostras que exibiram os genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* e *aph(2'')-Ic*; enquanto que G3 correspondeu a amostras que apresentaram apenas o gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*.

Dentre os 21 perfis associados às amostras HLR-GS, GS1 (24,8%, 30/121), GS3 (14,1%, 17/121) e GS7 (13,2%, 16/121) foram os prevalentes e juntos reuniram a maioria (52,1%) das amostras. As características dos perfis prevalentes foram: GS1 agrupou as amostras portadoras dos genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ic*, *aph(3')-IIIa* e *ant6'-Ia*; GS3 foi caracterizado pela presença de *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ic* e *ant6'-Ia*; e GS7 pelos genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* e *ant6'-Ia*.

Dentre os perfis identificados em amostras HLR-GS, em GS4 (3/121; 2,5%), GS10 (8/121; 6,6%), GS12 (1/121; 0,8%) e GS13 (1/121; 0,8%) não foram identificados produtos de amplificação relacionados aos genes responsáveis pela característica de resistência a níveis elevados de estreptomicina, o que sugeriu que nestes casos o mecanismo de resistência associado a estas amostras seja decorrente de mutação no alvo ribossômico.

A Tabela 4 demonstra os resultados referentes aos arranjos dos perfis genotípicos de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos.

Tabela 4 – Perfis genotípicos identificados em 306 amostras de *Enterococcus faecalis* resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLAR)

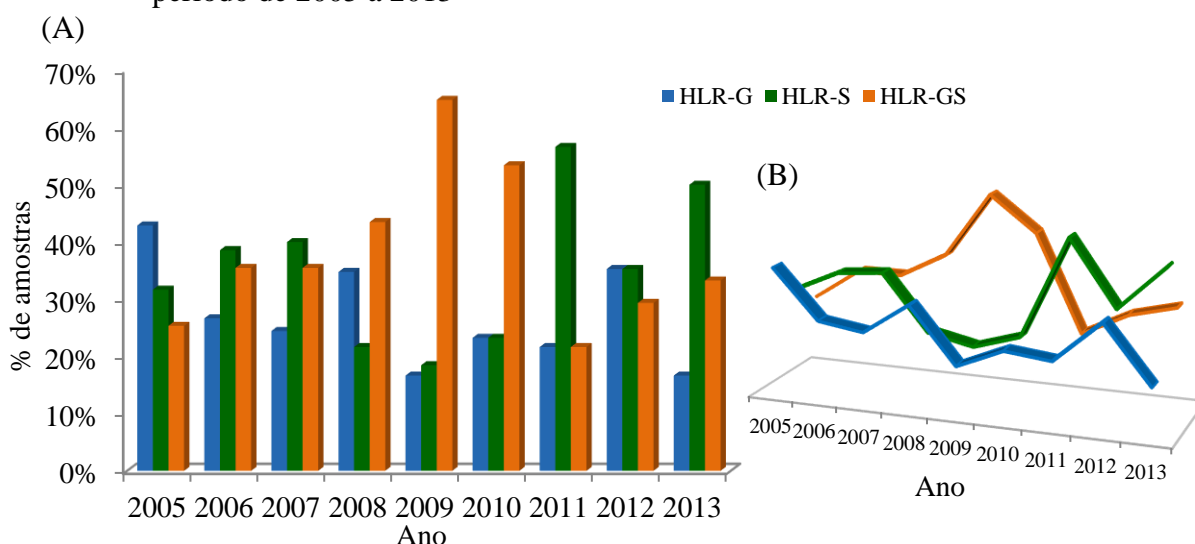
		GENES / RESISTÊNCIA À:										PERFIL	% DE AMOSTRAS (Nº/TOTAL)
HLAR	GENTAMICINA					ESTREPTOMICINA				OUTROS			
	<i>aac(6')-Ie</i> <i>aph(2'')-Ia</i>	<i>aph(2'')-Ib</i>	<i>aph(2'')-Ic</i>	<i>aph(2'')-Id</i>	<i>ant6'-Ia</i>	<i>ant9'-Ia</i>	<i>ant9'-Ib</i>	<i>ant3'-Ia</i>	<i>aph(3)-IIIa</i>	<i>ant(4')-Ia</i>			
HLR-S (n=99)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	S1	59,6% (59/99)	
	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	S2	7,1% (7/99)	
	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	S3	4,0% (4/99)	
	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	S4	1,0% (1/99)	
	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	S5	11,1% (11/99)	
	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	S6	1,0% (1/99)	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S7	4,0% (4/99)	
	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	S8	5,1% (5/99)	
	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	S9	2,0% (2/99)	
	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	S10	2,0% (2/99)	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	S11	1,0% (1/99)	
	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	S12	1,0% (1/99)	
	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	S13	1,0% (1/99)	
HLR-G (n=86)	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	G1	37,2% (32/86)	
	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	G2	5,8% (5/86)	
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G3	36,1% (31/86)	
	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	G4	5,8% (5/86)	
	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	G5	5,8% (5/86)	
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	G6	8,1% (7/86)	
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	G7	1,2% (1/86)	
HLR-GS (n=121)	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	GS1	24,8% (30/121)	
	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	GS2	1,7% (2/121)	
	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	GS3	14,1% (17/121)	
	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	GS4	2,5% (3/121)	
	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	GS5	0,8% (1/121)	
	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	GS6	0,8% (1/121)	
	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	GS7	13,2% (16/121)	
	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	GS8	0,8% (1/121)	
	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	GS9	1,7% (2/121)	
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GS10	6,6% (8/121)	
	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	GS11	9,9% (12/121)	
	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	GS12	0,8% (1/121)	
	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	GS13	0,8% (1/121)	
	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	GS14	5,0% (6/121)	
	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	GS15	2,5% (3/121)	
	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	GS16	0,8% (1/121)	
	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	GS17	7,4% (9/121)	
	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	GS18	0,8% (1/121)	
	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	GS19	0,8% (1/121)	
	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	GS20	3,3% (4/121)	
	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	GS21	0,8% (1/121)	

Legenda: HLAR, resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos; para: gentamicina: HLR-G; estreptomicina: HLR-S; gentamicina e estreptomicina concomitantemente: HLR-GS; +, presença do gene; -, ausência do gene. Em destaque, os perfis prevalentes.

Fonte: A autora, 2017.

A avaliação das categorias de HLRAR por ano, durante o período de estudo (de 2005 a 2013), revelou que os maiores valores de frequência para cada um deles ocorreu em anos distintos, onde o destaque para HLR-G foi 2005 (42,9%); para HLR-S, o ano de 2011 (56,5%); e para HLR-GS o maior percentual foi em 2009 (64,8%). Também foi observada uma flutuação na frequência dos fenótipos HLRAR ao longo do período do estudo. O número de amostras exibindo HLR-G sofreu uma redução se comparado ao primeiro ano avaliado – 2005. Para HLR-S, períodos de aumento e de redução de frequência se alternaram; registrando um discreto aumento de 2005 a 2007, uma redução considerável na frequência de 2008 a 2010 e valores mais elevados nos três últimos anos avaliados – de 2011 a 2013. Já em relação ao fenótipo HLR-GS observou-se um aumento gradativo das taxas, com o maior valor em 2009 que foi seguido de uma redução nos anos consecutivos (Figura 2). Pode-se ainda notar que, aparentemente, as taxas de HLR-S foram inversamente proporcionais as de HLR-GS. No período de 2007 a 2010 foi observado o aumento na frequência de HLR-GS e a redução de HLR-S, sendo o contrário identificado no ano de 2011. Além disso, o maior percentual de amostras HLR-GS (64,8%) ocorreu em 2009, quando foi registrado o menor percentual de amostras HLR-S (18,5%). Já em 2011, a maior taxa registrada de amostras HLR-S (56,6%) foi acompanhada do menor percentual de amostras expressando HLR-GS (21,7%).

Figura 2 – Percentual por ano (A) e curva de distribuição (B) de amostras de *E. faecalis* de HLRAR¹ isoladas em instituições hospitalares do Estado do Rio de Janeiro no período de 2005 a 2013



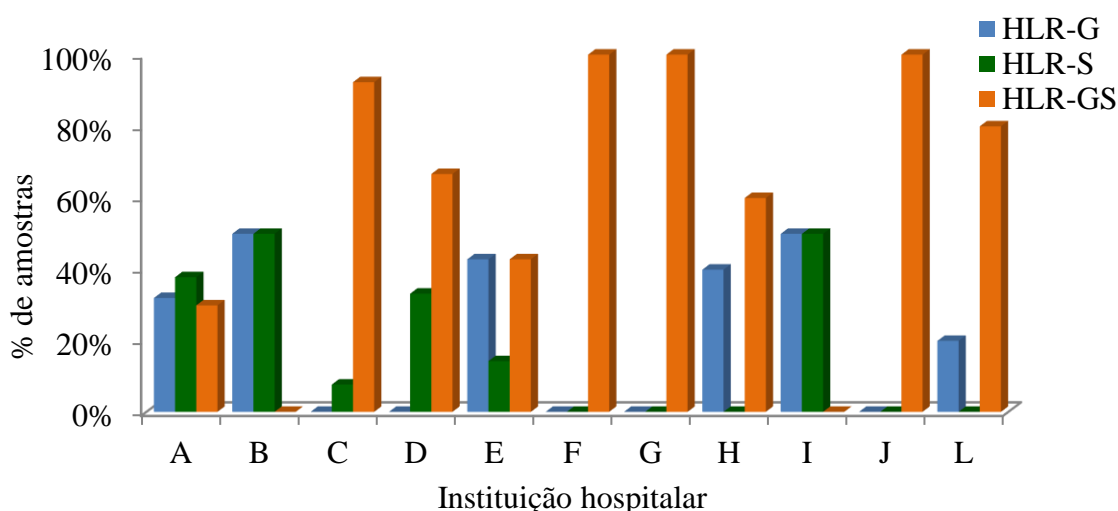
Legenda: ¹HLRAR, resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos; para: gentamicina: HLR-G; estreptomicina: HLR-S; gentamicina e estreptomicina concomitantemente: HLR-GS.

Fonte: A autora, 2017.

As amostras HLR-GS foram as que se mostraram mais dispersas pelas instituições hospitalares avaliadas. Este fenótipo foi identificado em nove (81,8%) das 11 instituições incluídas neste estudo. Além de apresentar a maior dispersão entre as instituições, também foi o de maior frequência naquelas nomeadas de C, D, H e L; além de ser identificado em F (duas amostras), G (duas amostras) e J (uma amostra).

Por outro lado, a instituição hospitalar A apresentou taxas similares das três categorias de HLRAR, com uma frequência ligeiramente maior de HLR-S (37,9%), seguido de HLR-G (32,1%) e HLR-GS (30,0%). A Figura 3 demonstra a distribuição dos fenótipos HLRAR em relação às instituições hospitalares de origem.

Figura 3 – Distribuição das amostras de *E. faecalis* HLRAR¹ nas instituições hospitalares de origem

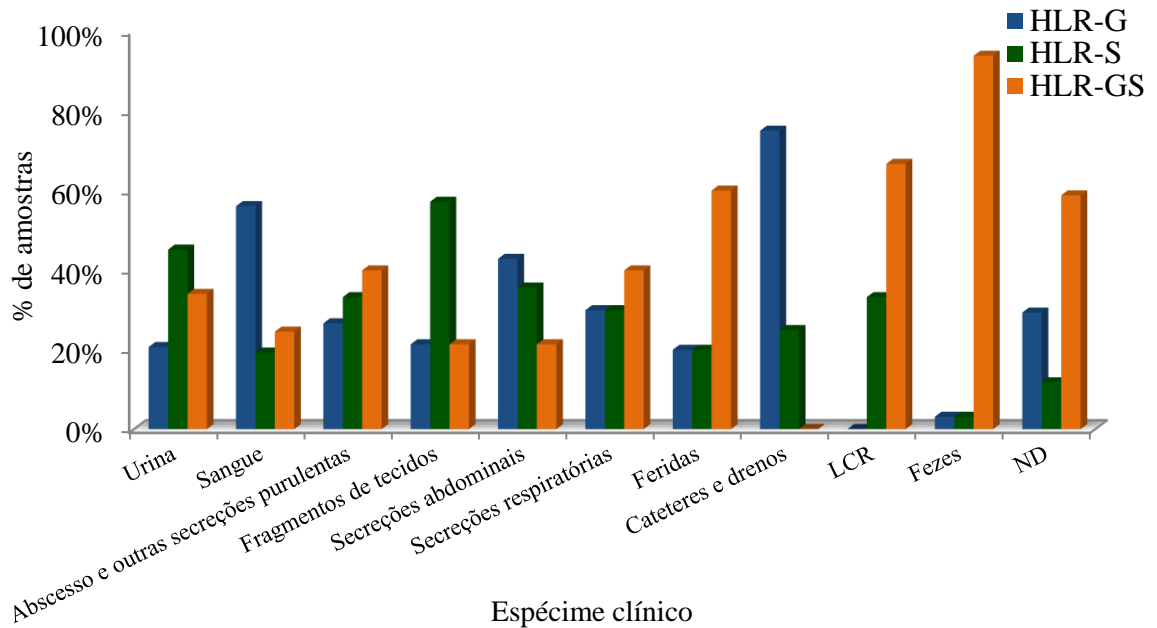


Legenda: ¹HLRAR, resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos; HLRAR para: gentamicina: HLR-G; estreptomicina: HLR-S; e gentamicina e estreptomicina concomitantemente: HLR-GS.

Fonte: A autora, 2017.

A correlação entre os espécimes clínicos de origem e as respectivas categorias de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos revelou que amostras HLR-G foram mais frequentes em cateteres e drenos (75,0%), sangue (56,1%) e secreções abdominais (42,9%); HLR-S se destacou em fragmentos de tecidos (57,2%) e urina (45,2%); já o fenótipo HLR-GS foi prevalente em fezes (culturas de vigilância; 93,8%), líquido cefalorraquidiano (66,7%) e feridas (60%). A Figura 4 demonstra a distribuição dos fenótipos HLRAR em relação ao espécime clínico de origem das amostras bacterianas.

Figura 4 – Distribuição dos fenótipos HLAR¹ de amostras de *E. faecalis* em relação aos espécimes clínicos de origem



Legenda: ¹HLAR, resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos. HLAR para: gentamicina - HLR-G; estreptomicina - HLR-S; gentamicina e estreptomicina concomitantemente - HLR-GS; Fragmentos de tecidos: biópsias em geral, osso e granuloma; Secreções abdominais: líquido ascítico, bile, líquido peritoneal; Secreções respiratórias: secreção traqueal, líquido pleural e secreção de ouvido; Feridas: cirúrgicas, escaras e outras; Fezes: inclui *swab* retal e anal (culturas de vigilância); LCR, líquido cefalorraquidiano; ND, não determinado.

Fonte: A autora, 2017.

As 306 amostras de *E. faecalis* HLAR foram também avaliadas frente a um painel de mais 14 antimicrobianos. As taxas mais elevadas de resistência foram identificadas para eritromicina (91,8%; 281/306), tetraciclina (85,9%; 263/306), ciprofloxacina (65,7%; 201/306), levofloxacina (64,4%; 197/306) e norfloxacina (64,1%; 196/306).

Por outro lado, a quase totalidade das amostras foi sensível a ampicilina (99,0%; 303/306), nitrofurantoína (99,0%; 303/306) e fosfomicina (95,4%; 292/306). Todas as amostras foram sensíveis à linezolida.

Ressalta-se ainda que, reunindo os dados das categorias intermediária e resistente, 13,4% (41/306) e 12,1% (37/306) das amostras de *E. faecalis* HLAR foram não susceptíveis a vancomicina e a teicoplanina, respectivamente.

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos nos testes de susceptibilidade a 14 antimicrobianos, por método de disco-difusão, das 306 amostras de *E. faecalis* HLAR.

Tabela 5 – Perfil de susceptibilidade a um painel de 14 antimicrobianos de 306 amostras de *E. faecalis* HLR¹ isoladas de instituições hospitalares do Estado do Rio de Janeiro, no período de 2005 a 2013

ANTIMICROBIANOS	CATEGORIA DE SUSCEPTIBILIDADE ² / Nº DE AMOSTRAS (%)		
	SENSÍVEL	INTERMEDIÁRIO	RESISTENTE
Ampicilina	303 (99,0)	-	3 (1,0)
Ciprofloxacina	60 (19,6)	45 (14,7)	201 (65,7)
Cloranfenicol	158 (51,6)	11 (3,6)	137 (44,8)
Eritromicina	6 (2,0)	19 (6,2)	281 (91,8)
Fosfomicina	292 (95,4)	3 (1,0)	11 (3,6)
Levofloxacina	104 (34,0)	5 (1,6)	197 (64,4)
Linezolida	306 (100)	-	-
Nitrofurontoína	303 (99,0)	2 (0,7)	1 (0,3)
Norfloxacina	87 (28,4)	23 (7,5)	196 (64,1)
Penicilina	248 (81,0)	-	58 (19,0)
Rifampicina	190 (62,1)	61 (19,9)	55 (18,0)
Teicoplanina	269 (87,9)	-	37 (12,1)
Tetraciclina	36 (11,8)	7 (2,3)	263 (85,9)
Vancomicina	264 (86,3)	1 (0,3)	41 (13,4)

Legenda: ¹Resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos; ²Categorias de susceptibilidade aos antimicrobianos seguindo a interpretação do CLSI, 2015; -, nenhuma amostra.

Fonte: A autora, 2017.

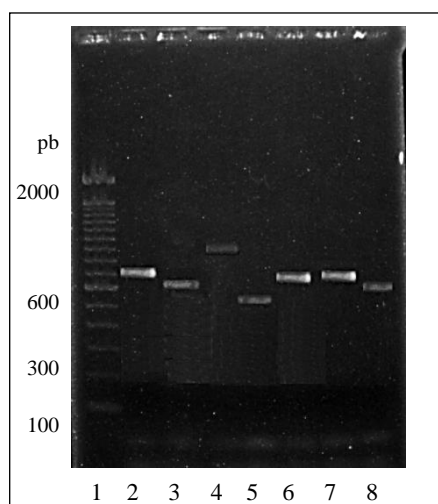
Foi observada uma maior correlação entre a não susceptibilidade à penicilina e a resistência a níveis elevados de gentamicina, do que de estreptomicina. Os resultados revelaram que das 58 amostras resistentes à penicilina, 93,1% (54/58) foram resistentes a níveis elevados de gentamicina (63,8% das amostras HLR-GS e 29,3% das HLR-G), enquanto que o restante (6,9%) correspondeu a HLR-S. Todas as amostras resistentes à penicilina foram avaliadas quanto à expressão de beta-lactamases pelo emprego do kit *Beta-lactamase Nitrocefin Touch Sticks* (Oxoid Ltd.), que consiste na identificação da atividade da enzima sobre uma cefalosporina cromogênica. Apenas uma amostra apresentou resultado positivo, porém de apresentação fraca e tardia.

Dentre as 41 amostras resistentes à vancomicina, 37 (90,2%) apresentaram resistência concomitante à teicoplanina, caracterizando o fenótipo VanA. As quatro amostras restantes

foram sensíveis a teicoplanina, sugerindo o fenótipo VanB. A amostra que foi identificada na categoria intermediária para vancomicina foi sensível a teicoplanina, sendo este resultado considerado como sugestivo do fenótipo VanD.

As 42 amostras bacterianas não susceptíveis à vancomicina (41 resistentes e uma na categoria intermediária) foram avaliadas quanto ao genótipo de resistência aos glicopeptídeos, por metodologia de PCR. Em protocolos multiplex, foram investigados os seguintes genótipos: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* e *vanG*. Os resultados revelaram que as 37 amostras que exibiram resistência concomitante a ambos glicopeptídeos (halos de inibição de 0 a 9 mm para vancomicina e de 0 a 10 mm para teicoplanina) apresentaram produtos de amplificação compatíveis com o genótipo *vanA*. Além destas, a amostra que foi caracterizada na categoria intermediária para vancomicina (halo de inibição de 15 mm) e foi sensível à teicoplanina, também foi portadora do genótipo *vanA*. Nenhum produto de amplificação foi identificado para o gene *vanD*. Assim, essa amostra demonstrou apresentar resultado incongruente entre fenótipo e genótipo (VanD/*vanA*). As quatro amostras que apresentaram o fenótipo VanB, resistentes à vancomicina (halos de inibição de 9 a 11 mm) e sensíveis à teicoplanina, apresentaram produtos de amplificação compatíveis com o genótipo *vanB* (Figura 5).

Figura 5 – Gel representativo da caracterização de genótipos de resistência aos glicopeptídeos em 42 amostras de *E. faecalis* HLAR



Legenda: linhas: 1, padrão de pares de base (100 bp Ladder, Invitrogen Co.); 2, controle *vanA* (amostra A256/732 pb); 3, controle *vanB* (amostra V583/647 pb); 4, controle *vanC1/2* (SS1228/815 - 827 pb); 5, controle *vanD* (amostra Dalla 1b/500 pb); 6 e 7, amostras clínicas *vanA*; 8, amostra clínica *vanB*.

Fonte: A autora, 2017.

Das 38 amostras portadoras do genótipo *vanA*, 94,7% (36/38) foram HLR-GS e 5,3% (2/38) HLR-G. Das quatro amostras portadoras de *vanB*, duas (50%) foram HLR-GS, e as demais HLR-G e HLR-S (uma amostra cada; 25% cada).

Em relação ao espécime clínico de origem foi identificado que 68,4% (26/38) das amostras de *E. faecalis* resistentes a vancomicina (VREfa) e portadoras de *vanA* foram provenientes de fezes (culturas de vigilância). Estas representaram 81,3% (26/32) do total de amostras de *E. faecalis* HLAR obtidas de culturas de vigilância. As demais amostras VREfa *vanA* foram isoladas de sangue (7,9%, 3/38; ou 5,3%, 3/57), feridas (2,6%, 1/38; ou 20,0%, 1/5), LCR (2,6%, 1/38; ou 33,3%, 1/3) e abscesso (2,6%, 1/38; ou 6,7%, 1/15). Para seis amostras portadoras de *vanA* (15,8%; 6/38) não foi possível obter a origem clínica. Das quatro amostras portadoras do genótipo *vanB*, uma foi isolada de líquido (25,0%; 1/4; ou 33,3%, 1/3) e uma de secreção respiratória (25,0%, 1/4; ou 10,0%, 1/10). Duas amostras portadoras de *vanB* (50,0%, 2/4), não tiveram a origem clínica identificada.

Quanto à frequência por ano de amostras HLAR não susceptíveis aos demais 14 antimicrobianos testados (além dos aminoglicosídeos), foi observado que para penicilina, teicoplanina e vancomicina as taxas mais elevadas corresponderam aos anos 2008, 2009 e 2010. Para os antimicrobianos da classe das quinolonas, ciprofloxacina, norfloxacina e levofloxacina, o maior percentual de amostras não susceptíveis correspondeu ao ano de 2008. Já para cloranfenicol, tetraciclina e rifampicina as taxas mais elevadas de amostras não susceptíveis foram observadas nos primeiros anos que compuseram o período avaliado neste estudo (2005 para os dois primeiros e 2006 para o último). A Tabela 6 demonstra os resultados encontrados.

Valores elevados e relativamente estáveis também foram observados em relação à frequência de amostras não susceptíveis para eritromicina e tetraciclina. Percentuais moderados e semelhantes, de amostras não susceptíveis, também foram identificados para cloranfenicol e rifampicina (excetuando-se o ano de 2013 para este último). Já o percentual de amostras não susceptíveis à fosfomicina e nitrofurantoína foram reduzidos ou nulos no período analisado (Tabela 6).

Foi também observado que as taxas de amostras não susceptíveis às quinolonas foram elevadas durante todo o período avaliado, excetuando-se apenas para norfloxacina em 2011. Considerando os antimicrobianos da classe dos glicopeptídeos, os percentuais de amostras não susceptíveis à vancomicina foram relativamente acompanhados pelos resultados obtidos para teicoplanina. Entretanto, pode-se observar que o aumento das taxas de resistência à penicilina não foram acompanhadas pelos resultados obtidos para ampicilina (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição das taxas de não susceptibilidade¹ de amostras de *E. faecalis* HLAR² isoladas de instituições hospitalares do Estado Rio de Janeiro por ano de estudo

ANTIMICROBIANO	ANO / NÚMERO DE AMOSTRAS (%)									TOTAL Nº (%)
	2005 (n=63)	2006 (n=45)	2007 (n=45)	2008 (n=23)	2009 (n=55)	2010 (n=30)	2011 (n=23)	2012 (n=17)	2013 (n=6)	
Ampicilina	-	1 (2,2)	-	-	1 (1,8)	-	1 (4,3)	-	-	3 (1,0)
Ciprofloxacina	52 (82,5)	37 (82,2)	31 (68,9)	22 (95,6)	45 (81,8)	25 (83,3)	17 (73,9)	14 (82,4)	3 (50,0)	246 (80,4)
Cloranfenicol	37 (58,7)	24 (53,3)	20 (44,4)	11 (47,8)	28 (50,9)	10 (33,3)	9 (39,1)	6 (35,3)	3 (50,0)	148 (48,4)
Eritromicina	60 (95,2)	43 (95,6)	45 (100)	23 (100)	54 (98,2)	30 (100)	23 (100)	17 (100)	5 (83,3)	300 (98,0)
Fosfomicina	1 (1,6)	6 (13,3)	3 (6,7)	-	3 (5,4)	-	-	-	1 (16,7)	14 (4,6)
Levofloxacina	43 (68,2)	26 (57,8)	29 (64,4)	20 (87,0)	38 (69,1)	20 (66,7)	12 (52,2)	11 (64,7)	3 (50,0)	202 (66,0)
Nitrofurantoina	-	2 (4,4)	1 (2,2)	-	-	-	-	-	-	3 (1,0)
Norfloxacina	44 (69,8)	35 (77,8)	30 (66,7)	22 (95,6)	42 (76,4)	22 (73,3)	9 (39,1)	12 (70,6)	3 (50,0)	219 (71,6)
Penicilina	8 (12,7)	4 (8,9)	2 (4,4)	8 (34,8)	20 (36,4)	10 (33,3)	4 (17,4)	2 (11,8)	-	58 (19,0)
Rifampicina	22 (34,9)	26 (57,8)	19 (42,2)	8 (34,8)	20 (36,4)	9 (30,0)	6 (26,1)	6 (35,3)	-	116 (37,9)
Teicoplanina	-	-	-	6 (26,1)	21 (38,2)	8 (26,7)	-	1 (5,9)	1 (16,7)	37 (12,1)
Tetraciclina	60 (95,2)	41 (91,1)	32 (71,1)	21 (91,3)	50 (90,9)	27 (90,0)	19 (82,6)	15 (88,2)	5 (83,3)	270 (88,2)
Vancomicina	-	1 (2,2)	3 (6,7)	6 (26,1)	21 (38,2)	9 (30,0)	-	1 (5,9)	1 (16,7)	42 (13,7)

Legenda: ¹Determinado pelo somatório dos resultados nas categorias resistente e intermediário segundo CLSI, 2016; ²Resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos; -, nenhuma amostra; Em destaque percentuais representativos da maioria das amostras; Todas as amostras foram sensíveis à linezolida.

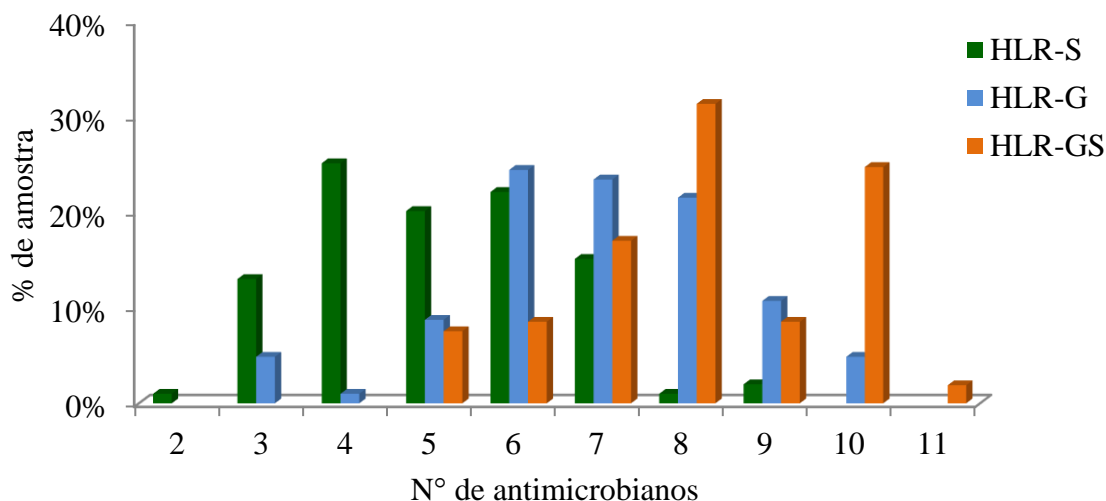
Fonte: A autora, 2017.

As 38 amostras portadoras de *vanA* foram isoladas em 2007 (n=1, de LCR), 2008 (n=6, todas sem origem clínica identificada), 2009 (n=21, duas de sangue; 19 de fezes), 2010 (n=8, seis de fezes, uma de ferida e uma de abscesso) 2012 (n=1, de sangue) e 2013 (n=1, de fezes). As quatro amostras *vanB* foram isoladas em 2006 (n=2, ambas sem informação quanto ao espécime clínico) e 2007 (n=2, uma de LCR e uma de secreção respiratória).

Correlacionando os resultados obtidos nos testes de susceptibilidade a 14 antimicrobianos com a característica HLAR, foi observado que amostras apresentando HLR-S foram não susceptíveis (reunindo as categorias intermediária e resistente) desde dois até nove antimicrobianos. A maior frequência de amostras HLR-S (25,2%; 25/99) não foi susceptível a quatro antimicrobianos (além do aminoglicosídeo). Em relação à HLR-G foi observado que

estas amostras não foram susceptíveis de três a dez antimicrobianos. Para amostras HLR-GS o número de antimicrobianos para os quais não foram susceptíveis variou de cinco a onze (Figura 6).

Figura 6 – Correlação dos fenótipos HLR¹ em amostras de *E. faecalis* com a concomitante não susceptibilidade a outros antimicrobianos² determinada por testes de disco-difusão



Legenda: ¹HLAR, resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos. HLR para: gentamicina - HLR-G; estreptomicina - HLR-S; gentamicina e estreptomicina concomitantemente - HLR-GS; ²Resultados de amostras não susceptíveis frente a um painel de 14 antimicrobianos.

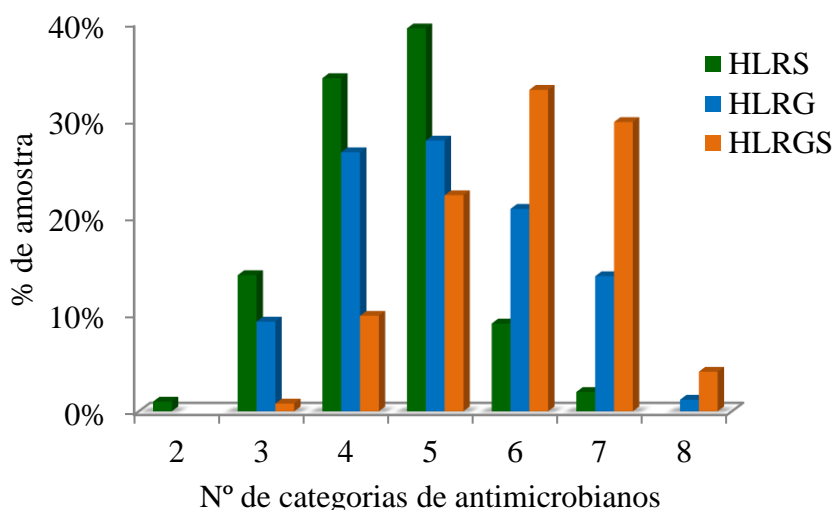
Fonte: A autora, 2017.

Amostras não susceptíveis a três ou mais classe de antimicrobianos foram consideradas multirresistentes. Neste critério foi incluída uma adaptação que determinada que os dois aminoglicosídeos sejam considerados independentemente. Este critério que determinou que a classe dos aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina) fosse considerada com peso dois seguiu o as recomendações de Magiorakus et al. (2012). Os autores justificam a utilização desse critério considerando que tais antimicrobianos determinam mecanismos genéticos de resistência independentes. Por outro lado, quando antimicrobianos diferentes de mesma classe que determinam mecanismos de resistência semelhantes são computados com peso 1, neste estudo esse critério foi aplicado para: quinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina e levlofloxacina); glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina); e beta-lactâmicos (ampicilina e penicilina).

Das 306 amostras deste estudo, apenas uma amostra não apresentou o perfil de multirresistência. Esta amostra exibiu apenas resistência à estreptomicina e eritromicina, caracterizada como HLR-S. Além disto, as 99 amostras HLR-S apresentaram o maior número

de amostras com perfis formados por três (n=13) categorias de antimicrobianos. Entretanto, a maior frequência foi observada nos perfis formados por cinco e quatro categorias. Nas 86 amostras HLR-G os perfis formados por cinco (n=29) e quatro (n=29); seis (n=21) e sete (n=14) foram os de maior frequência. As 121 amostras do fenótipo HLR-GS além de apresentarem um número maior de marcadores de não susceptibilidade, também estiveram associadas em maior frequência nos perfis formados com seis e sete categorias de antimicrobianos; enquanto que as amostras HLR-S foram mais associadas aos perfis formados com quatro e cinco categorias de antimicrobianos. Exceto uma amostra HLR-S, todas as demais (305/306) apresentaram perfis de multirresistência. A Figura 7 demonstra esses resultados.

Figura 7 – Distribuição dos perfis de multirresistência em amostras de *Enterococcus faecalis* HLAR isoladas de pacientes hospitalizados em 11 instituições hospitalares localizadas no estado do Rio de Janeiro

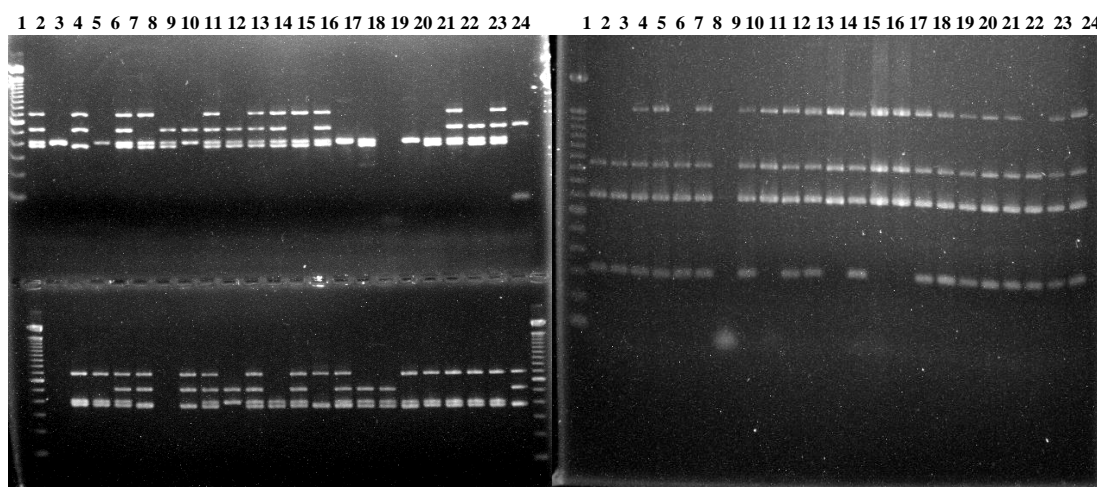


Legenda: ¹HLAR, resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos. HLAR para: gentamicina - HLR-G; estreptomicina - HLR-S; gentamicina e estreptomicina concomitantemente - HLR-GS; ²Resultados de amostras não susceptíveis frente a um painel de 14 antimicrobianos.

Fonte: A autora, 2017.

Os genótipos associados à virulência em *Enterococcus* foram pesquisados em duas reações multiplex, avaliando a distribuição dos seguintes nove genes: *ace*, *agg*, *asa1*, *cylA*, *efaA*, *eep*, *esp*, *gelE* e *hyl*. A Figura 8 apresenta os géis representativos das reações de PCR utilizadas na detecção desses genes.

Figura 8 – Géis representativos dos genótipos de virulência encontrados associados às amostras de *E. faecalis* HLRAR isoladas em instituições hospitalares no Estado do Rio de Janeiro do período de 2005 à 2013



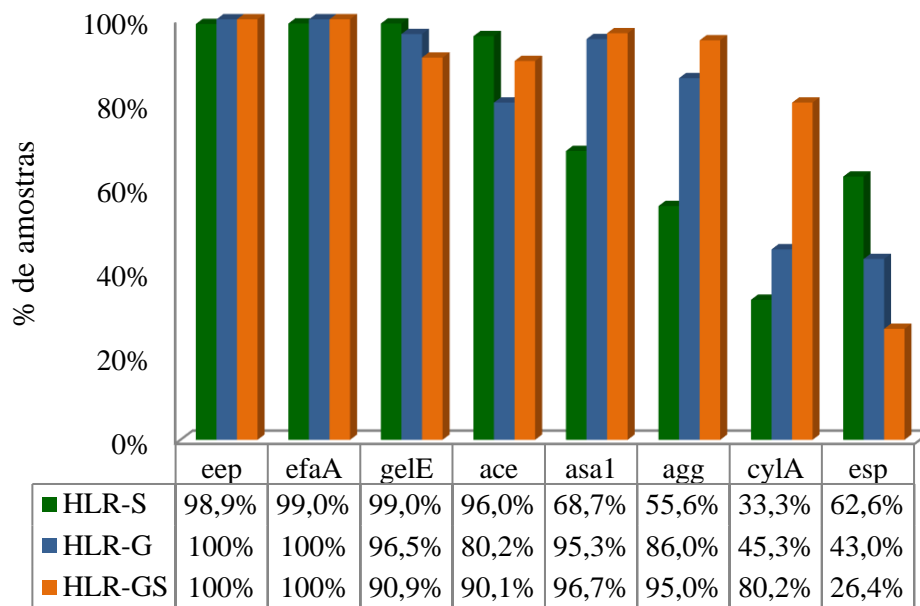
Legenda: Reação 1 – Gel (A1): Linha 1 – padrão de pares de base (100 bp Ladder, Invitrogen Co.); 2, 6, 10, 12, 13, 21 e 23: *asa1* (375 pb) + *gelE* (405 pb) + *esp* (510) + *cylA* (688 pb); 3, 5, 16 e 19: *gelE* (405 pb); 4: *asa1* (375 pb) + *esp* (510) + *cylA* (688 pb); 7 e 14: *asa1* (375 pb) + *gelE* (405 pb) + *cylA* (688 pb); 8, 11 e 22: *asa1* (375 pb) + *gelE* (405 pb) + *esp* (510); 9: *gelE* (405 pb) + *esp* (510); 17 e 20: : *asa1* (375 pb) + *gelE* (405 pb); 24: *esp* (510); 18: ausência de produto de amplificação. Gel (A2): 1 e 24 – padrão de pares de base (100 bp Ladder, Invitrogen Co.); 2 e 7: ausência de produto de amplificação; 3, 4, 18, 19, 20, 21 e 22: *asa1* (375 pb) + *gelE* (405 pb) + *cylA* (688 pb); 5, 6, 7, 9 e 11: *asa1* (375 pb) + *gelE* (405 pb) + *esp* (510) + *cylA* (688 pb); 10: *gelE* (405 pb) + *esp* (510); 12: *asa1* (375 pb) + *gelE* (405 pb); 14: *asa1* (375 pb) + *cylA* (688 pb); 16 e 17: *asa1* (375 pb) + *gelE* (405 pb) + *esp* (510); 8 e 23: *asa1* (375 pb) + *esp* (510) + *cylA* (688 pb). Reação 2 – Gel (B): 1 – padrão de pares de base (100 bp Ladder, Invitrogen Co.); 2, 3, 6 e 22: *ace* (320 pb) + *efaA* (705 pb) + *eeP* (937 pb); 4, 5, 7, 9, 11, 12, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 23 e 24: *ace* (320 pb) + *efaA* (705 pb) + *eeP* (937 pb) + *agg* (1553 pb); 10, 13, 15 e 16: *efaA* (705 pb) + *eeP* (937 pb) + *agg* (1553 pb); 8: ausência de produto amplificação.

Fonte: A autora, 2017.

A prevalência desses genes na amostragem avaliada foi de: *eep* e *efaA*, 99,7% (305/306); *gelE*, 95,1% (291/306); *ace*, 89,2% (273/306); *asa1*, 87,3% (267/306); *agg*, 79,7% (244/306); *cylA*, 55,2% (169/306); e *esp*, 42,8% (131/306). Não foi observado produto de amplificação para o gene *hyl*. Cabe ressaltar que, apesar dos genes *asa1* e *agg* estarem relacionados à expressão da substância de agregação em enterococos, pode-se observar uma diferença na frequência de ambos nas amostras avaliadas.

A distribuição dos genes de virulência por característica de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos revelou que *eep*, *efaA* e *gelE* apresentaram frequência semelhante em HLR-S, HLR-G e em HLR-GS. Os genes *asa1* e *agg* foram estiveram mais relacionados às amostras que apresentaram resistência a níveis elevados de gentamicina (HLR-G e HLR-GS). Entretanto, enquanto *esp* foi mais associado às amostras HLR-S, *cylA* foi o prevalente em HLR-GS. A Figura 9 apresenta a frequência dos genes de virulência em relação aos genótipos de HLRAR.

Figura 9 – Distribuição dos genes de virulência em amostras de *E. faecalis* HLAR isoladas em instituições hospitalares no Estado do Rio de Janeiro no período de 2005 à 2013



Legenda: HLR-S – resistência a níveis elevados de estreptomicina; HLR-G – resistência a níveis elevados de gentamicina; HLR-GS – resistência a níveis elevados de gentamicina e estreptomicina.

Fonte: A autora, 2017.

Comparando a presença dos genes de virulência entre as amostras de *E. faecalis* HLAR resistentes e sensíveis a vancomicina, os resultados revelaram que nas VREfa foi prevalente a presença de *gelE*, *ace*, *asa1*, *agg* e *cylA*; enquanto que, para VSEfa o mais frequente foi *esp*.

Considerando-se o número de genes de virulência, foi observado que a maioria (54,5%) das amostras HLR-GS apresentaram concomitantemente sete destes marcadores. Em relação às amostras HLR-GS, 43,0% apresentaram seis genes de virulência concomitantes. Dentre as amostras HLRS, não houve um padrão de destaque (Tabela 7).

Quanto aos espécimes clínicos de origem, a presença concomitante de sete genes foi prevalente nas amostras provenientes de urina (30,4%), de abscessos (46,7%), secreções respiratórias (57,1%), feridas (80,0%), líquido cefalorraquidiano (66,7%) e fezes (50,0%). Nas amostras de *E. faecalis* provenientes de sangue, fragmentos de tecidos e secreções abdominais destacaram-se os perfis compostos por seis genes de virulência (35,1%, 28,6% e 35,7%, respectivamente) (Tabela 7). Amostras de *E. faecalis* HLAR e resistentes à vancomicina (VREfa, n=42) apresentaram de cinco a oito genes de virulência concomitantemente, sendo prevalente a presença de sete marcadores (61,9%). Por outro lado, amostras sensíveis aos glicopeptídeos apresentaram de dois a oito genes e a maioria dessas amostras também apresentou de sete a oito genes de virulência concomitantes (Tabela 7).

Tabela 7 – Correlação entre o número de marcadores de virulência e categoria de resistência aos aminoglicosídeos, espécime clínico de origem e resistência a vancomicina em amostras de *Enterococcus faecalis*

Característica	Nº de marcadores de virulência / % de amostras						
	2	3	4	5	6	7	8
HLAR:							
HLR-S	1,0%	-	10,0%	23,2%	22,2%	25,2%	18,2%
HLR-G	-	-	4,6%	8,1%	43,0%	24,4%	19,8%
HLR-GS		0,8%	1,7%	3,3%	22,3%	54,5%	17,4%
Espécime clínico:							
Urina	0,7%	2,2%	8,9%	12,6%	20,0%	30,4%	20,0%
Sangue	-	1,8%	1,8%	8,8%	35,1%	28,1%	-
Abscesso e outras secreções purulentas	-	-	-	6,7%	6,7%	46,7%	13,3%
Fragmento de tecidos	-	-	14,3%	21,4%	28,6%	14,3%	21,4%
Sec. Abdominais	-	-	7,1%	14,3%	35,7%	21,4%	21,4%
Sec. Respiratórias	-	-	-	-	7,1%	57,1%	14,3%
Feridas	-	-	-	-	20,0%	80,0%	-
Cateter	-	-	-	25,0%	25,0%	25,0%	25,0%
Líquor	-	-	-	-	33,3%	66,7%	-
Fezes	-	-	-	6,3%	34,4%	50,0%	6,3%
Resistência a vancomicina:							
VREfa	-	-	-	4,8%	26,2%	61,90%	7,1%
<i>VanA</i>	-	-	-	5,3	23,7	63,2	15,8
<i>VanB</i>	-	-	-	-	50	50	-
VSEfa	0,4%	1,5%	6,1%	12,5%	26,8%	32,6%	20,1%

Legenda: HLR-S – resistência a níveis elevados de estreptomicina; HLR-G – resistência a níveis elevados de gentamicina; HLR-GS – resistência a níveis elevados de gentamicina e estreptomicina, vREfa, amostras de *E. faecalis* resistentes a vancomicina, *vanA* e *vanB*, genótipos de resistência a vancomicina, vSEfa, amostras de *E. faecalis* sensíveis a vancomicina; -, nenhuma amostra.

Fonte: A autora, 2017.

Foram identificados 27 perfis de virulência distribuídos entre as 306 amostras de *E. faecalis* HLAR, nomeados de FV1 a FV27. Destes, sete (26,0%) corresponderam a uma amostra cada. Vinte e seis perfis apresentaram os genes *eep* e *efaA*; enquanto que, 19 apresentaram *gelE*, 18 o gene *ace*, 14 o *agg* e 10 o *cylA* (Tabela 8).

O perfil prevalente foi FV3 que reuniu sete dos nove genes avaliados e foi identificado em 24,8% (76/306) e apresentou o seguinte arranjo: *ace*⁺, *agg*⁺, *asaI*⁺, *cylA*⁺, *eep*⁺, *efaA*⁺, *esp*⁻, *gelE*⁺, *hyl* (Tabela 8).

Quinze perfis de virulência foram associados às amostras HLR-G, sendo FV4 (*ace*⁺, *agg*⁺, *asaI*⁺, *cylA*⁻, *eep*⁺, *efaA*⁺, *esp*⁻, *gelE*⁺, *hyl*) prevalente nessas amostras (33,7%; 29/86). Nas amostras HLR-S foram identificados 16 perfis, sendo que o mais frequente foi FV7 (*ace*⁺, *agg*⁺, *asaI*⁺, *cylA*⁺, *eep*⁺, *efaA*⁺, *esp*⁺, *gelE*⁺, *hyl*) que reuniu 18,2% (18/99) das amostras. Já nas amostras HLR-GS o perfil com maior frequência foi o FV3 que agrupou 50,4% destas amostras (Tabela 9).

Correlacionando os perfis de virulência com os anos do estudo, observamos que os perfis de maior distribuição foram os perfis FV3, FV7, FV4 e FV13. O perfil FV3 e FV7 foram observados em todos os anos do estudo, o perfil FV4 até 2012 e o perfil FV13 só não foi observado no ano de 2011. A Tabela 9 apresenta estes resultados.

Quanto à origem clínica, foi observado que dentre as 135 amostras oriundas de urina foram identificados 24 perfis de virulência; enquanto que, 14 perfis de virulência foram caracterizados a partir das 57 amostras de *E. faecalis* isoladas de sangue. Uma menor variabilidade foi identificada entre as amostras isoladas de secreções abdominais, fragmentos de tecidos e abscessos, onde foram identificados nove, oito e oito perfis de virulência, respectivamente. Também, dentre as cinco amostras de ferida foram identificados três perfis diferentes e as 32 amostras de fezes resultaram em oito perfis de virulência. Cada amostra bacteriana proveniente de cateter e de LCR apresentaram perfis distintos.

Tabela 8 – Caracterização e distribuição de perfis de virulência entre amostras de *E. faecalis* HLAR isoladas de pacientes atendidos em instituições do Rio de Janeiro no período de 2005 a 2013

PERFIS DE VIRULÊNCIA	Nº DE GENES (N=9)	GENES DE VIRULÊNCIA									GENÓTIPO HLAR			TOTAL (N=306)
		<i>ace</i>	<i>agg</i>	<i>asa1</i>	<i>cylA</i>	<i>Eep</i>	<i>efA</i>	<i>esp</i>	<i>geIE</i>	<i>hyl</i>	HLR-G (N=86)	HLR-S (N=99)	HLR-GS (N=121)	
FV1	7	-	+	+	+	+	+	+	+	-	7 (8,1%)	2 (2%)	2 (1,6%)	11 (3,6%)
FV2	6	-	+	+	-	+	+	+	+	-	4 (4,6%)			4 (1,3%)
FV3	7	+	+	+	+	+	+	-	+	-	10 (11,6%)	5 (5%)	61 (50,4%)	76 (24,8%)
FV4	6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	29 (33,7%)	11 (11,1%)	13 (10,7%)	53 (17,3%)
FV5	4	-	-	-	-	+	+	+	+	-	3 (3,5%)			3 (1%)
FV6	6	+	-	+	+	+	+	-	+	-	3 (3,5%)	5 (5%)	1 (0,8%)	9 (2,9%)
FV7	8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	17 (19,8%)	18 (18,2%)	21 (17,4%)	56 (18,3%)
FV8	6	-	+	+	+	+	+	-	+	-			4 (3,3%)	4 (1,3%)
FV9	6	+	+	-	-	+	+	+	+	-		2 (2%)		2 (0,7%)
FV10	5	+	-	-	-	+	+	+	+	-		17 (17,2%)	1 (0,8%)	18 (6,3%)
FV11	4	+	-	-	-	+	+	-	+	-		10 (10,1%)	2 (1,6%)	12 (3,9%)
FV12	2	-	-	-	-	-	-	+	+	-		1 (1%)		1 (0,3%)
FV13	7	+	+	+	-	+	+	+	+	-	3 (3,5%)	16 (16,2%)	3 (2,5%)	22 (7,2%)
FV14	6	+	+	+	+	+	+	-	-	-	1 (1,2%)		3 (2,5%)	4 (1,3%)
FV15	5	+	+	+	-	+	+	-	-	-	1 (1,2%)		1 (0,8%)	2 (0,7%)
FV16	7	+	+	-	+	+	+	+	+	-		1 (1%)		1 (0,3%)
FV17	5	-	-	+	-	+	+	+	+	-	2 (2,3%)			2 (0,7%)
FV18	7	+	-	+	+	+	+	+	+	-	1 (1,2%)	1 (1%)		2 (0,7%)
FV19	5	+	-	+	-	+	+	-	+	-	3 (3,5%)	6 (6,1%)	1 (0,8%)	10 (3,3%)
FV20	5	-	+	+	-	+	+	-	+	-	1 (1,2%)	1 (1%)	1 (0,8%)	3 (1%)
FV21	4	+	+	-	-	+	+	-	-	-	1 (1,2%)			1 (0,3%)
FV22	6	-	+	+	+	+	+	+	-	-			4 (3,3%)	4 (1,3%)
FV23	3	+	-	-	-	+	+	-	-	-			1 (0,8%)	1 (0,3%)
FV24	6	+	-	+	-	+	+	+	+	-		3 (3%)		3 (1%)
FV25	5	-	+	+	+	+	+	-	-	-			1 (0,8%)	1 (0,3%)
FV26	6	+	+	+	-	+	+	+	-	-			1 (0,8%)	1 (0,3%)
FV27	6	+	-	+	+	+	+	+	-	-		1 (1%)		1 (0,3%)

Legenda: HLAR – resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos; HLR-S – resistência a níveis elevados de estreptomicina; HLR-G – resistência a níveis elevados de gentamicina; HLR-GS – resistência a níveis elevados de gentamicina e estreptomicina; (+) presença de produto amplificado; (-) ausência de produto de amplificação; Fator de virulência (FV).

Fonte: A autora, 2017.

Tabela 9 – Distribuição de perfis de virulência entre amostras de *E. faecalis* HLAR isoladas de pacientes atendidos em instituições do Rio de Janeiro no período de 2005 a 2013

PERFIS DE VIRULÊNCIA	Ano/Nº amostras (%)									TOTAL (N=306)
	2005 (N=63)	2006 (N=45)	2007 (N=45)	2008 (N=23)	2009 (N=54)	2010 (N=30)	2011 (N=23)	2012 (N=17)	2013 (N=6)	
FV1	6 (9,5%)		1 (2,2%)			2 (6,7%)		2 (11,7%)		11 (3,6%)
FV2	3 (4,8%)			1 (4,3%)						4 (1,3%)
FV3	14 (22,2%)	9 (20%)	10 (22,2%)	9 (39,1%)	18 (33,3%)	8 (26,7%)	4 (17,4%)	2 (11,7%)	2 (33,3%)	76 (24,8%)
FV4	13 (20,6%)	6 (13,3%)	8 (17,8%)	2 (8,7%)	13 (24,1%)	6 (20%)	3 (13%)	2 (11,7%)		53 (17,3%)
FV5	2 (3,2%)	1 (2,2%)								3 (1%)
FV6	3 (3,8%)				1 (1,9%)			6 (35,3%)		9 (2,9%)
FV7	7 (11,1%)	8 (17,8%)	13 (28,9%)	7 (30,4%)	8 (14,8%)	5 (16,7%)	4 (17,4%)	2 (11,7%)	2 (33,3%)	56 (18,3%)
FV8	2 (3,2%)				1 (1,9%)					4 (1,3%)
FV9	1 (1,6%)	1 (2,2%)						1 (5,9%)		3 (1%)
FV10	4 (6,3%)	8 (17,8%)	2 (4,4%)		1 (1,9%)	1 (3,3%)	1 (4,3%)			17 (5,6%)
FV11	3 (4,8%)	1 (2,2%)	3 (6,6%)	2 (8,7%)		1 (3,3%)	2 (8,7%)			12 (3,9%)
FV12		1 (2,2%)								1 (0,3%)
FV13	3 (4,8%)	4 (8,8%)	3 (6,6%)	1 (4,3%)	3 (5,6%)	2 (6,7%)	5 (21,7%)		1 (16,7%)	22 (7,2%)
FV14		2 (4,4%)	1 (2,2%)		1 (1,9%)					4 (1,3%)
FV15		1 (2,2%)			1 (1,9%)					2 (0,6%)
FV16		1 (2,2%)								1 (0,3%)
FV17		1 (2,2%)					1 (4,3%)			2 (0,6%)
FV18			1 (2,2%)		1 (1,9%)					2 (0,6%)
FV19	2 (3,2%)		1 (2,2%)		1 (1,9%)	1 (3,3%)	2 (8,7%)	2 (11,7%)		9 (2,9%)
FV20			1 (2,2%)		1 (1,9%)					3 (1%)
FV21		1 (2,2%)		1 (4,3%)						1 (0,3%)
FV22			1 (2,2%)		2 (3,7%)	1 (3,3%)				4 (1,3%)
FV23					1 (1,9%)					1 (0,3%)
FV24						1 (3,3%)	1 (4,3%)		1 (16,7%)	3 (1%)
FV25						1 (3,3%)				1 (0,3%)
FV26	1 (1,6%)									1 (0,3%)
FV27					1 (1,9%)					1 (0,3%)

Legenda: Fator de virulência (FV).

Fonte: A autora, 2017.

A diversidade genotípica das amostras de *E. faecalis* HLAR que compuseram este estudo foi avaliada pelas metodologias de eletroforese em campo pulsado – PFGE – e tipificação de sequências em múltiplos loci – MLST.

As análises por PFGE foram realizadas após digestão do DNA genômico pela endonuclease de restrição *Sma*I. Das 306 amostras HLAR, seis não apresentaram produtos de restrição com esta enzima e não foram incluídas nessas análises. A partir das 300 amostras tipificadas por PFGE, foram identificados 239 perfis de fragmentação distintos. Destes, quinze foram considerados perfis únicos (5%; 15/300). Os demais 224 perfis foram reunidos em grupos, cujos arranjos foram definidos com auxílio do software BioNumerics v.7.6, pelo emprego do coeficiente de Dice, tolerância de 2, algoritmo UPGMA e o índice de similaridade $\geq 80\%$. Com o emprego desses parâmetros foram identificados 36 grupos de PFGE, que foram nomeados de GP1 a GP36.

Doze grupos PFGE foram constituídos de seis a 41 amostras, resultando no arranjo total de 73,7% (221/300) da amostragem avaliada. Os demais 24 grupos foram constituídos de dois a quatro representantes, reunindo um total de 21,3% (64/300) das amostras HLAR.

As amostras HLR-S (n=99) foram distribuídas em 24 grupos de PFGE e representaram 11 dos 15 perfis únicos. Além disso, cinco das seis amostras que não foi possível obter perfis de restrição com a enzima *Sma*I eram HLR-S. Os grupos de PFGE que reuniram o maior número de amostras HLR-S foram: GP22 (26,3%; 26/99), que reuniu amostras apenas da instituição A e isoladas nos anos de 2005 a 2011 e 2013; GP2 (8,1%; 8/99), com amostras das instituições A, D, I e H do período de 2005 a 2007, 2009 a 2010 e 2012; e GP24 (7,1%; 7/99) com amostras das instituições A, C e E e isoladas no período de 2005 a 2007, 2009 e 2012.

As amostras HLR-G (n=86) foram distribuídas em 23 grupos de PFGE e dois perfis únicos. Os grupos de PFGE que reuniram o maior número de amostras HLR-G foram: GP8 (26,7%; 23/86) com amostras das instituições A e E dos anos de 2005 a 2008 e 2012; GP3 (19,8%; 17/86) reuniu amostras das instituições A B, C e I dos anos de 2006 a 2012; e GP19 (9,3%; 8/86) com amostras das instituições L e C dos anos de 2009 e 2010.

As amostras HLR-GS (n=121) fizeram parte de 23 grupos de PFGE, quatro perfis únicos e uma amostra não foi tipificada. Os grupos que reuniram o maior número de amostras HLR-GS foram: GP1 (23,1%; 28/121) com amostras das instituições hospitalares A, C, D, E, F, H, J e L isoladas nos anos de 2005, 2006, 2008 a 2010 e 2012; GP8 (14,9%; 18/121) com amostras das instituições hospitalares A e E e isoladas em 2005 a 2008 e 2012; GP16 (12,4%; 15/121) com amostras das instituições hospitalares A, D, F, G e H isoladas nos períodos de 2006 a 2009 e de 2011 a 2013.

A maioria dos grupos de PFGE reuniu amostras com fenótipos/genótipos HLRAR distintos. Entretanto de maneira geral, amostras de *E. faecalis* HLR-GS foram mais frequentemente relacionadas as HLR-G. Por outro lado, as amostras HLR-S foram as que constituíram o maior número de grupos com amostras apresentando exclusivamente esta característica de HLRAR.

Das 25 amostras que apresentaram resistência a níveis elevados de estreptomicina possivelmente decorrente de evento de mutação, as 13 que expressaram HLR-GS foram distribuídas em cinco grupos de PFGE (GP2, GP3, GP4, GP16 e GP34), sendo que o prevalente (GP16) reuniu 61,5% (8/13) destas. As demais 12 amostras, que expressaram HLR-S foram distribuídas em cinco grupos de PFGE (GP4, GP20, GP22, GP24 e GP31), dois perfis únicos e uma não foi tipificada.

Correlacionando os perfis genotípicos de HLRAR com os resultados obtidos com a metodologia de PFGE, foi observado que o prevalente designado S1 foi distribuído nos seguintes grupos: 84,6% (22/26) das amostras HLR-S do grupo GP22; 100% (8/8) do GP2; e 42,9% (3/7) do GP24. As amostras que apresentaram o perfil genotípico G1 foram assim distribuídas nos grupos de PFGE: 47,8% (11/23) das amostras HLR-G no GP8; e 84,6% (11/13) do GP5. Já as amostras que compuseram o perfil G3, o segundo em frequência para HLR-G, foram reunidas como: 58,8% (10/17) de GP3; e 30,4% (7/23) do GP8. Nas amostras HLR-GS, o perfil prevalente GS1 representou 67,9% (19/28) do GP1. O segundo perfil genotípico prevalente em amostras HLR-GS, GS3 representou 55,6% (10/18) dessas amostras em GP8. Os grupos GP16, GP13 e GP19 que também reuniram um percentual elevado de amostras HLR-GS não apresentaram perfis genotípicos prevalentes.

A análise dos arranjos definidos por PFGE em relação ao espécime clínico de origem das amostras bacterianas revelou que os grupos prevalentes foram constituídos de amostras oriundas de diferentes fontes clínicas. Entretanto, a maioria das amostras de fezes (culturas de vigilância) foi reunida nos grupos GP1 e GP19; de urina em GP3 e GP8; de secreções abdominais e de respiratórias em GP8; e de sangue em GP8, GP5 e GP16.

As amostras portadoras do genótipo *vanA* foram distribuídas em seis grupos definidos por PFGE: 24 amostras em GP1, oito em GP19, três em GP16, e uma amostra em GP3, GP6 e GP28. As amostras VREfa portadoras de *vanA* compartilharam grupos de PFGE com amostras VSEfa. As quatro portadoras do genótipo *vanB* foram alocadas em GP1 (1 amostra) e GP3 (três amostras), compartilhando grupos PFGE com amostras *vanA* e com VSEfa.

As amostras não susceptíveis à penicilina foram reunidas em 13 grupos PFGE (24 amostras em GP1; oito em GP5; sete em GP19; três em GP3; duas em GP8, GP16 e GP18; e uma em GP4, GP6, GP12, GP14, GP28 e GP30) e em quatro perfis únicos.

Não foi observada associação específica entre os perfis de virulência e os arranjos formados por PFGE.

A Tabela 10 sumariza os resultados obtidos com a metodologia de PFGE. A FIGURA 10 demonstra um dendrograma representativo do relacionamento genético dos grupos de PFGE que reuniram as 300 amostras de *E. faecalis* HLAR e contruído com auxílio do software BioNumerics.

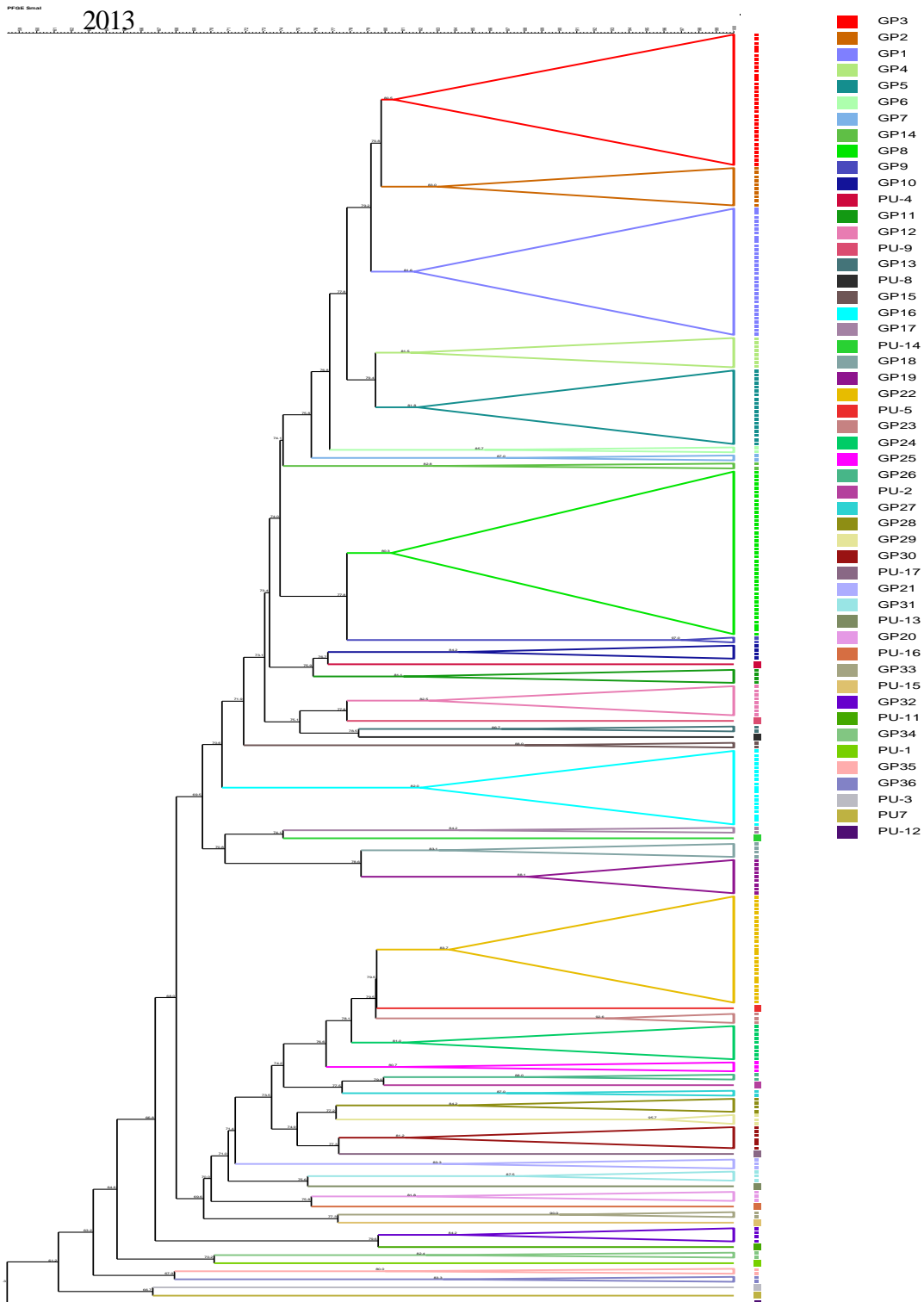
A Figura 10 demonstra esses resultados.

Tabela 10 – Distribuição dos grupos de PFGE em relação às categorias de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos, ano de isolamento instituições de origem, número de marcadores de resistência e de virulência de amostras de *E. faecalis* HLAR

GRUPO PFGE (Nº DE AMOSTRAS)	Nº DE AMOSTRAS EM:			ANO	INSTITUIÇÕES DE ORIGEM	Nº DE MARCADORES DE RESISTÊNCIA	Nº DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA (Nº DE AMOSTRAS)
	HLR- S	HLR- G	HLR- GS				
GP1 (N= 32)		4	28	2005-2006; 2008- 2010; 2012	A, C, D, E, F, H, J, L	3, 6, 7, 9, 10 e 11	6 (n=7); 7 (n=25)
GP2 (N= 10)	8		2	2005-2007; 2009- 2010; 2012	A, D, I, H	4-9	4 (n=1); 5 (n=1); 6 (n=4); 7 (n=3); 8 (n=1)
GP3 (N= 33)	3	17	13	2006-2012	A, B, C, I	3-10	5 (n=3); 6 (n=9); 7 (n=9); 8 (n=12)
GP4 (N= 8)	3	4	1	2005-2007; 2013	A	3, 4, 7, 8 e 9	4 (n=1); 5 (n=2); 7 (n=9); 8 (n=12)
GP5 (N= 19)	2	3	14	2005 – 2008; 2010; 2012	A, H	6, 7, 8 e 9	4 (n=2); 5 (n=3); 6 (n=5); 7 (n=7); 8 (n=2)
GP6 (N= 2)		1	1	2007; 2010	A, C	7 e 10	7 (n=2)
GP7 (N= 2)			2	2001-2012	A	2	7 (n=2)
GP8 (N= 41)		23	18	2005-2008;2012	A, E	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 11	5 (n=2); 6 (n=20); 7 (n=18); 8 (n=1)
GP9 (N= 2)			2	2007	A	6 e 8	6 (n=1); 7 (n=1)
GP10 (N= 4)	1	1	2	2001-2008	A	5, 7, 8 e 9	4 (n=1); 7 (n=2); 8 (n=1)
GP11 (N= 4)	2	1	1	2008; 2010-2011	A	3, 6 e 7	4 (n=1); 6 (n=3)
GP12 (N= 8)		1	6	2005-2007;2009	A	5, 6, 7, 8 e 10	7 (n=12)
GP13 (N= 2)		1	1	2009-2010	A	6 e 8	6 (n=2)
GP14 (N= 2)	1	1		2005-2012	A, H	5 e 7	5 (n=1); 6(n=1)
GP15 (N= 2)		1	1	2005	A	5	6 (n=1); 7 (n=1)
GP16 (N= 19)	2	2	15	2006-2009; 2011- 2013	A, D, F, G, H	5, 6, 7 e 8	4 (n=1); 7 (n=2); 8 (n=16)
GP17(N= 2)	1	1		2010-2011	A	3 e 4	5 (n=1); 7 (n=1)
GP18 (N= 4)	3	1		2006; 2009; 2011	A	5, 6, 8 e 9	4 (n=1); 6 (n=2); 7 (n=1)
GP19 (N= 9)		8	1	2009-2010	L, C	6, 7, 8 e 10	5 (n=2); 6 (n=6); 7 (n=1)
GP20 (N= 3)	3			2010-2012	A	3, 4 e 5	4 (n=1); 6 (n=1); 7 (n=1)
GP21 (N= 3)	3			2007; 2009-2010	A	3, 6 e 7	5 (n=1); 6 (n=1); 7 (n=1)
GP22 (N= 27)	26	1		2005-2011; 2013	A	3, 4, 5, 6, 7 e 9	4 (n=2); 5 (n=7); 6 (n=3); 7 (n=5); 8 (n=10);
GP23 (N= 3)	3			2006-2007; 2009	A, C	3, 4 e 6	2 (n=1); 5 (n=1); 8 (n=1)
GP24 (N= 9)	7		2	2005-2007; 2009; 2012	A, C, E	4, 5, 6, 7 e 8	4 (n=1); 5 (n=2); 6 (n=4); 7 (n=1); 8 (n=1);
GP25 (N= 3)	2		1	2007; 2010-2011	A	5, 7 e 8	4 (n=1); 7 (n=2);
GP26 (N= 2)	2			2005-2006	A	2 e 6	5 (n=1); 6 (n=1)
GP27 (N= 2)	1	1		2006; 2012	A	5 e 6	7 (n=2)
GP28 (N= 4)	1	1	2	2009-2010	A, L	3, 5 e 8	3 (n=1); 6 (n=1); 7 (n=2)
GP29 (N= 3)	1		2	2009; 2011	A	5	5 (n=1); 7 (n=2)
GP30 (N= 6)	2	2	2	2006-2008	A	4, 5, 6, 8 e 10	4 (n=1); 6 (n=2); 8 (n=3)
GP31 (N= 3)	3			2006; 2011	A	3, 4 e 6	5 (n=2); 7 (n=1)
GP32 (N= 4)		3	1	2010-2011	A	7 e 8	7 (n=2); 8 (n=2)
GP33 (N= 2)	2			2009; 2011	A	3 e 4	7 (n=1); 8 (n=1)
GP34 (N= 2)	1		1	2009-2010	A	4 e 8	8 (n=2)
GP35 (N= 2)		2		2005	A	6	6 (n=1); 7 (n=1)
GP36 (N= 2)		2		2009-2010	A	5 e 9	5 (n=1); 6 (n=1)

Fonte: A autora, 2017.

Figura 10 – Dendrograma representativo do relacionamento genético de amostras de *E. faecalis* resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos isoladas de pacientes atendidos em 11 hospitais localizados no estado do Rio de Janeiro, no período de 2005 a 2013



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. Parâmetro utilizado: índice de tolerância = 2; os grupos foram definidos considerando-se a similaridade de $\geq 80\%$.

Fonte: A autora, 2017.

Nas 58 amostras selecionadas para avaliação por MLST, foram identificados os seguintes 17 tipos: ST2, ST4, ST6, ST9, ST16, ST21, ST23, ST26, ST30, ST40, ST55, ST97, ST103, ST330, ST626, ST769 e ST770. Estes dois últimos foram descritos pela primeira vez neste estudo.

As amostras HLR-G (13/58) foram agrupadas em sete STs: ST4, ST6, ST9, ST23, ST26, ST626 e ST769, sendo ST6 o prevalente, reunindo sete amostras (53,9%; 7/13). Já as amostras HLR-S (19/58) foram distribuídas em nove STs: ST2, ST4, ST6, ST21, ST30, ST97, ST330, ST769 e ST770. Destes, o ST21 foi o mais frequente, observado em oito amostras (42,1%; 8/19). As amostras HLR-S que expressaram esta característica de resistência por eventos de mutação (3/19) pertenceram a ST4, ST21 e ST769. Também foi identificado que as amostras HLR-GS (26/58) pertenceram a nove STs: ST4, ST6, ST16, ST21, ST26, ST40, ST55, ST103 e ST769. O ST prevalente em HLR-GS foi ST6 (38,5%; 10/26). As amostras HLR-GS cuja expressão de HLAR para estreptomicina foi decorrente de mutação (4/26) pertenceram aos ST4, ST6, ST21 e ST40. Apenas o ST4, ST6 e o novo ST769 foram observados nas três apresentações de HLAR.

Em relação aos espécimes clínicos de origem, foi observado que a partir de 27 amostras isoladas de urina foram identificados 15 STs, incluindo ST769 e ST770 que foram descritos neste estudo. Enquanto que, em nove amostras de sangue foram observados cinco STs. Os ST9, ST103 e ST40 compartilharam o mesmo genótipo HLAR, porém foram associados a amostras provenientes de diferentes espécimes clínicos.

A distribuição dos STs por hospital de origem está indicado na Figura 11, assim como a distribuição dos STs por ano no período analisado e por espécime clínico de origem. Cabe ressaltar que foram identificados STs de distribuição inter-hospitalar. Em relação à distribuição dos STs por ano, foi observado principalmente que ST6 foi observado durante quase a totalidade do período avaliado (2005 a 2010; e 2012). Quanto ao espécime clínico de origem, nas amostras isoladas de sangue o ST mais frequente também foi o ST6. Nas amostras isoladas de urina, o ST6 e ST21 foram os mais frequentes.

O gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* foi identificado amplamente distribuídos nos STs associados as amostras resistente a altos níveis de gentamicina, não tendo sido restrito a um grupo de ST e/ou CC. O mesmo foi observado para o gene *ant6'-Ia*, em relação as amostras HLR-S. Já o gene *aph(2'')-Ic* foi observado identificado em amostras pertencentes ao ST6, ST9, ST4 e ST103 e *ant9'-Ia* e *ant9'-Ib* estiveram presentes no ST769 oriundo de cultura de vigilância (fezes). Já para os genes que codificam EMAs associadas a resistência a outros antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos, foi identificado que o gene *aph(3')-IIIa* foi

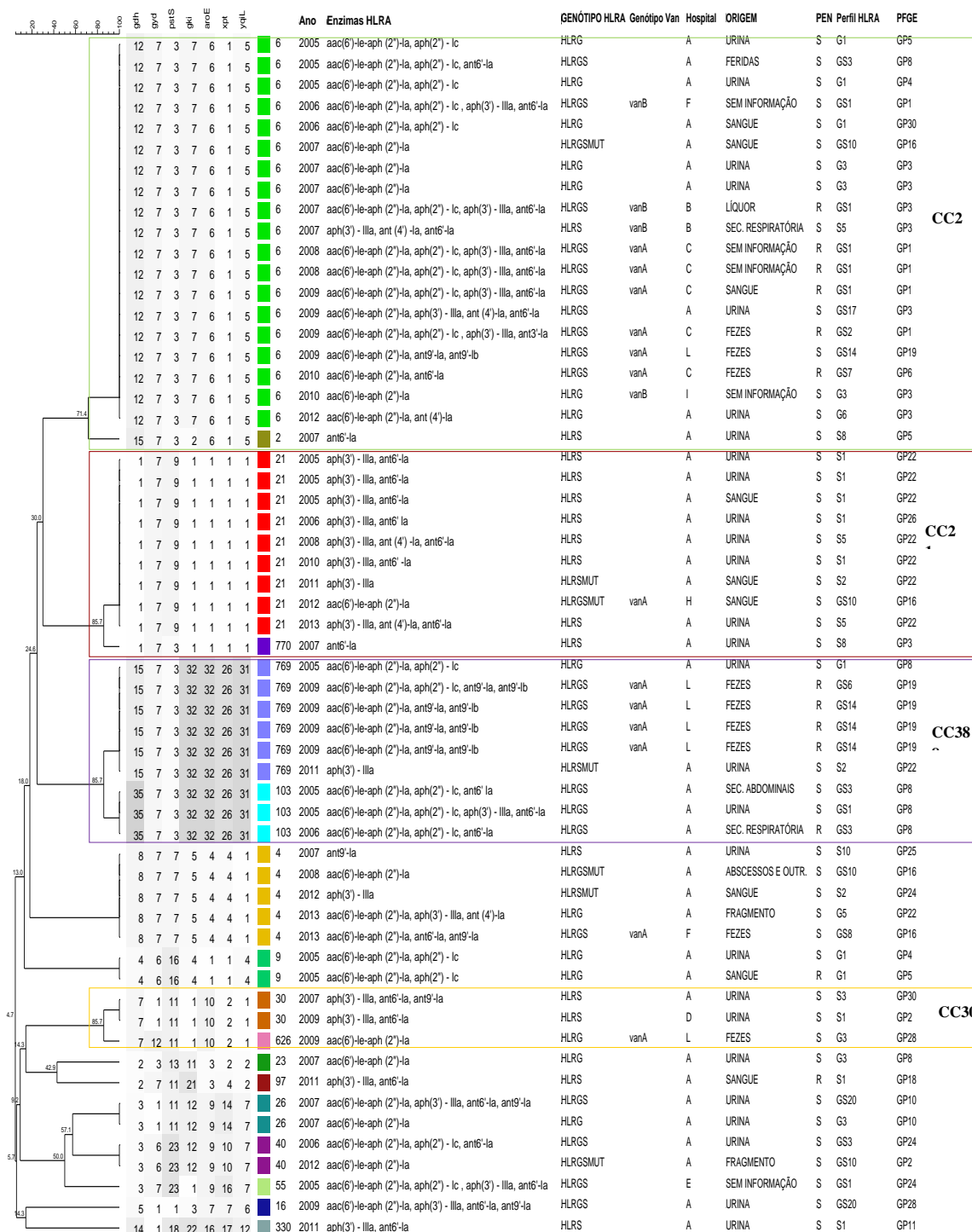
frequente no ST6, ST21, ST30, ST55, ST97 e ST330 e em baixa frequência no ST4, ST26, ST103, ST769. O gene *ant4'-Ia* foi relacionado ao ST769 e em baixa frequência aos ST4, ST6 e ST21 (Figura 11).

Nos genótipos de resistência aos glicopeptídeos, nas amostras portadoras do genótipo *vanA* foi observado os STs: ST4, ST6, ST21, ST626 e o novo ST769, com maior frequência do ST6, seguido do novo ST769. Nas amostras portadoras do genótipo *vanB* foi observado apenas o ST6. Nas amostras que apresentaram resistência à penicilina foram observados os STs: ST6, ST9, ST97, ST103 e o novo ST769, também com maior frequência o ST6 seguido do novo ST769.

Em relação aos grupos definidos pelo PFGE, o grupo G1 foi relacionado ao ST6 (cinco amostras HLR-G); o GP2 ao ST30 (uma amostra HLR-S) e ST40 (uma amostra HLR-GS); o GP3 ao ST6 (uma amostra HLR-S) e ST770 (uma amostra HLR-S); o GP4 ao ST6 (uma amostra HLR-G) e ST9 (uma amostra HLR-G); o GP5 ao ST2 (uma amostra HLR-S), ST6 (uma amostra HLR-G) e ST9 (uma amostra HLR-G); o GP6 ao ST6 (uma amostra HLR-GS); o GP8 ao ST103 (três amostras HLR-GS), ST6 (uma amostra HLR-GS), ST769 (uma amostra HLR-G) e ST23 (uma amostra HLR-G); o GP10 ao ST26 (uma amostra HLR-G e outra HLR-GS); o GP11 ao ST330 (uma amostra HLR-S); o GP16 aos ST4 (duas amostras HLR-GS), ST6 (uma amostra HLR-GS) e ST21 (uma amostra HLR-GS); o GP18 ao ST97 (uma amostra HLR-S); o GP19 ao ST769 (quatro amostras HLR-GS) e ST6 (uma amostra HLR-GS); o GP22 ao ST21 (sete amostras HLR-S), ST4 (uma amostra HLR-G) e ST769 (uma amostra HLR-GS); o GP25 ao ST4 (uma amostra HLR-S); o GP24 ao ST4 (uma amostra HLR-S), ST40 (uma amostra HLR-GS) e ST55 (uma amostra HLR-GS); o GP26 ao ST21 (uma amostra HLR-S); o GP28 ao ST16 (uma amostra HLR-GS) e ST626 (uma amostra HLR-G); o GP30 ao ST6 (uma amostra HLR-G) e ST30 (uma amostra HLR-S).

Observamos que o novo ST769 é um SLV do ST103, com substituição do alelo 35 para 15 no gene *gdh* e integrante do CC388. Para o novo ST770 observamos ser SLV do ST21, com substituição do alelo 9 para 3 no gene *pstS* e integrante do CC21. O ST2 DLV do ST6 pela substituição já relatada do alelo 7 para 2 no gene *gki* e do alelo 12 para 15 no gene *gdh* integrante do CC2. E nesse estudo observamos que o ST626 é SLV do ST30 por substituição do alelo 1 para 12 no gene *gyd* e integrante do CC30 (Figura 12).

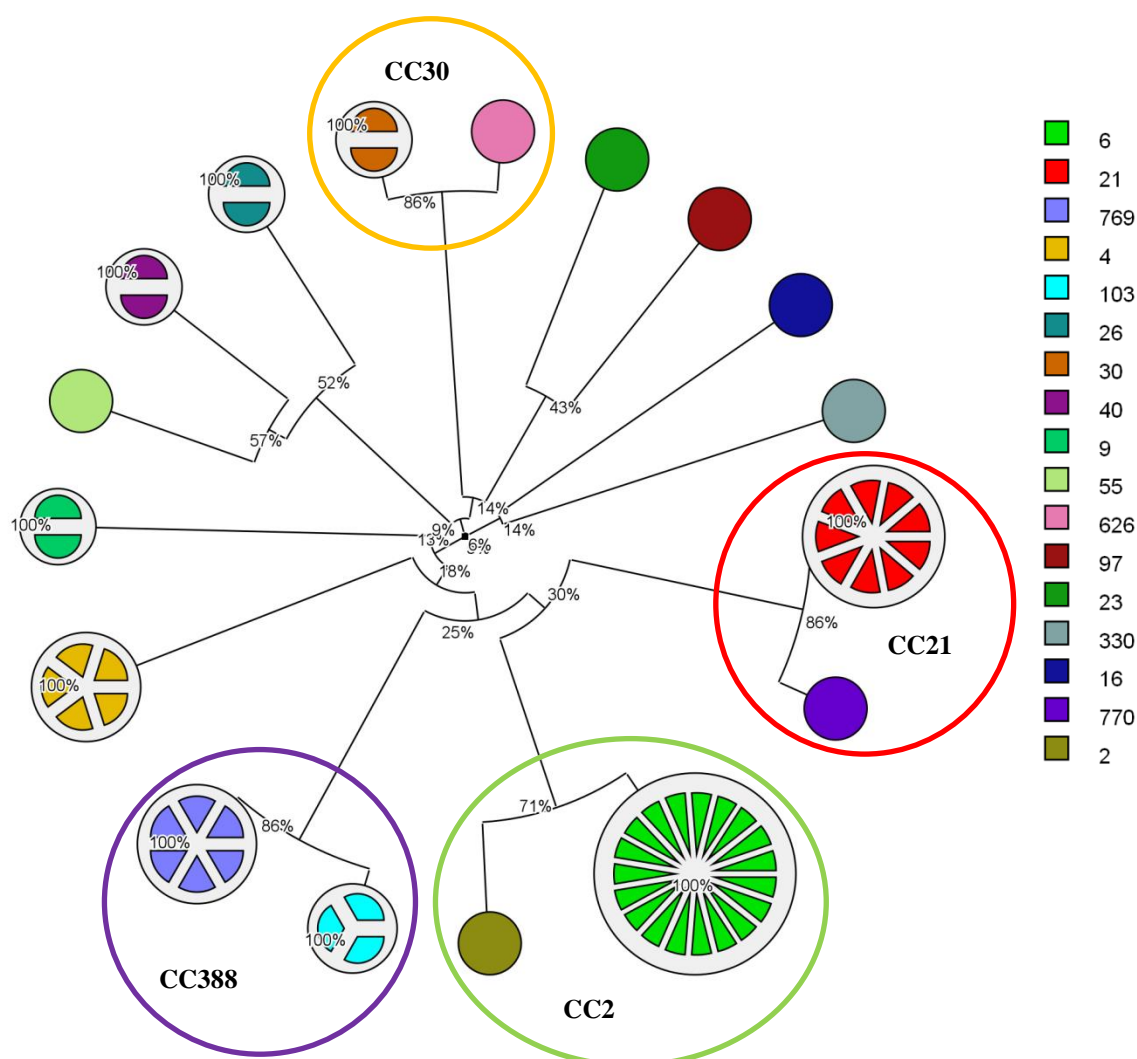
Figura 11 – Dados de MLST e a correlação com ano, hospital, origem clínica, fenótipo e genótipo de HLRA, genótipo de resistência à vancomicina, não susceptibilidade penicilina e grupos de PFGE de amostras de *E. faecalis*



Nota: Dendrograma criado usando o software BioNumerics v 7.6. apresentando a comparação de 58 isolados representativos do *E. faecalis* HLRA. A intensidade da cor cinza da caixa sombreada está relacionada com os perfis numéricos obtidos pela disposição de sete alelos que determinam o tipo de sequência (ST) na análise de MLST, quanto mais escura a caixa, maior o peso do alelo do gene correspondente na definição dos grupos. O perfil numérico de sete genes testados está listado no lado direito do dendrograma. Os grupos foram criados se os vizinhos diferiam em não mais do que dois dos sete alelos com as porcentagens $\geq 70\%$ (demarcado pela linha vermelha).

Fonte: A autora, 2017.

Figura 12 – Complexos Clonais definidos por análise de MLST de amostras *E. faecalis* resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos isoladas em instituições hospitalares do Estado do Rio de Janeiro no período de 2005 á 2013



Nota: Dendrograma circular criado usando o software BioNumerics v 7.6 representando a comparação de 58 amostras de *E. faecalis* resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos. Os complexos foram definidos se os vizinhos diferiam em não mais do que dois dos sete alelos, com as percentuais $\geq 70\%$, demarcados pelos círculos coloridos. Percentuais de 86% se referem a variação alélica em apenas um locús (SLV) e de 71% a dois locús (DLV) no painel de sete locús para definir o tipo de MLST (ST). Os gráficos em pizza representam o conjunto de amostras que foram tipificadas pelo o ST correspondente a cor na legenda, com a fatia indicando o número de amostras. O círculo preenchido representam STs observados em apenas uma amostra, com a cor correspondente ao ST na legenda.

Fonte: A autora, 2017.

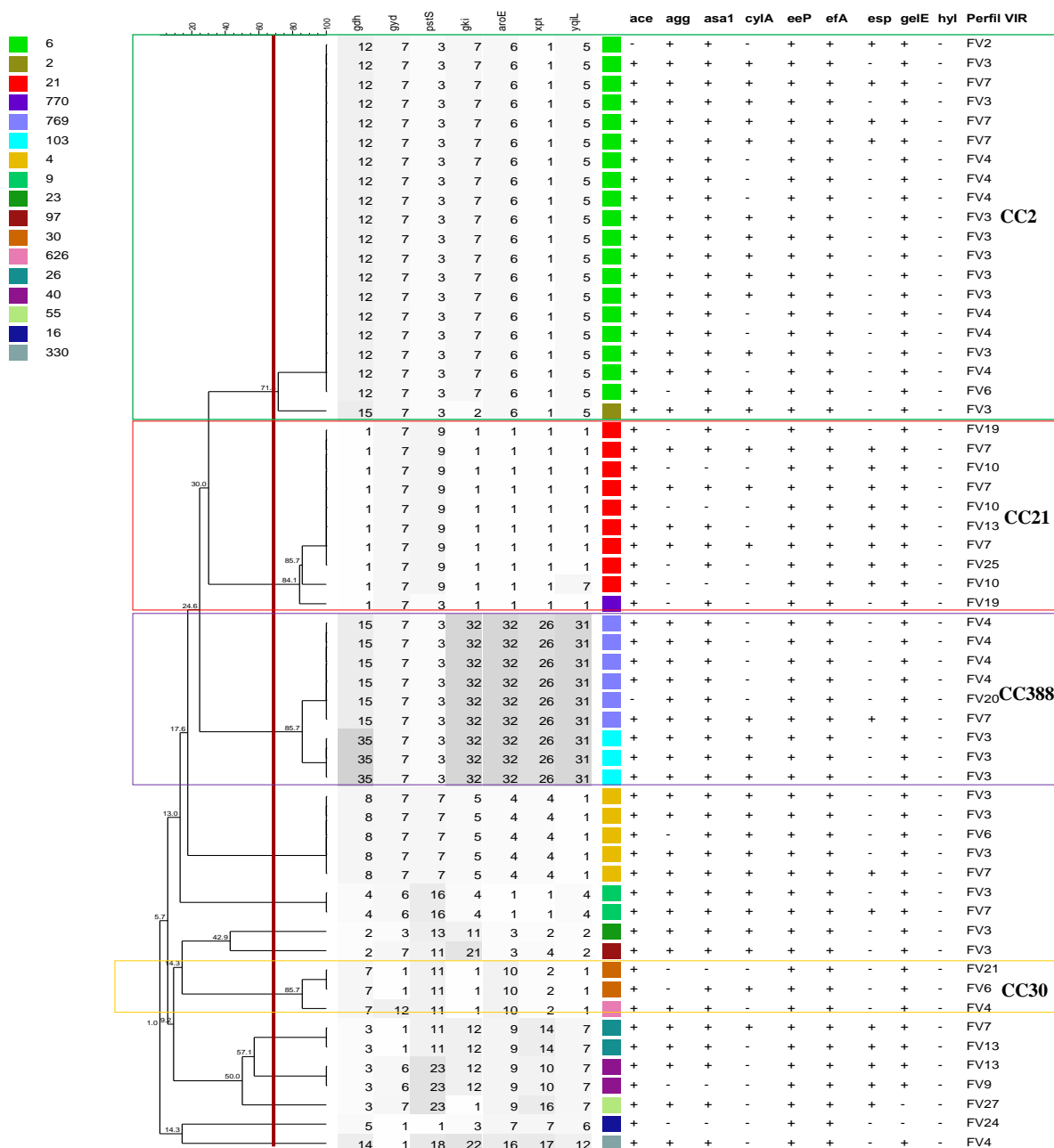
Foi identificado que, em relação aos determinantes de virulência, pode-se destacar que 12 das 19 amostras pertencentes ao ST6, e a única amostra do ST2 foram positivas *cylA*. Também, as cinco amostras do ST4, duas ST9 e três do ST103 eram portadoras de *cylA*. Entretanto, das seia amostras pertencentes ao ST769 (SLV de ST103) apenas uma foi *cylA* positiva. Cabe ressaltar que, pode ser identificado uma correlação entre CC2, ST4, ST9, ST103 com a presença de *cylA*.

Foi observada uma correlação entre ST21, ST26 e ST40 e a presença de *esp*. Entretanto, não foi observada correlação entre *esp* e o CC2, CC388, CC30 e para o ST16, ST23, ST97 e ST330.

Já a presença de *gelE* foi correlacionada com CC2, CC21, CC388, CC30, ST4, ST9, ST40, ST97, ST330. Os genes *asal* e *agg* foram identificados em CC2, CC388, ST9, ST26, ST55, ST97 e ST330.

O gene *ace* também foi identificado entre amostras de *E. faecalis* HLAR pertencentes ao CC2. Os genes *eep* e *efaA* foram correlacionados com todos os CCs e STs do estudo, presente em todas as amostras, sendo que as amostras do ST16 apresentaram apenas estes genes. Não observamos uma associação direta entre um determinado ST e um perfil de virulência. Estes resultados estão apresentados na Figura 13.

Figura 13 – Correlação dos ST com os genes de virulência de amostras de *E. faecalis* resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos isoladas em instituições hospitalares do Estado do Rio de Janeiro no período de 2005 á 2013



Nota: Dendrograma criado usando o software BioNumerics v 7.6. apresentando a comparação de 58 isolados representativos do *E. faecalis* HLRA. A intensidade da cor cinza da caixa sombreada está relacionada com os perfis numéricos obtidos pela disposição de sete alelos que determinam o tipo de sequência (ST) na análise de MLST, quanto mais escura a caixa, maior o peso do alelo do gene correspondente na definição dos grupos. O perfil numérico de sete genes testados está listado no lado direito do dendrograma, no painel MLST. Os grupos (complexos) foram criados se os vizinhos diferiam em não mais do que dois dos sete alelos com as porcentagens $\geq 70\%$ (demarcado pela linha vermelha). A porcentagem de números presentes entre os ramos do dendrograma é correspondente à quantidade de variação alélica, onde os agrupamentos foram obtidos por análise numérica. No painel, a caixa colorida indicou o tipo MLST (ST).

Fonte: A autora, 2017.

4 DISCUSSÃO

Membros do gênero *Enterococcus* fazem parte da microbiota normal do trato gastrointestinal e tem se revelado nas últimas duas décadas como importantes causas de infecções associadas aos cuidados de saúde (IACS). Dentre as espécies deste gênero, *E. faecalis* é a prevalente nas infecções humanas, particularmente as de maior gravidade, como as da corrente sanguínea (DE KRAKER et al., 2013; HUMPHREYS et al., 2014; KARLOWSKY et al., 2004; LOW et al., 2001; SIEVERT et al., 2013).

O tratamento das infecções enterocócicas, principalmente as de maior gravidade, está convencionalmente baseado no uso de uma combinação sinérgica entre um agente ativo para parede celular, tal como um beta-lactâmico ou um glicopeptídeo, e um aminoglicosídeo. O sucesso de tal associação é resultado da atividade bactericida contra esses microrganismos (ARIAS et al., 2010; PERICÁS et al., 2015).

Entretanto, o aumento na prevalência de amostras não susceptíveis a esses regimes terapêuticos usuais tem conduzido a constante busca de terapias alternativas. Além disso, determinam a necessidade contínua do desenvolvimento e aplicação de programas de vigilância epidemiológica, que resultem no controle da disseminação de amostras multirresistentes, bem como no esclarecimento da dinâmica de circulação dos genótipos de resistência aos antimicrobianos (BEARDSLEY et al., 2012; BRODRICK et al., 2016; CHEAH et al., 2013; JONES et al., 2013; LEE et al., 2013; LEONE; NOVIELLO; ESPOSITO, 2016; MOELLERING; ANDERSON, 2012; PALMER; KISHONY, 2013; PROTONOTARIOU et al., 2010; STANDIFORD et al., 2012).

A resistência aos antimicrobianos pertencentes à classe dos aminoglicosídeos, particularmente gentamicina, já foi relatada como importante marcador epidemiológico para amostras associadas ao ambiente hospitalar (OSUKA et al., 2016; QU et al., 2006; ZARRILLI et al., 2005). De fato, nossos resultados sugerem que percentuais elevados reflitam a prevalência dessas amostras em nosso meio. Isto porque, apesar deste estudo ter utilizado amostras bacterianas provenientes de coleção de culturas, foi possível identificar amostras portadoras de HLAR em 11 instituições hospitalares localizadas no estado do Rio de Janeiro.

Enterococcus portadores de HLAR encontram-se difundidos em diferentes regiões do mundo e vários estudos têm se preocupado em ressaltar a importância da expressão dessa característica de resistência, seja pela influência direta na redução da escolha terapêutica para os casos de maior gravidade, ou ainda indireta na co-seleção de amostras multirresistentes.

Assim, dados recentes relativos a instituições hospitalares, localizadas em diversos países de todos os continentes, divulgados por programas específicos de monitoramento da resistência bacteriana, como *Australian Group on Antimicrobial Resistance Enterococcus Surveillance Programme* (ANNUAL REPORT, 2010), *Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe* (2014), *Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos* (2014) e mais recentemente *Canadian Antimicrobial Resistance Surveillance System* (2016) têm apontado percentuais elevados de isolamento dessas amostras.

A resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos foi critério de inclusão das amostras de *E. faecalis* neste estudo. Assim, todas as demais análises se detiveram a um universo de 306 amostras bacterianas, que exibiram esta característica de resistência representada em três categorias: HLR-S, resistência a níveis elevados apenas de estreptomicina – 99 amostras (32,4%); HLR-G, apenas de gentamicina – 86 amostras (28,1%); e HLR-GS, concomitante a ambos os aminoglicosídeos – 121 amostras (39,5%). A amostragem foi determinada pela associação de características fenotípicas e genotípicas de resistência. A expressão de fenótipos HLAR foi identificada em testes de disco difusão e pela determinação da CIM para ambos os aminoglicosídeos por diluição em ágar. A detecção dos genes associados à expressão destas características foi realizada pela metodologia de PCR.

Comparando os dados obtidos neste estudo com um anterior também desenvolvido por nosso grupo (CARVALHO, 1998), que utilizou amostras de enterococos obtidas no período de 1993 a 1995, pode-se observar que a taxa de HLAR em *E. faecalis* se mantém elevada desde então (cerca de 50,0% no estudo anterior / 41,2% neste estudo). Entretanto, cabe registrar que, enquanto o percentual de amostras HLR-S foi menor em nosso estudo (56,0%, CARVALHO, 1998; 32,4%, neste estudo), registramos valores consideravelmente mais elevados de HLR-GS (cerca de 7,0%, Carvalho, 1998; 39,5%, neste estudo). Por outro lado, a taxa de HLR-G foi ligeiramente inferior neste estudo (cerca de 34,0%, CARVALHO, 1998; 28,1% neste estudo).

Foram identificadas incongruências entre fenótipos e genótipos de HLAR. Em algumas das amostras avaliadas, que apresentaram fenótipo HLR-S_{fen} ou HLR-GS_{fen}, não foram identificados produtos de amplificação compatíveis com genes responsáveis pela expressão de resistência a níveis elevados de estreptomicina. Entretanto, a determinação da CIM para estas amostras apontou valores compatíveis com resistência (>2.048 µg/mL), confirmando os resultados obtidos na metodologia de disco difusão e sugerindo outro mecanismo (que não a expressão de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos) envolvido nessa expressão. Apesar de nenhum outro teste ter sido empregado para avaliar em nível

molecular esses resultados, estes casos são comumente atribuídos à presença de mutações no sítio alvo do ribossomo, já tendo sido amplamente descrito em amostras de enterococos (JONES et al., 2013; LEE et al., 2013; MOELLERING; ANDERSON, 2012; PROTONOTARIOU et al., 2010; STANDIFORD et al., 2012; UDO et al., 2004).

Além disso, em 16 amostras de *E. faecalis* apresentando HLR-G_{fen} foram identificados produtos de amplificação compatíveis com genes associados com a resistência a níveis elevados de estreptomicina. Esses resultados trouxeram a reflexão quanto à relativa instabilidade na detecção de HLR para estreptomicina. Os resultados obtidos e inicialmente interpretados seguindo os critérios do CLSI (2016) foram também reavaliados utilizando-se os pontos de corte definidos pelo EUCAST (2016). De fato, duas dessas 16 amostras foram consideradas resistentes a níveis elevados de estreptomicina de acordo com o estabelecido pelo EUCAST (2016). As demais permaneceriam como não portadoras desta característica de resistência. Para esclarecer esses resultados, foi realizada a determinação da CIM e, segundo os resultados obtidos, essas amostras foram consideradas resistentes pelo EUCAST (2016); entretanto, não atingiram o ponto de corte determinado pelo CLSI (2016).

Dessa forma, nos parece que as recomendações preconizadas para a detecção do fenótipo de resistência a níveis elevados de estreptomicina precisam ser revistas, considerando-se a diversidade de apresentação dessa característica (que pode estar relacionada à presença de elementos transferíveis ou mutação), que parece ter influência nos resultados que não atendem aos pontos de corte atualmente estabelecidos.

Udo et al. (2004) relataram que amostras apresentando resistência a níveis elevados de estreptomicina podem exibir uma ampla faixa de valores de CIM (de 1.000 µg/mL a 4.000 µg/mL) e sinalizou a necessidade de revisão da interpretação dos resultados relativos a detecção dessa característica.

Sabe-se que para membros da família *Enterobacteriaceae*, tais como *Salmonella* e *Escherichia coli*, também não existem critérios unificados para a determinação da resistência a estreptomicina e dificuldades têm sido descritas na definição de um valor de corte para estreptomicina, que resulte em efeitos positivos para vigilância (GARCIA-MIGURA et al., 2012; TYSON et al., 2016). Nestes casos, os autores têm relacionado à dificuldade na classificação desses microrganismos em sensíveis ou resistentes à estreptomicina, pela disseminação de integrons contendo o cassete gênico *aadA* e os genes *strA-strB* e sua correlação com a CIM, o que gera resultados contraditórios (DORAN et al., 2006; GARCIA-MIGURA et al., 2012). Assim, ressaltamos que também para *E. faecalis* pode-se observar a inconsistência nos pontos de corte recomendados para a definição dessa característica de

resistência, podendo subestimar a real prevalência dessas amostras, que pode até mesmo ter influenciado na seleção da amostragem que veio a compor este estudo.

Para gentamicina não observamos incongruência entre o fenótipo e o genótipo. Apenas para cinco amostras, o resultado de disco difusão foi inconclusivo na interpretação do CLSI (2016). Esses resultados não puderam ser avaliados pelo EUCAST (2016), pois os documentos usam discos de antimicrobianos de concentrações diferentes. O resultado da CIM apresentado por essas amostras foi de $\geq 512 \mu\text{g/mL}$, sendo classificado nos dois documentos como resistente e, além disso, apresentaram o produto de amplificação compatível com a presença da enzima bifuncional. Para gentamicina as recomendações e os pontos de corte para interpretação dos resultados obtidos em testes de disco difusão e da determinação da CIM foram coerentes na caracterização dessas amostras.

Já foi reportado em estudos anteriores que o fenótipo HLR-S pode ser prevalente entre amostras HLAR isoladas de infecções no trato urinário.

Neste estudo foi observada uma maior frequência de amostras HLR-S oriundas de urina, enquanto que a maior prevalência de amostras HLR-G foi em sangue, cateter e secreções abdominais; e HLR-GS foi a característica prevalente das amostras provenientes de fezes, feridas e secreções respiratórias. Esses achados podem conduzir a hipóteses como: a probabilidade de que práticas terapêuticas possam estar influenciando na seleção dessas categorias de HLAR como, por exemplo, a maior associação de HLR-G às amostras de sangue; ou ainda espécimes clínicos que refletem uma maior circulação, manutenção e disseminação de amostras multirresistentes, como fezes e feridas, podem ter uma maior relação com o fenótipo/genótipo que integra a resistência concomitante a níveis elevados de ambos aminoglicosídeos (HLR-GS).

Através da análise dos genótipos de resistência de amostras HLR-G foi possível identificar que a resistência à gentamicina foi associada principalmente a presença do gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, que codifica uma enzima bifuncional que confere resistência a todos antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos, exceto a estreptomicina. Este gene foi identificado em amostras de *E. faecalis* obtidas de espécimes clínicos diversos e diferentes instituições hospitalares, que demonstraram sua ampla dispersão. A elevada prevalência deste genótipo em amostras de *Enterococcus* HLR-G já foi reconhecida por diversos estudos (PAPAPARASKEVAS et al., 2000, VANKULENKO et al, 2004; ZARRILLI et al., 2005; QU et al., 2006; EMANEINI, ALIGHOLI; AMINSHAHI, 2008; FEIZABADI et al.,2008; WATANABE et al., 2009; HASANI et al., 2012; PENA et al., 2013; CELIK; CAKIRLAR; TORUN, 2014; LI; WANG, 2014; HASANI et al., 2016; KHANI et al., 2016).

Além do gene que codifica para enzima bifuncional, registramos que o gene *aph(2'')-Ic* também foi frequente entre amostras HLR-G. Estudos anteriores corroboram esses resultados pela detecção de uma maior frequência de *aph(2'')-Ic* em amostras de *E. faecalis* (DONABEDIAN et al., 2003; QUIÑONES; KOBAYASHI; NAGASHIMA, 2009). Por outro lado, apenas uma amostra apresentou *aph(2'')-Ib* e *aph(2'')-Id* não foi identificado na amostragem avaliada. De fato, esses genes são identificados em baixa frequência nesses microrganismos e, além disso, somente existem relatos a cerca da detecção de *aph(2'')-Id* em amostras da espécie *E. faecium* exibindo resistência concomitante à vancomicina (ALAM et al., 2005; FEIZABADI et al., 2006).

O genótipo de resistência a níveis elevados de estreptomicina mais comum identificado neste estudo correspondeu a *ant6'-Ia*, corroborando com os achados de estudos anteriores (LI; WANG, 2014; LÓPEZ et al., 2012; PENA et al., 2013; SHOJIPO et al., 2009). Também foi observada a presença dos genes *ant9'-Ia*, *ant9'-Ib* e *ant3'-Ia* em menor frequência. Os genes *ant9'-Ia* e *ant9'-Ib* já foram também descritos em *S. aureus*, além de *E. faecalis* (ALAM et al., 2005; CHEN et al., 2010; SHAW et al., 1993). Além disso, o gene *ant3'-Ia* tem sido relatado em frequência baixa em estudos envolvendo amostras de *E. faecalis* (QUIÑONES; KOBAYASHI; NAGASHIMA, 2009), o que coincide com os resultados encontrados em nosso estudo. Aparentemente este gene está mais associado com a resistência a estreptomicina em *S. aureus* e em Gram-negativos membros da família *Enterobacteriaceae* (HOLLINGSHEAD et al., 1985; RAMIREZ; TOLMASKY, 2010).

Os genes *aph(3')-IIIa* e *ant4'-Ia* que conferem resistência a níveis elevados de outros aminoglicosídeos, que não gentamicina e estreptomicina, foram frequentes em amostras classificadas neste estudo como HLR-S; além serem também identificados em amostras HLRG e HLR-GS. A especificidade dessas enzimas para outros aminoglicosídeos (que não gentamicina e/ou estreptomicina) chama a atenção para a necessidade de reavaliação dos testes de triagem de amostras HLR, que costumam sugerir que o uso de gentamicina é suficiente para extrapolar os resultados obtidos para os demais aminoglicosídeos (exceto estreptomicina). Além de nossos achados, outros estudos já vem provocando essa discussão, considerando a necessidade de avaliação da susceptibilidade a níveis elevados de amicacina e de canamicina para diagnóstico e como estratégia de rastreamento de amostras HLR (CAKIRLAR; TORUN, 2014; CELIK PENA et al., 2013; LI ; WANG, 2014).

Considerando a resistência aos aminoglicosídeos como um importante marcador que tem se mantido ao longo de décadas proporcionando vantagens seletivas a esses

microrganismos, foi também objetivo deste estudo avaliar as taxas de co-resistência a outras classes de antimicrobianos em amostras de *E. faecalis* HLAR.

Nesse estudo observamos elevada correlação de HLAR com a resistência aos antimicrobianos da classe das quinolonas. Em enterococos as quinolonas apresentam atividade fraca ou moderada e o uso desses antimicrobianos costuma ser restrita as infecções de trato urinário (ITUs) (PETERSON et al., 2008; TALAN et al., 2004). Das 306 amostras avaliadas neste estudo, foi observada uma frequência elevada de amostras isoladas de urina resistente a ciprofloxacina (80,0%), norfloxacina 68,1% e levofloxacina 57,8%. Também, um elevado percentual de amostras oriundas de cateter foi não susceptível a ciprofloxacina; enquanto que, uma frequência elevada de amostras oriundas de fezes (culturas de vigilância) foram não suscetíveis as três quinolonas testadas.

O monitoramento da resistência as quinolonas em enterococos é fundamental considerando-se, por exemplo, que estes microrganismos são responsabilizados por aproximadamente 15% das ITUs decorrentes do uso de cateter, já tendo sido relacionado como o segundo ou terceiro patógeno em frequência nessas infecções em diferentes regiões do mundo, como nos EUA (GUPTA et al., 2014; SIEVERT et al., 2013), Japão (LEE et al., 2013; MATSUMOTO et al., 2011), países europeus (Francesco et al., 2007). e em países africanos (EKWEALOR et al., 2016; MOTAMEDIFAR et al., 2015; YILMAZ et al., 2016). Além disso, o estudo de Horsley et al. (2013) demonstrou que *E. faecalis* é altamente competente para invadir o epitélio urinário e pode estar associado também a quadros crônicos.

A resistência a fluoroquinolonas em *Enterococcus* foi relacionada a eventos de mutação nas *quinolone resistance-determining regions* (QRDR, em português: regiões determinantes da resistência às quinolonas) nos genes *gyrA* e *gyrB*, que codificam para subunidade A e B da DNA girase, e *parC* e *parE* para as subunidades da topoisomerase IV que são enzimas tetraméricas (A₂B₂) que catalisam o superenovelamento negativo do DNA, essencial para o início da transcrição e condensação do cromossomo (DE LASTOURS et al., 2017; YASUFUKU et al., 2011). Outros mecanismos associados à resistência a quinolonas incluem a ação de enzimas modificadoras e bombas de efluxo mediadas por plasmídeos. Porém, não existem relatos quanto à resistência a quinolonas em enterococos via presença de enzimas modificadoras, e são raros os estudos que identificaram a ação de bombas de efluxo nesses microrganismos (JACOBY; STRAHILEVITZ; HOOPER, 2014; LI; WANG, 2014; RUIZ et al., 2012).

Neste estudo foi observado que as amostras oriundas de urina apresentaram taxas de não susceptibilidade mais elevadas para ciprofloxacina, se comparado a norfloxacina e

levofloxacina. Estudos anteriores corroboram esses achados, reportando valores diferentes na frequência de amostras não susceptíveis para diferentes antimicrobianos da classe das quinolonas (LEE, 2013).

Devido à elevada frequência de amostras de enterococos resistentes as quinolonas, antimicrobianos como nitrofurantoína e fosfomicina têm sido sugeridos como alternativas terapêuticas (KEATING, 2013). De fato foi observado um baixo percentual de amostras não susceptíveis a estes antimicrobianos entre as amostras de *E. faecalis* HLAR obtidas de urina (0,7% para nitrofurantoína; e 7,4% para fosfomicina). Estes dados estão de acordo com outros estudos que têm divulgado a baixa frequência de amostras de *E. faecalis* não susceptíveis a estes antimicrobianos (AL-TAFIQ; ANANI, 2009; EKWEALOR et al., 2016; FANG et al., 2015; KAFILI; ASHRAF, 2015; KHOSHBAKHT et al., 2013; SHIGAL et al., 2014; TAYEBI et al., 2014; WANG et al., 2015)

Foi registrada uma frequência de 13,4% e de 12,1% das amostras de *E. faecalis* HLAR apresentando resistência concomitante para vancomicina e teicoplanina, respectivamente. A análise dos genótipos associados aos fenótipos de não susceptibilidade aos glicopeptídeos revelou que 38 amostras eram portadoras de *vanA* e quatro de *vanB*. Foi identificada uma amostra que apresentou incongruência entre fenótipo e genótipo de resistência aos glicopeptídeos. Esses casos são comuns na literatura e parecem estar associados à diversidade encontrada no elemento móvel que carrega o conjunto gênico responsável pela expressão de *vanA* – o Tn1546. Estas são normalmente decorrentes da presença de elementos de inserção, deleções e mutações, que alteram a apresentação do fenótipo (CHA et al., 2013; LÓPEZ et al., 2012; SANTOS, 2014; SONG et al., 2013).

As amostras VREfa portadoras do genótipo *vanA* foram oriundas de espécimes clínicos sugestivos de quadros infecciosos (abscessos e outras secreções purulentas, ferida, líquido, sangue e secreção respiratória) e de colonização (fezes / culturas de vigilância). Enquanto que, as amostras portadoras do genótipo *vanB* foram obtidas de líquido e de secreção respiratória. Essas amostras foram obtidas de diversas instituições hospitalares (*vanA*: C, D, H, J e L; e *vanB*: B, F e I). A elevada capacidade de dispersão de amostras VRE é amplamente conhecida (DUCKRO et al., 2005; ESCAUT et al., 2013; NOLAN et al., 2009, VAGNEROVA et al., 2009), bem como os prejuízos decorrentes da presença e manutenção desses microrganismos como colonizadores do trato gastrointestinal de pacientes hospitalizados. Também foi identificado que as amostras do genótipo *vanA* na mesma instituição hospitalar foram isoladas de diferentes origens clínicas, ano e pacientes.

Foi observado que as taxas de não susceptibilidade a penicilina não foram acompanhadas pelas determinadas para o outro beta-lactâmico avaliado – ampicilina. Esses dados reforçam que a susceptibilidade a ampicilina não é preditiva para os todos antimicrobianos beta-lactâmicos. Atualmente, de acordo com critérios internacionalmente aceitos (CLSI, 2016; EUCAST, 2016) a susceptibilidade à ampicilina é preditiva para amoxicilina, piperacilina e imipenem. Além disso cabe alertar que para espécie de *E. faecalis* a previsão de resistências aos beta-lactâmicos por ampicilina não ocorre como observado na espécie de *E. faecium*.

Apesar da resistência aos beta-lactâmicos ainda ser incomum em *E. faecalis*, estudos relataram a presença de resistência à penicilina emergindo nessas amostras No Brasil, estudos apontaram surtos de *E. faecalis* apresentando resistência a penicilina (CONCEIÇÃO et al., 2014; INFANTE et al., 2016) e anteriormente, outros países também apresentam esse relato (GUARDABASSI et al. 2010; METZIDIE et al., 2005; TAN; NG; TAN, 2014).

A resistência aos beta-lactâmicos em *E. faecalis* foi relatada primeiramente associada a produção de beta-lactamases, mas a resistência pela produção desta enzima codificada pelo gene *blaz* nesse grupo ainda é rara (JUNGERMANN et al., 2011; KUCH et al, 2012). A resistência aos beta-lactâmicos tem sido associada principalmente a alterações na *pbp5* e *pbp4* (HIRAGA et al., 2008; HOLLENBECK; RICE, 2012). Para *E. faecalis* a alteração na *ppb4* tem sido associada a maior parte dos casos de resistência nesta espécie (ONO et al., 2005; INFANTE et al., 2016; CONCEIÇÃO et al., 2014). Apenas uma amostra, das 306 avaliadas neste estudo, apresentou um fraco positivo tardio para o teste de atividade de beta-lactamase, o que sinaliza que a resistência nessas amostras possa ser principalmente decorrente das alterações na *ppb4* como relatado nos outros estudos da literatura.

Foi identificada uma maior prevalência de amostras exibindo resistência concomitante a penicilina e a vancomicina (78,6%), do que amostras penicilina/resistentes-vancomicina/sensíveis (9,5%). Além disso, a resistência à penicilina em *E. faecalis* já foi relacionada a HLR para gentamicina (CONCEIÇÃO et al., 2012; GUARDABASSI et al., 2010; METZIDIE et al., 2005). Essa relação pode ser claramente observada neste estudo, onde taxas mais elevadas de resistência a penicilina estão associadas a amostras HLR-GS (63,8%) e HLR-G (29,3%), e não HLR-S (6,9%).

A emergência de fenótipos de resistência aos aminoglicosídeos, beta-lactâmicos e glicopeptídeos traz uma relevante preocupação quanto a redução das opções terapêuticas contra a principal espécie de *Enterococcus* associada a quadros infecciosos. Particularmente, considerando a limitação a esse trio de antimicrobianos. Para *E. faecium*, a segunda espécie

mais frequente nas enterococcias, foi observado que o aumento da resistência a ampicilina, seguido do aumento da resistência aos glicopeptídeos e altas taxas de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos cooperaram para instalação e disseminação de amostras mais adaptadas ao ambiente hospitalar e determinando consideráveis limitações ao tratamento das infecções decorrentes (BILLINGTON et al., 2014; BILLSTRÖM et al., 2010; GALLOWAY-PEÑA et al., 2011; TACCONELLI; CATALDO, 2008, vAN SCHAİK et al., 2010).

A comparação das amostras resistentes a vancomicina *versus* sensíveis, revelou que as amostras VREfa apresentaram uma maior taxa de não susceptibilidade aos aminoglicosídeos em relação as amostras VSEfa. Outros estudos já sinalizaram a elevada taxa de resistência à gentamicina na população de amostras VREfa (METZIDIE et al., 2005; GUARDABASSI et al., 2010). O maior percentual de resistência a penicilina em VREfa, pode sugerir que este fenótipo esteja sendo selecionado nas instituições hospitalares do estado do Rio de Janeiro, decorrente do uso de vancomicina. Tem sido considerado que, de maneira curiosa, à emergência de resistência aos beta-lactâmicos em amostras de *E. faecalis* ocorre após a emergência de resistência a vancomicina, diferentemente do descrito para espécie de *E. faecium* onde a resistência a vancomicina emergiu após a dos beta-lactâmicos (BILLINGTON et al., 2014; BILLSTRÖM et al., 2010; EDELSBERG et al., 2014, VAN SCHAİK et al., 2010).

Nas amostras VREfa foram encontradas taxas maiores de não susceptibilidade as fluoroquinolonas do que encontradas em VSEfa. Além disso, observamos também baixo percentual de não susceptibilidade a fosfomicina nas amostras VSEfa (5,3%) e todas das amostras VREfa sensíveis. Para nitrofurantoína, também foi encontrado baixíssimo percentual de não susceptibilidade e associado apenas as amostras VSEfa (1,1%). Para cloranfenicol observamos um percentual alto de não susceptibilidade nas amostras VSEfa e VREfa, 53,7% e 40,2% respectivamente. Estudos da década de 90 investigaram o cloranfenicol como uma opção para o tratamento de infecções por amostras resistentes á vancomicina (NORRIS et al., 1995; MOELLERING, 1996; LAUTENBACH et al., 1998). Esses estudos observaram que o tratamento com cloranfenicol apresentou respostas clínicas favoráveis, com erradicação do microrganismos e sem maiores efeitos colaterais ao pacientes. Contudo, nos dados apontam já taxas altas de resistência ao cloranfenicol em amostras VREfa.

Ao longo do período desse estudo observamos que a taxa de não susceptibilidade a eritromicina se manteve a mais alta e constante. Para tetraciclina também observamos percentuais elevados de não susceptibilidade ao logo de todo estudo, com taxa de 100% para cateter e ferida. Taxas elevadas de não susceptibilidade a eritromicina e tetraciclina têm sido

reportadas, sendo altamente correlacionadas a amostras HLRA (ABAMECHA; WONDAFRASH; ABDISSA, 2015; BEHNOOD et al., 2013; CELIK; CAKIRLAR; TORUN, 2014; JIA; LI; WANG, 2014; EMANEINI et al., 2016). Também foi identificada uma frequência considerável de amostras não susceptíveis a rifampicina, que se mostrou muito menos elevada em amostras VREfa 2,4%, do que VSEfa (43,6%). Rifampicina já tem sido considerada uma das opções para terapias sinérgicas nas amostras resistentes à vancomicina (CUNHA et al., 2006; HINDLER et al., 2015). Em relação à linezolida, todas as 306 amostras de *E. faecalis* HLAR foram sensíveis. Porém amostras brasileiras isoladas em instituições hospitalares do sul e sudeste do Brasil já demonstraram resistência a este antimicrobiano (DE ALMEIDA et al., 2014; DO PRADO et al., 2016).

A espécie *E. faecalis* tem sido relatada como a que alberga o maior número de determinantes de virulência, no gênero *Enterococcus* (BANERJEE; SHAMPA, 2015; HEE et al., 2012; PADMASINI et al., 2014; SHARIFI et al., 2012; STRATEVA et al., 2016). Os genes *efaA*, *eep*, *gelE*, *ace*, *asal* e *agg* foram encontrados em percentuais elevados; enquanto que, *cylA* e *esp* foram menos frequentes. Entretanto, nenhuma das 306 amostras de *E. faecalis* apresentou produtos de amplificação por PCR compatível com o gene *hyl*. De fato, esses dados estão de acordo com o relatado por Pena et al. (2013), que também avaliaram amostras isoladas em nosso país, no estado de São Paulo. As únicas diferenças resultam das taxas de *esp*, que se mostraram mais elevadas (73,7%) do que as observadas neste estudo; enquanto que o inverso foi identificado em relação a *cyl* (amostras do Rio de Janeiro, 55,2%; amostras de São Paulo, 47,4%; PENA et al., 2013).

O alto percentual de *efaA*, *eep*, *gelE*, *ace*, *asal* e *agg* e moderado para *cylA* e *esp* observado em neste estudo sugere uma abrangente circulação desses fatores em amostras clínicas de *E. faecalis* HLRA. Comparando-se individualmente os genes de virulência avaliados pode-se observar que *efaA*, *eep* e *gelE* apresentaram distribuição homogênea entre as três categorias de HLAR. Apenas uma amostra não apresentou produto de amplificação para *eep* e *efaA* e 95,1% das amostras foram positivas para *gelE*, indicando uma alta correlação desses três genes com *E. faecalis* HLAR oriundos de pacientes hospitalizados. A presença destes três genes em amostras de origem hospitalar e em frequência elevada, também já foi relatada por outros autores (KAFIL et al., 2013; QUIÑONES; KOBAYASHI; NAGASHIMA, 2009; STRATEVA et al., 2016).

A frequência de *agg* e *asal* foi diferente neste estudo. Apesar de ambos estarem envolvidos na expressão da substância de agregação, já foi identificado que estes genes

podem estar circulando em plasmídios distintos, resultando em frequências diversas (CHUANG et al., 2009; RAVEN et al., 2016).

Em geral, neste estudo o gene *cylA* foi mais frequente entre amostras HLR-GS; enquanto que, *esp* apresentou taxas mais elevadas em HLR-S e *ace* em HLR-GS e também HLR-S. De fato, perfis apresentando um maior número de genes de virulência concomitantes foram mais relacionados as amostras HLR-GS, retratando uma maior circulação de atributos de virulência em amostras que albergam resistência a níveis elevados de ambos aminoglicosídeos.

Não foram observadas associações estritas entre genes de virulência e espécime clínico de origem. Foram observadas apenas diferenças na distribuição dos genes *cylA* e *esp*. O gene *cylA* apresentou uma maior frequência entre as amostras oriundas de secreção respiratória, de fezes e de sangue. Já foi observado que a citolisina quando expressa por amostras associadas ao trato gastrointestinal pode contribuir para o desenvolvimento de peritonites espontâneas, devido à facilitação à translocação do epitélio intestinal. Adicionalmente, a presença de citolisina também favorece a proliferação desses microrganismos na corrente sanguínea, por demonstrar atividade lítica contra macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, permitindo uma maior eficiência na evasão do sistema imune (ARDUINO; MURRAY; RAKITA, 1994; GENTRY-WEEKS et al., 1994; HUYCKE; SAHM; GILMORE, 1998; MIYAZAKI et al., 1993; WELLS et al., 1990). O gene *esp* apresentou maior frequência em amostras originárias de cateter e líquido e em menor frequência em amostras de fezes. O gene *esp* tem sido apontado como importante fator de virulência relacionado que favorece a formação de biofilmes (GARG; MOHAN; TANEJA, 2017; KRISTICH et al., 2004; MOHAMED; MURRAY, 2005; TENDOLKAR et al., 2004).

Entretanto, um elevado percentual de amostras de *E. faecalis* HLRAR avaliadas neste estudo demonstraram um considerável conteúdo de genes de virulência que apontam para a ampla circulação desses elementos que apresentam potencial para contribuir para uma maior versatilidade e capacidade de causar doenças dessa espécie.

De qualquer forma, esses fatores de virulência têm sido destacados como fatores importantes na promoção de infecções graves, como a endocardite. A endocardite enterocócica é determinada pela formação de biofilmes em válvulas cardíacas. Várias proteínas de enterococos são associadas à formação dessas estruturas, principalmente: Ace (SINGH et al., 2010), gelatinase (THURLOW et al., 2010), a protease Eep (FRANK et al., 2012) e a substância de agregação (CHUANG-SMITH et al., 2010).

A comparação da circulação dos genes de virulência entre as amostras VSEfa e VREfa revelou que, perfis formados por sete genes foram os mais frequentes nos dois grupos e que em VSEfa foi observado uma maior frequência de amostras apresentando perfis constituídos de oito genes de virulência. Esses resultados sugerem que a distribuição da quantidade de genes de virulência não teve relação direta com a resistência à vancomicina. Em estudo recente, avaliando situações semelhantes, os autores sugeriram que a aquisição da resistência à vancomicina possa ter influenciado a perda de traços de virulência (BANERJEE; SHAMPA, 2015).

A análise das amostras de *E. faecalis* por metodologias de PFGE e MLST revelou uma elevada diversidade. Estudos anteriores relataram que a variabilidade genética de *E. faecalis* é maior do que o que tem sido observado para a espécie *E. faecium*. Esta última apresenta complexos clonais bem definidos, como o anteriormente referido de CC17, que atualmente é designado pelas linhagens ST17, ST18 e ST78, fortemente relacionado a amostras de origem hospitalar e de distribuição global (ANDERSON et al., 2015; GOLINSKA et al., 2013; YANG et al., 2015).

As 300 amostras avaliadas por PFGE nesse estudo foram distribuídas em 36 grupos. Destes, amostras HLR-G fizeram parte de 20 grupos, HLR-S de 24 grupos e HLR-GS de 23 grupos. Com relação às amostras HLR-G, os grupos GP8, GP3 e GP5 foram prevalentes; GP1, GP8, GP16, GP3 e GP19 foram prevalentes para HLR-GS; e GP22, GP2 e GP24 para HLR-S. A análise de MLST revelou 17 STs associados a amostras clínicas de *E. faecalis* com características de HLRA, ST2, ST4, ST6, ST9, ST16, ST21, ST23, ST26, ST30, ST40, ST55, ST97, ST103, ST330, ST626 e dois novos descritos nesse estudo, ST769 e ST770. O ST6, ST21, ST4 e novo ST769 foram os mais frequentes.

As amostras de HLR-G foram mais geneticamente relacionadas às HLR-GS do que as HLR-S, de acordo com os resultados observados pela análise de PFGE e MLST. As amostras HLR-G e HLR-GS estiveram associadas principalmente aos ST6, ST4 e ST769, que também foram observados em amostras HLR-S em menor frequência. Porém, as amostras HLR-S estiveram associadas principalmente ao ST21 que foi observado majoritariamente nas amostras HLRS.

Para o genótipo HLR-S observamos um grande grupo de PFGE constituído majoritariamente por este genótipo e relacionado apenas amostras do hospital A, o GP22. Destacamos que o estudo realizado por nosso grupo (CARVALHO, 1998) com amostras de uma instituição hospitalar em comum (hospital A), um grupo de amostras HLR-S isoladas no

período de 1995-1996 também foi identificado. Infelizmente, por limitações inerentes a própria metodologia de PFGE não foi possível traçar uma comparação entre essas amostras.

As amostras pertencentes ao GP22 foram relacionadas ao ST21, que esteve associado principalmente às amostras que apresentaram resistência a estreptomicina. O ST21, também, foi identificado em uma amostra HLR-GS, isolada do hospital H (GP16) e resistente à vancomicina, sinalizando que apesar de não terem sido identificadas amostras VRE no hospital A, os clones circulantes nesse espaço são altamente competentes para tal aquisição, reforçando a necessidade de protocolos de vigilância ativa e contínua.

Situação semelhante foi identificada para ST4, associado ao GP25 e GP24, encontrado em amostras HLR-S do hospital A. Este ST também foi relacionado a amostras HLR-G (GP22) e HLR-GS (GP16) nesta instituição hospitalar, e a HLR-GS (GP16) no hospital F, que também apresentou resistência à vancomicina, reforçando a competência desses STs em adquirir bagagem genética e se disseminar.

Os dados de MLST apontaram para uma ampla diversidade de STs, associados a amostras resistentes a níveis elevados de gentamicina, reunidos em um mesmo grupo de PFGE. Isto já não foi tão evidente em relação as amostras HLR-S.

O estudo de McBride et al. (2007) avaliando a diversidade da população de *E. faecalis* também reportou o encontro de ST4, ST9, ST16 e ST103, relacionados a resistência a gentamicina e a presença do gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*. O estudo de Quiñones, Kobayashi e Nagashima (2009) observaram os ST6 e ST16 correlacionados a resistência a gentamicina, com a presença do gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, aph(2'')*, e o ST21 não correlacionado a resistência a gentamicina, mais albergando o gene *aph(3')-IIIa* que conferem resistência a outros aminoglicosídeos. Fato também observado nesse estudo, o ST21 altamente correlacionado as amostras HLRS e que apresentavam também o gene *aph(3')-IIIa* e *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* associada a resistência a gentamicina no ST6 e ST16. Além disso, outros estudos correlacionaram o ST4 e ST16 a resistência a gentamicina e a circulação do gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ente os STs que apresentem HLRG (WATANABE et al., 2009; FREITAS et al., 2009; MIKALSEN et al., 2015; ZISCHKA et al., 2015). Interessantemente, nós observamos também alta circulação do gene *aph(2'') - Ie*, também associado a resistência a gentamicina, no ST6, ST9, ST40, ST55, ST103. Para o novo ST769 descrito nesse estudo e observado ser SLV do ST103 observamos baixa frequência de circulação, assim como não observamos para ST16 e ST4, ST21, ST23, ST26, ST40 e ST626 observados relacionados a resistência a níveis elevados de gentamicina.

O estudo brasileiro de Penas et al. (2013) observaram o ST2, ST6, ST26, ST30 e ST103 circulando em amostras de infecção hospitalar do Estado de São Paulo e também apresentava resistência à gentamicina a circulação presença do gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')*. O estudo brasileiro no Estado de São Paulo, Conceição et al. (2012) reportou o ST6 também apresentando resistência à gentamicina e o estudo de Merlo, Dabul e Camargo (2015) no Estado de Minas Gerais o ST103. Diferente do exposto no cenário brasileiro, nas amostras de *E. faecalis* HLRA do Estado do Rio de Janeiro apenas o ST2 e ST30 não foram observados relacionados a resistência a gentamicina, mas a estreptomicina e também destacamos circulação do gene *aph(2'') - Ie*, além do *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* na resistência a gentamicina. Outro fato é que somos o primeiro estudo a relatar a alta incidência do ST21 circulante em Estado do Brasil, cujo esteve relacionado majoritariamente a resistência apenas à estreptomicina e a alta circulação dos genes *ant6'-Ia* e *aph(3')-IIIa* e baixa para o gene *ant4'-Ia*. Além disso, observamos outros STs (ST23, ST40, ST55, ST97, ST330 e ST626) circulantes em nosso meio. Desses, os ST23, ST40 e ST97 foram reportados no estudo brasileiro de Penas et al. (2013) associados a amostras de infecções edodônticas e não apresentavam características HLRA.

Em relação à resistência a níveis elevados de estreptomicina, observamos o gene *ant6'-Ia* amplamente associado aos STs, sem restrição a um tipo. Já para os genes *ant6'-Ia* e *ant9'-Ia* observamos correlação com o ST769 nas amostras originárias de fezes e não observados nas amostras originárias de urina, indicando que a colonização do trato intestinal favorece no aumento da bagagem genéticas dessas linhagens. Estudos também reportaram o *ant6'-Ia* circulando nos STs de *E. faecalis* hospitalar (MERLO; DABUL; CAMARGO, 2015). Para as EMAs relacionadas a resistência a outros antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos, o gene *aph(3')-IIIa* foi bem correlacionado ao ST2, ST6, ST21 e ST30 isolados de amostras hospitalar (QUIÑONES, KOBAYASHI; NAGASHIMA, 2009; PENA et al., 2013). Nós observamos o gene *aph(3')-IIIa* frequente nas amostras do ST6, ST21, ST30, ST55, ST97 e ST330 e com baixa frequência em ST4, ST26, ST103 e ST769. Para o gene *ant4'-Ia* observamos frequente em ST769 e baixa frequência em ST6, ST4 e ST21. Interessantemente nos STs que o *ant4'-Ia* se mostrou frequente foi observada a baixa frequência de *aph(3')-IIIa*.

Na origem clínica urina foi observada uma maior diversidade de STs (ST2, ST4, ST6, ST9, ST16, ST21, ST23, ST26, ST30, ST40, ST97, ST103, ST330 e os novos ST769 e ST770), seguido das amostras originárias de sangue, apresentando o ST4, ST6, ST9, ST21 e ST97. As amostras originárias de abscesso e outras secreções purulentas o ST4 e ST6,

secreção abdominal o ST103, líquido ST6, secreção respiratória o ST103 e ST6, fragmento de tecido o ST4 e ST40 e fezes o ST4, ST6, ST626 e o novo ST769. Contudo, destacamos que os ST4, ST6, ST9, ST21, ST97, ST103 e o novo ST769 foram observados associados à diversificada origem clínica, não correlacionada a um tipo específico. Assim como o nosso estudo, o estudo de Quiñones, Kobayashi e Nagashima (2009) não encontram correlação entre a origem clínica de isolamento e a estrutura clonal do *E. faecalis*.

Entretanto alguns STs têm sido destacados como o mais frequentes como observado em nosso estudo. O ST6 foi observado o mais distribuído dentro do período do estudo e o mais frequente em amostras originárias de sangue, fezes, urina e o mais encontrado em diversificada origem clínica. O ST21, ST4 e ST769 apresentaram também ampla distribuição no período do estudo e o ST21 foi observado frequente em amostras originárias de urina e o novo ST769 nas amostras originárias de fezes ao lado do ST6, embora observados associados a outras fontes clínicas. Contudo, dos 17 STs reportados nesse estudo, o ST4, ST6, ST21, ST30 e o novo ST769 foram observados com distribuição intra-hospitalar e interhospitalar.

Esse é o primeiro estudo no Brasil que reporta a alta diversidade por MLST em amostras de *E. faecalis* hospitalar, a diversidade dos STs circulantes em amostras e suas correlações com HLRA. O ST6 tem sido frequentemente relatado em pacientes hospitalizados e da comunidade nos EUA e de muitos países europeus, e mais recentemente na Ásia e América do Sul (Brasil) (RUIZ-GARBAJOSA et al., 2006; FREITAS et al., 2009; SOLHEIM et al., 2011; PENAS et al., 2013; CONCEIÇÃO et al., 2012; YANG et al., 2015) e faz parte de um importante complexo clonal designado de alto risco, o CC2, que além do prevalente ST6 também observamos o ST2 integrante desse complexo. O ST4 também apresenta relato de estar bem disperso mundialmente em amostras hospitalares nos EUA, Europa e Ásia (FREITAS et al., 2009; WATANABE et al., 2009; LIU et al., 2011; GETACHEW et al., 2013; YANG et al., 2015) e o nosso estudo encontrou circulando em nosso meio.

O Novo ST769 foi observado ser um SLV do ST103 com substituição do alelo 35 no locus *gdh* por 15. Os Estudos brasileiro de Penas et al. (2013) e Merlo, Dabul e Camargo (2015) analisando amostras VREfa de origem clínica apontaram o ST103 relacionado com essa população de amostras. Destacamos o ST103 frequente em instituições hospitalares do Brasil e com seu SLV o novo ST769 descrito nesse estudo associado principalmente a amostras de colonização e resistência a vancomicina. Além do Brasil, o ST103 foi apontado circulante nos espaço hospitalar, porém sinalizado circulante na América (MCBRIDE et al., 2007; FREITAS et al., 2009; RAVEN et al., 2015) e fez parte de estudos baseados em WGS para investigar características associadas as população hospitalar de *E. faecalis* (MCBRIDE et

al., 2007; FREITAS et al., 2009; SILVEIRA et al., 2014; HULLAHALLI et al., 2015; RAVEN et al., 2015; BAKSHI et al., 2016).

O ST21 faz parte do CC21 que está entre os três complexo clonal de *E. faecalis* mais disperso mundialmente no espaço hospitalar e também circulando em amostras não hospitalar, isoladas em animais e alimentos (FREITAS et al., 2009; QUIÑONES et al., 2009; LARSEN et al., 2011; JAMET et al., 2012; PALMER et al., 2012; JIMÉNEZ et al., 2013; SONG et al., 2013; NOVAIS et al., 2013; CHOWDHURY et al., 2014; SILVEIRA et al., 2014). Este estudo é o primeiro relato da circulação do ST21 em Estado do Brasil, e evidenciamos estar altamente correlacionado com a disseminação de resistência a estreptomicina no âmbito hospitalar.

Além disso, o ST16, ST23, ST26, ST30, ST40, ST55, ST97, ST330 também tem sido apontado na literatura bem relacionado às amostras hospitalares e associadas à multirresistência e virulência, embora também reportados em amostras animal e alimentos como reservatório de gene de resistência e virulência (RUIZ-GARBAJOSA et al., 2006; SHANKAR et al., 2006; MCBRIDE et al., 2007; KAWALEC et al., 2007; QUIÑONES, KOBAYASHI; NAGASHIMA, 2009; SOLHEIM et al., 2009; LARSEN et al., 2011; HAMMERUM et al., 2012; OLSEN et al., 2012; PALMER et al., 2012; POULSEN et al., 2012; PENAS et al., 2013; WERNER et al., 2013; SILVEIRA et al., 2014; MIKALSEN et al., 2015; ZISCHKA et al., 2015; WOODS et al., 2017). Apenas o ST626 não apresentou reporte na literatura, porém depositado no banco de dados relacionado à amostra isolada de paciente hospitalizado no ano de 2013 de fonte clínica urina também no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Em nosso estudo o ST626 esteve associado a uma amostras do ano de 2009 de fezes e portadora do genótipo *vanA*. Também observamos o ST626 sendo SLV do ST30. Esse dado aponta o ST626 endêmico em hospitais do nosso Estado e expansão do CC30 participando da disseminação da resistência a vancomicina, pois o ST30 foi observado associado à resistência a vancomicina do genótipo *vanA* no Estado de São Paulo no estudo de Pena et al. (2013).

As amostras resistentes à vancomicina foram observadas todas agrupadas por PFGE em seis grupos e estiveram relacionadas aos ST4, ST6, ST21, ST626 e ST769. Destes, os mais frequentes foram o ST6 e o novo ST769 correspondente aos grupos de PFGE GP1 e GP19. O ST6 foi observado tanto o genótipo *vanA* quanto o *vanB*, fato também observado no estudo de McBride et al. (2007), e o ST21, ST626 e o novo ST769 apenas ao genótipo *vanA*. Estudos já reportaram os ST4, ST6 e ST21 associados a amostras resistentes a vancomicina (RUIZ-GARBAJOSA et al., 2006; FREITAS et al., 2009; SUN et al., 2014; MIKALSEN et al., 2015; YANG et al., 2015) e em nosso estudos observamos o ST769 SLV do ST103

apontado no estudo brasileiro relacionado a VREfa (PENAS et al., 2013; MERLO; DABUL; CAMARGO, 2015) e ST626 depositado no banco de dados como amostra isolada em hospital do Estado do Rio de Janeiro e visto nesse estudo associado também a amostras VREfa. Além do ST103, o estudo brasileiro de Penas et al. (2013) também observaram o ST2, ST30 e ST26 correlacionados com amostras VREfa-*vanA* observados em nosso estudo em amostras VSEfa, além do ST6 que também foi visto em nosso estudo relacionado a amostras VREfa.

As amostras resistentes à penicilina estiveram altamente correlacionadas a resistência à vancomicina, sendo então subdivididas em dois grupos: as amostras penicilina-vancomicina resistente e amostras penicilina-resistente vancomicina-sensível. As amostras penicilina-resistente e vancomicina-sensível se apresentaram distribuídas em um maior número de grupos de PFGE, enquanto que as amostras penicilina-vancomicina resistentes em dois principais grupos, GP1 e GP19. No estudo de Conceição et al. (2014) as amostras penicilina-resistente e vancomicina-sensível se mostraram altamente clonais, característica que em nosso estudo foi observada em amostras penicilina-vancomicina resistentes. Sabemos que as amostras que apresentam resistência à vancomicina apresentam como característica a capacidade de transmissão e de causar surtos (AUWERA et al., 1996; BEEZHOLD et al., 1997; HIGUITA; HUYCKE, 2014), o que pode estar atribuindo a clonalidade do grupo penicilina-vancomicina resistente .

Nossos resultados corroboram com a observação de Infante et al. (2016) que sugeriu à emergência da resistência a penicilina em *E. faecalis* ocorra independente de expansão clonal. Entretanto, a ocorrência da resistência à penicilina em amostras com resistência a vancomicina colabora para o aumento da frequência da resistência a penicilina por conferir caráter de expansão clonal detes grupos. A resistência à penicilina associada à vancomicina foi observada nas amostras dos hospitais B, C e L, e as amostras sensíveis à vancomicina nos hospitais A, D e H sinalizando os eventos genéticos que confere resistência à penicilina ter ocorrido em momentos diferentes e de forma independente.

As amostras penicilina-resistente e vancomicina-sensível estiveram associadas principalmente ao grupo de PFGE GP5 e ao ST9, fato observado em outros estudos (MCBRIDE et al., 2007; CONCEIÇÃO et al., 2012). O estudo de Conceição et al. (2012) observou o ST9 associado às amostras de *E. faecalis* penicilina-resistentes vancomicina-sensível no Brasil. Nossos resultados realça o envolvimento do ST9 na difusão da resistência a beta-lactâmicos em *E. faecalis* no Brasil. Entretanto, as amostras sensíveis também foram observadas aos ST97 e ST103 evidenciando a distribuição da resistência à penicilina independente a expansão clonal.

Nas amostras penicilina-vancomicina resistentes com genótipo *vanA* estiveram relacionadas ao ST6. O ST6 também já foi correlacionado a amostras que apresentaram redução da susceptibilidade a penicilina na Dinamarca (GUARDABASSI et al., 2010), só que este fenótipo esteve relacionado a amostras penicilina-resistente e vancomicina-sensível, diferente de nosso estudo que encontrou o ST6 associado a amostras apresentando também a resistência a vancomicina com genótipo *vanA* e *vanB*, fato observado na análise populacional de *E. faecalis* nos estudo de McBride et al. (2007). O estudo de Guardabassi et al. (2010) também observaram às amostras do ST6 apresentando resistência a gentamicina, também observado em nosso estudo. Esses resultados apontam que o ST6 tem adquirindo cada vez mais mecanismos de resistência aos antimicrobianos e se estabelecendo no ambiente hospitalar, consolidando como um dos principais complexo de alto risco em *E. faecalis*.

As amostras penicilina-vancomicina resistentes também estiveram altamente relacionadas ao ST769 descrito no nosso estudo e visto ser SLV do ST103 relacionado a amostras de VREfa no Brasil. Essa observação indica uma emergência da resistência à penicilina em amostras hospitalares estabelecidas em nosso meio. A ocorrência da resistência à penicilina em STs adaptados em nossos hospitais, o ST6, ST9 e ST103 e seu SLV ST769, traz uma preocupação para o estabelecimento dessa resistência nessa espécie como observado para a espécie de *E. faecium*.

O ST6, ST9, ST103 e seu SLV descrito no estudo, ST769 fazem parte dos complexos clonais CC2, CC9 e CC388 respectivamente. CC6 e CC9 são os principais complexos apontados em *E. faecalis* compreendendo linhagens adaptadas ao ambiente hospitalar, dispersos globalmente e designados como complexo de alto risco, também observados frequentes em amostras clínica no Brasil como aponta nosso estudo (RUIZ-GARBAJOSA et al., 2006; KAWALEC et al, 2007; KUCH et al, 2012; GETACHEW et al., 2015). Já o ST103 faz parte do CC388 apontado amplamente distribuído na América (MERLO; DABUL; CAMARGO, 2015). Nossos resultados em conjunto com a literatura nos leva a sugerir que a resistência aos beta-lactâmico tem emergido em clones previamente bem estabelecidos no ambiente hospitalar e a previsão da sensibilidade à penicilina por ampicilina devem ser desconsiderada como medida preventiva para assegurar o sucesso do tratamento dessas infecções.

Não observamos um perfil de virulência associado a um único grupo de PFGE ou ST. Entre os genes de virulência, observamos que os genes *efaA*, *eep*, *ace* e *asa1* foram observados associados aos 17 STs observado nesse estudo. O gene *geIE* foi associado a 15 STs, não observado apenas no ST16 e ST626. O gene *agg* em 14 STs, não observado para

ST16, ST30 e o novo ST770. Esses resultados apontam que o gene *asa1* encontra mais distribuídos que o *agg*, onde o *asa1* foi observado em ST16, ST30 e o novo ST770. O gene *cylA* foi observamos em 11 STs e o *esp* apresentaram menor circulação nos STs, observado circulando em 8 STs desse estudo.

Além dos genes *eeP* e *efaA*; o gene *gelE* observamos maior correlação com os STs e CCs observado nesse estudo, correlacionado a CC2, CC21, CC388, CC30, ST4, ST9, ST40, ST97 e ST330. Para os genes que codifica para adesinas, o gene *asa1* apresentou maior correlação com os STs do estudo, correlacionado ao CC2, CC388, ST4, ST9, ST26, ST55, ST97, ST330 e ST21. O gene *agg*, ao CC2, CC388, ST4, ST9, ST26, ST55, ST97 e ST330. O gene *ace*, correlacionado a CC2, CC388, ST4, ST9, ST26, ST55, ST97 e ST330. O gene *esp* se mostrou correlacionado apenas ao ST21 e não ao CC21, e ao ST26 e ST40. De forma interessante, o gene *ace* e *agg* não foram observados correlacionados com ST21 e ST40, acreditamos que a correlação destes STs com *esp* esteja relacionado à menor circulação de adesinas nesses STs.

O estudo de Quiñones; Kobayashi; Nagashima (2009) diferentemente dos nossos resultados, observou o gene *esp* amplamente distribuído entre os STs, incluindo o ST21. Porém, outros estudos apontaram alta correlação de *esp* com ST40 (SHANKAR et al., 2006; KAWALEC et al., 2007; MIKALSEN et al., 2015; ZISCHKA et al., 2015). Em um estudo recente (MERLO; DABUL; CAMARGO, 2015) *agg* e *gelE* foram observados como principais fatores de virulência relacionados ao ST103. Em parte, esses dados estão de acordo com nosso estudo, que identificou esses genes associados ao CC388, que agrupa ST103.

O gene *cylA* apresentou correlação com CC2, constituído pelos os ST6 e ST2, e para o ST4, ST9, ST103. Estudos anteriores já vincularam a circulação de *cylA* principalmente por CC2 (FREITAS et al., 2009; PENA et al., 2013). Todavia, o estudo de Quiñones; Kobayashi; Nagashima (2009), também, encontram associaçãodesse gene com outros STs não pertencentes ao CC2 (ST64 e ST16). Apesar de em nosso estudo não ter sido identificado *cylA* na amostra ST16, nossos dados também apontam amostras classificadas não pertencentes a este complexo e portadoras deste gene.

Apesar de termos encontrado associação entre alguns genes de virulência e STs, acreditamos que, diante da ampla variabilidade destes determinantes de virulência por diferentes STs, o principal mecanismo de dispersão esteja associado à transferência lateral de gene.

Em um estudo de Palmer et al. (2012) os autores demonstraram, por análise genômica comparativa de 18 genomas de *E. faecalis*, que elementos genéticos móveis presentes em

múltiplas linhagens de *E. faecalis* correspondem a uma fonte importante de diversidade nesses microrganismos.

Os resultados deste estudo indicam uma dominância do ST6, que foi observado distribuído ao longo de todo período do estudo (2005 a 2013) e associado a amostras com características de resistência a níveis elevados de gentamicina. Além deste, destacou-se também o ST103, que indicou um período de expansão clonal desde o ano de 2005, com a ampliação de sua linhagem, pelo SLV ST769, que foi descrito neste estudo. O estudo de Merlo; Dabul; Camargo (2015) avaliando amostras de hospitais do estado de Minas Gerais, isoladas no período de 2009 a 2010, identificou o ST103 associado a um grande grupo clonal de PFGE composto por amostras VREfa, corroborando para nossa hipótese.

Por outro lado, os resultados deste estudo sugerem que a resistência à vancomicina, encontrada em ST769, que é SLV de ST103, ocorreu por expansão clonal, e todas as amostras foram reunidas em um mesmo grupo de PFGE (GP19). ST103 tem sido apontado como um dos mais difundidos no continente americano (KAWALEC et al., 2007; NOVAIS et al., 2004; QUIÑONES et al., 2005; RAVEN et al., 2015).

Outro fato que nos chamou atenção, em nossos resultados, é o ST4 observado a partir de 2007 e principalmente associado às amostras do ano de 2013, onde não foi mais identificado o ST6. Este fato sugere que o ST4 esteja ganhando espaço no nincho ainda ocupado, no período avaliado, por ST6, o que pode ter representado uma etapa imediatamente anterior à substituição do clone considerado prevalente entre amostras expressando resistência a níveis elevados de gentamicina. Além disso, ST4 demonstrou tendência a aumentar em prevalência na maioria dos hospitais avaliados, podendo vir a tornar o ST prevalente em nosso meio, em relação a amostras resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeo, incluindo entre STs relacionados à resistência à estreptomicina, como ST21. O ST4 também foi observado em amostras VREfa o que corrobora para o aumento em frequência em nosso meio. Em países da Ásia este ST tem sido apontado dominante nas amostras de VREfa, com relatos raros de ST6 (GETACHEW et al., 2013; YANG et al., 2015; WATANABE et al., 2009).

Apesar das recentes descobertas a cerca dos aspectos evolutivos das principais espécies de *Enterococcus* associadas às infecções humanas, a estrutura populacional de *E. faecalis* ainda não está claramente definida. Nos últimos anos, a constante adição de novas informações tem esclarecido muitos dos aspectos relacionados à evolução de linhagens específicas. Porém, em certas situações, estas têm se mostrado conflitantes.

Assim sendo, o grande motivador deste estudo foi considerar a necessidade de avaliar, nesse contexto, as características relacionadas às amostras circulantes em nosso meio, pela

investigação dos parâmetros que contribuem para especialização de algumas linhagens de *E. faecalis* ao ambiente hospitalar, particularmente a presença de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos. Análises relativas à avaliação do papel do fluxo gênico na evolução de certas linhagens bacterianas, particularmente as multirresistentes e de maior virulência, tem-se mostrado de extrema relevância científica, por agregar conhecimento quanto à existência, distribuição e dinâmica da emergência desses microrganismos. Esses fatos são ainda de maior interesse, quando tais situações são consideradas em ambientes peculiares, como o hospitalar.

CONCLUSÕES

Este estudo identificou a distribuição da característica de HLRA, entre as amostras analisadas de *E. faecalis*, disperso por diferentes Instituições de Saúde do Estado do Rio de Janeiro e vinculadas a clones apresentando uma multiplicidade de características de virulência e resistência antimicrobiana, habilitado para a conquista e estabelecimento nesse ambiente. A ocorrência da circulação da resistência à gentamicina associada principalmente ao gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* que codifica para uma enzima bifuncional que confere resistência a todos antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos, com exceção da estreptomicina, que ocorreu principalmente associada ao gene *ant6'-Ia*.

Além dos genótipos associados à resistência elevada à gentamicina e estreptomicina, observamos o gene *aph(3')-IIIa* com ampla distribuição em nossas instituições hospitalares, com frequência aumentada e observado em diversificada origem clínica, o que corrobora para alta prevalência de resistência a outros aminoglicosídeos, além da gentamicina e estreptomicina em nosso meio. Também destacamos a maior diversidade de genes relacionados à característica de HLRA em amostras de fezes inerente de o trato gastrointestinal ser ambiente propício para a troca genética.

A grande abundância de genes de virulência e de resistência aos antimicrobianos contribui significativamente para o sucesso de *E. faecalis* como agente etiológico de infecções hospitalares, principalmente aquelas mais difíceis de serem tratadas e com alto índice de morbidade, como as ocasionadas por amostras HLRA. A diversidade e distribuição de *E. faecalis* HLRA, distribuída entre clones adaptados ao espaço hospitalar, principalmente aos ST6 (CC2), ST4 (CC4) e ST21 (CC21) descritos como de alto risco, e o ganho de resistência à penicilina e vancomicina por estes clones, tem os tornando cada vez mais adaptados e especializados. Além disto, ressaltamos para emergência do CC388, com a identificação da expansão clonal do ST103 em nosso meio, com seu SLV ST769, descrito neste estudo, com importante participação de dispersão de característica de HLRA, como HLR-G e HLR-GS, e também resistência à vancomicina e penicilina.

A presença de amostras HLRA-VREfa e associadas a amostras VSEfa-HLRA já adaptadas ao ambiente hospitalar, ressaltando para a vigilância contínua e implementação de medidas eficientes que combatam este microrganismo do ambiente hospitalar, que podem facilitar a emergência de amostras resistentes à vancomicina que configuram um problema de saúde ainda mais grave. A resistência à vancomicina em nosso meio esteve associada à

disseminação principalmente do elemento VanA de forma clonal e por transferência horizontal nas amostras VREfa do Estado do Rio de Janeiro, com a participação do genótipo *vanB* em amostras provenientes de quadros infecciosos.

Em *E. faecalis* a menor participação do gene *esp* e o aumento em frequência da resistência a penicilina, após o período de emergência à vancomicina, além de uma maior abundância de adesinas que contribuíram para maior envolvimento de linhagens de *E. faecalis* na conquista do espaço hospitalar como patógeno oportunista, são passos diferentes do ocorrido no processo adaptativo de *E. faecium*, respondendo em parte pela diferença em aspectos de diversidade quanto ao número de linhagens associadas as amostras hospitalares nessas principais espécies responsáveis por processos infecciosos em humanos.

REFERÊNCIAS

- 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.
- AANENSEN, D.M.; SPRATT, B. G. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res*, v. 33, n. suppl 2, p. W728-W733, 2005.7
- AARESTRUP, F. M.; BAGER, F.; ANDERSON JS. Association between the use of avilamycin for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers and pigs. Epidemiological study and changes over time. *Microb Drug Resist*, v. 6, n. 1, p. 71-75, 2000.
- ABAMECHA, A.; WONDAFRASH B.; ABDISSA, A. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* species isolated from intestinal tracts of hospitalized patients in Jimma, Ethiopia. *BMC Res Notes*, v. 8, n. 1, p. 213, 2015.
- ABELE-HORN, M. et al. Molecular epidemiology of hospital-acquired vancomycin-resistant Enterococci. *J Clin Microbiol*, v. 44, n. 11, p. 4009-4013, 2006.
- ADAM, H. J. et al. Canadian Antimicrobial Resistance Alliance (CARA). Prevalence of antimicrobial resistant pathogens from blood cultures from Canadian hospitals: results of the CANWARD 2007-2009 study. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 69, n. 3, p. 307-313, 2011.
- AGARWAL, J.; KALYAN, R.; SINGH, M. High-level aminoglycoside resistance and beta-lactamase production in enterococci at a tertiary care hospital in India. *Jpn J Infect Dis*, v. 62, p. 158-159, 2009.
- AGUDELO HIGUITA, N. I.; HUYCKE, M. M. Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. In: GILMORE, M. S. et al. (org.). *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190429/>. Acesso em: 25 mar de 2016.
- ALBUQUERQUE, V. S. *Enterococcus* resistentes a níveis elevados de gentamicina (HLGR): caracterização fenotípica, detecção de genes de resistência e diversidade genética. 2001. 127 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.
- ALDRED K. J.; KERNS R. J.; OSHEROFF N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochem*, v. 53, n. 10, p. 1565-1574, 2014.
- AL-TAWFIQ, J. A.; ANANI, A. A. Antimicrobial susceptibility pattern of bacterial pathogens causing urinary tract infections in a Saudi Arabian hospital. *Chemother*, v. 55, n. 2, p. 127-131, 2009.

ALTUN, S. et al. Daptomycin and tigecycline susceptibility of vancomycin resistant enterococci isolated from rectal swab cultures. *J Microbiol Infect Dis*, v. 4, n. 03, 2014.

ANDERSON, A. C. et al. *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation. *Front Microbiol*, v. 6, p. 1534, 2015.

ANDERSON, V. R; PERRY C. M. Levofloxacin: a review of its use as a high-dose, short-course treatment for bacterial infection. *Drugs*; v. 68, n. 4, p. 535-565, 2008.

ANGELETTI, S. et al. Routine molecular identification of enterococci by gene-specific PCR and 16S ribosomal DNA sequencing. *J Clin Microbiol*, v. 39, n. 2, p. 794-797, 2001.

ANTHONY, B. et al. Clinical and microbiological outcomes of serious infections with multidrug-resistant gram-negative organisms treated with tigecycline. *Clin Infect Dis*, v. 46, n. 4, p. 567-570, 2008.

ARDUINO, R. C.; MURRAY, B. E.; RAKITA, R. M. Roles of antibodies and complement in phagocytic killing of enterococci. *Infect Immun*, v. 62, n. 3, p. 987-993, 1994.

ARRHIN, F. F. et al. Comparative in vitro activity of oritavancin Against *Staphylococcus aureus* strains that are resistant, intermediate or heteroresistant to vancomycin. *J Antimicrob Chemother*, v. 64, n. 4, p. 868-870, 2009.

ARIAS C. A. et al. Evaluation of ceftobiprole medocaril against *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *J Antimicrob Chemother*, v. 60, n. 3, p. 594-598, 2007.

ARIAS, C. A. et al. Time-kill and synergism studies of ceftobiprole against *Enterococcus faecalis*, including beta-lactamase-producing and vancomycin-resistant isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 51, n. 6, p. 2043-2047, 2007.

ARIAS, C. A. et al. Failure of daptomycin mono-therapy for endocarditis caused by an *Enterococcus faecium* strain with vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible subpopulations and evidence of in vivo loss of the *vanA* gene cluster. *Clin Infect Dis*, v. 45, n. 10, p. 1343-1346, 2007.

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.

ARIAS, C. A. et al. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect*, v. 16, n. 6, p. 555-562, 2010.

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

ARSÈNE, S.; LECLERCQ, R. Role of a *qnr*-like gene in the intrinsic resistance of *Enterococcus faecalis* to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 51, n. 9, p. 3254-3258, 2007.

ARSLAN, H. et al. Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. *J Antimicrob Chemother*, v. 56, n. 5, p. 914-918, 2005.

ARTHUR, M. et al. Moderate-level resistance to glycopeptide LY333328 mediated by genes of the *vanA* and *vanB* clusters in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 43, n. 8, p. 1875-1880, 1999.

ARTHUR, M.; MOLINAS, C.; COURVALIN, P. The VanS–VanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol*, v. 174, n. 8, p. 2582-2591, 1992.

AUCKLAND, C. et al. Linezolid-resistant enterococci: report of the first isolates in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother*, v. 50, n. 5, p. 743-746, 2002.

AZEVEDO, M. E. F. *Identificação de Enterococcus spp. e Avaliação da Ocorrência de Genes de Resistência à Vancomicina em Amostras de Pacientes de Hospitais de Manaus, AM*. 2013. 111 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2013.

BADEN, L. R. et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci repopulating the gastrointestinal tract following treatment with a novel glycolipodepsipeptide, ramoplanin. *J Clin Microbiol*, v. 40, n. 4, p. 1160-1163, 2002.

BADEN, L. R. et al. Prolonged colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in long-term care patients and the significance of "clearance". *Clin Infect Dis*, v. 33, n. 10, p. 1654-1660, 2001.

BAHADIN, J.; TEO, S. S.; MATHEW, S. Aetiology of community-acquired urinary tract infection and antimicrobial susceptibility patterns of uropathogens isolated. *Singapore Med J*, v. 52, n. 6, p. 415-420, 2011.

BAKSHI, U. et al. Assessment of virulence potential of uncharacterized *Enterococcus faecalis* strains using pan genomic approach - Identification of pathogen-specific and habitat-specific genes. *Sci Rep*, v. 6, p. 38648, 2016.

BAL A.M.; KUMAR A.; GOULD I. M. Antibiotic heterogeneity: From concept to practice. *Ann NY Acad Sci*, v. 1213, n. 1, p. 81-91, 2010.

BALDASSARRI, L. Analysis of virulence factors in cases of enterococcal endocarditis. *Clin Microbiol Infect*; v. 10, n. 11, p. 1006-1008, 2004.

BANERJEE, T. et al. Prevalence of virulence factors and drug resistance in clinical isolates of Enterococci: A study from North India. *J Pathog*; v. 2015, p. 692612, 2015.

BARBER, K. E. et al. Evaluation of tedizolid against *Staphylococcus aureus* and enterococci with reduced susceptibility to vancomycin, daptomycin or linezolid. *J. Antimicrob Chemother*, v. 71, n. 1, p. 152-155, 2016.

BARBIER, N. et al. Random amplified polymorphic DNA typing versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol*, v. 34, n. 5, p. 1096-1099, 1996.

BAUREDORF, M.; BARANE, E.; HEDERSTEDT, L. In vitro assembly of catalase. *J Biol Chem*. v. 289, n. 41, p. 28411-28420, 2014.

BAYLAN, O. et al. The relationship between antibiotic resistance and virulence factors in urinary *Enterococcus* isolates. *Mikrobiyol Bul*, v. 45, n. 3, p. 430-445, 2011.

BEABOUT, K. et al. The ribosomal S10 protein is a general target for decreased tigecycline susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 59, n. 9, p. 5561-5566, 2015.

BEARDMORE R. E.; PENA-MILLER R. Rotating antibiotics selects optimally against antibiotic resistance, in theory. *Math Biosci Eng*, v. 7, n. 3, p. 527-552, 2010.

BEARDMORE, R. E.; PENA-MILLER, R. Antibiotic cycling versus mixing: The difficulty of using mathematical models to definitively quantify their relative merits. *Math Biosci Eng*, v. 7, n. 4, p. 923-933, 2010.

BEARDSLEY, J. R. et al. Show me the money: Long-term financial impact of an antimicrobial stewardship program. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 33, n. 04, p. 398-400, 2012.

BEEZHOLD, D. W. et al. Skin colonization with vancomycin-resistant enterococci among hospitalized patients with bacteremia. *Clin Infect Dis*, v. 24, n. 4, p. 704-706, 1997.

BEHNOOD, A. et al. Prevalence of *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* resistance gene and its linkage to Tn5281 in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from Tabriz hospitals. *Iran J Microbiol*, v. 5, n. 3, p. 203, 2013.

BENDER, J. K. et al. Detection of a *cfr(B)* Variant in German *Enterococcus faecium* Clinical Isolates and the Impact on Linezolid Resistance in *Enterococcus* spp. *PLoS ONE*; v. 11, n. 11, p. e0167042, 2016.

BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res*, v. 27, n. 2, p. 573-580, 1999.

BERGSTROM C.T.; LO M.; LIPSITCH M. Ecological theory suggests that antimicrobial cycling will not reduce antimicrobial resistance in hospitals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 101, n. 36, p. 13285-13290, 2004.

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.

BHATTY, M. et al. *Enterococcus faecalis* pCF10-encoded surface proteins PrgA, PrgB (aggregation substance) and PrgC contribute to plasmid transfer, biofilm formation and virulence. *Mol Microbiol*, v. 95, n. 4, p. 660-677, 2015.

BHAVNANI, S. M. et al. A nationwide, multicenter, case-control study comparing risk factors, treatment, and outcome for vancomycin-resistant and -susceptible enterococcal bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 36, n. 3, p. 145-158, 2000.

BIEDENBACH, D. In vitro activity of fidaxomicin (OPT-80) tested against contemporary clinical isolates of *Staphylococcus* spp. and *Enterococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 54, n. 5, p. 2273-2275, 2010.

BIEDENBACH, D. J. et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacterial isolates from the Asia-Pacific region and an in vitro evaluation of the bactericidal activity of daptomycin, vancomycin, and teicoplanin: a SENTRY Program Report (2003-2004). *Int J Antimicrob Agents*, v. 30, n. 2, p. 143-149, 2007.

BIEDENBACH, D. J. In vitro activity of oritavancin and comparator agents against staphylococci, streptococci and enterococci from clinical infections in Europe and North America, 2011-2014. *Int J Antimicrob Agents*, v. 46, n. 6, p. 674-681, 2015.

BIER, M. E. Coupling ESI and MALDI sources to the quadrupole mass filter, quadrupole ion trap, linear quadrupole ion trap, and Orbitrap mass analyzers. In: COLE, R. B. et al. (org.). *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*. 2. ed. New York: Wiley, 2010. p. 263-344.

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.

BILLSTRÖM, H. et al. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents*, v. 32, n. 5, p. 374-377, 2008.

BISWAS, P. P. et al. Molecular Characterization of Virulence Genes in Vancomycin-Resistant and Vancomycin-Sensitive Enterococci. *J Glob Infect Dis*, v. 8, n. 1, p. 16, 2016.

BITTENCOURT DE MARQUES, E.; SUZART, S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. *J Med Microbiol*, v. 53, n. 11, p. 1069-1073, 2004.

BODMANN, K. F. Current guidelines for the treatment of severe pneumonia and sepsis. *Chemother*, v. 51, n. 5, p. 227-233, 2005.

BONTEN, M. J. et al. The role of "colonization pressure" in the spread of vancomycin-resistant enterococci: an important infection control variable. *Arch Intern Med*, v. 158, n. 10, p. 1127-1132, 1998.

BONTEN, M. J.; WILLEMS, R.; WEINSTEIN, R. A. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect Dis*, v. 1, n. 5, p. 314-325, 2001.

BOURDON, N. et al. Changing trends in vancomycin-resistant enterococci in French hospitals, 2001-08. *J Antimicrob Chemother*, v. 66, n. 4, p. 713-721, 2011.

- BOURGEOIS-NICOLAOS, N. et al. The emergence of linezolid resistance among Enterococci in intestinal microbiota of treated patients is unrelated to individual pharmacokinetic characteristics. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 58, n. 5, p. 2681-2687, 2014.
- BOYCE, J. M. et al. Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: possible infection control implications. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 18, n. 09, p. 622-627, 1997.
- BOYD, D. A. et al. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, *vanL*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 52, n. 7, p. 2667-2672, 2008.
- BOYD, D. A. et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* harbouring *vanN* in Canada: a case and complete sequence of pEfm12493 harbouring the *vanN* operon. *J Antimicrob Chemother*, v. 70, n. 7, p. 2163-2165, 2015.
- BRANDL, K. et al. Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. *Nature*, v. 455, n. 7214, p. 804-807, 2008.
- BRAUERS, J. et al. German Linezolid Resistance Study Group (2005) Surveillance of linezolid resistance in Germany, 2001–2002. *Clin Microbiol Infect*, v. 11, n. 1, p. 39-46, 2005.
- 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.
- BURRELL, L. J. Prevalence of colonisation with vancomycin-resistant enterococci (VRE) among haemodialysis outpatients in Victoria: implications for screening. *Med J Aust*, v. 182, n. 9, p. 492, 2005.
- BUTAYE, P.; DEVRIESE, L. A.; HAESEBROUCK, F. Differences in antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from farm and pet animals. *Antimicrob agents Chemother*, v. 45, n. 5, p. 1374-1378, 2001.
- CADENA, J. et al. Antibiotic cycling to decrease bacterial antibiotic resistance: a 5-year experience on a bone marrow transplant unit. *Bone Marrow Transplant*, v. 40, n. 2, p. 151-155, 2007.
- CAI, J. et al. Enterococcal isolates carrying the novel oxazolidinone resistance gene *optrA* from hospitals in Zhejiang, Guangdong, and Henan, China, 2010-2014. *Clin Microbiol Infect Dis*, v. 21, n. 12, p. 1095. e1-1095. e4, 2015.
- CAI, J. et al. High detection rate of the oxazolidinone resistance gene *optrA* in *Enterococcus faecalis* isolated from a Chinese anorectal surgery ward. *Int J Antimicrob Agents*; v. 48, n. 6, p. 757-759, 2016.

CALDERARO, A. et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. *Sci Rep.* v. 4, p. 6803, 2014.

CAMARGO, I. L. B. C. et al. Identification of an unusual VanA element in glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* in Brazil following international transfer of a bone marrow transplant patient. *Can J Microbiol*, v. 50, n. 9, p. 767-770, 2004.

CAMARGO, I. L. et al. Occurrence of insertion sequences within the genomes and Tn1546-like elements of glycopeptide-resistant enterococci isolated in Brazil, and identification of a novel element, ISEfa5. *Int J Med Microbiol*, v. 294, n. 8, p. 513-519, 2005.

CAMARGO, I.; GILMORE, M.; DARINI, A. L. C. Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin resistant and vancomycin sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brazil. *Clin Microbiol Infect*, v. 12, n. 11, p. 1123-1130, 2006.

CAMPOS, P. A. et al. A sustained endemic outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: A 30-month surveillance study. *Scand J Infect Dis*, v. 46, n. 8, p. 547-554, 2014.

CARUGATI, M. et al. High-dose daptomycin therapy for left-sided infective endocarditis: a prospective study from the international collaboration on endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 57, n. 12, p. 6213-6222, 2013.

CARVALHO, M. G. et al. Molecular analysis of *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus gallinarum* isolated from water buffalos with subclinical mastitis. *Adv Experim Med Biol*, v. 418, p. 401-404, 1997.

CARVALHO, M. G. S. Caracterização bio-epidemiológica de *Enterococcus* e microrganismos relacionados, com ênfase na aplicação de técnicas moleculares. 1998. 121 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Médica Humana) - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.

CASADEWALL, B.; COURVALIN, P. Characterization of the *vanD* glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. *J Bacteriol.* v. 181, n. 12, p. 3644-3648, 1999.

CATTOIR, V. et al. Genomic analysis of reduced susceptibility to tigecycline in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 59, n. 1, p. 239-244, 2015.

CECI, M. et al. Clinical and microbiological features of bacteremia caused by *Enterococcus faecalis*. *J Infect Dev Ctries*, v. 9, n. 11, p. 1195-1203, 2015.

CELIK, S.; CAKIRLAR, F. K.; TORUN, M. M. Presence of vancomycin, aminoglycosides, and erythromycin resistance genes in enterococci isolated from clinical samples in Turkey. *Clin Lab*, v. 60, n. 11, p. 1801-1806, 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Nosocomial enterococci resistant to vancomycin--United States, 1989-1993. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, v. 42, n. 30, p. 597, 1993.

CERCENADO, E. *Enterococcus*: phenotype and genotype resistance and epidemiology in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v. 29, p. 59-65, 2011.

CERCENADO, E. et al. Characterization of vancomycin resistance in *Enterococcus durans*. *J Antimicrob Chemother*, v. 36, n. 5, p. 821-825, 1995.

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL C. G. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev*, v. 40, n. 4, p. 1160-1163, 2002.

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C. G. Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 130, n. 1, p. 14-20, 1997.

CHA, J. O. et al. Diversity of Tn1546 in vanA-positive *Enterococcus faecium* clinical isolates with VanA, VanB, and VanD phenotypes and susceptibility to vancomycin. *J Appl Microbiol*, v. 115, n. 4, p. 969-976, 2013.

CHAGUZA, C. et al. Understanding pneumococcal serotype 1 biology through population genomic analysis. *BMC Infect Dis*, v. 16, n. 1, p. 649, 2016.

CHANDLER, J. R.; DUNNY, G. M. Characterization of the sequence specificity determinants required for processing and control of sex pheromone by the intramembrane protease Eep and the plasmid-encoded protein PrgY. *J Bacteriol.*, v. 190, n. 4, p. 1172-1183, 2008.

CHANG, C. M. et al. Characterisation of vancomycin-resistant enterococci from hospitalised patients at a tertiary centre over a seven-year period. *J Hosp Infect*, v. 74, n. 4, p. 377-384, 2010.

CHEAH, A. L. et al. Enterococcal bacteraemia: factors influencing mortality, length of stay and costs of hospitalization. *Clin Microbiol Infect*; v. 19, p. 181-189, 2013.

CHEN, C. et al. High Prevalence of *vanM* in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 59, n. 12, p. 7795-7798, 2015.

CHEN, L. et al. Identification of a novel transposon (Tn6072) and a truncated SCCmec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST239. *Antimicrob Agents Chemother*; v. 54, n. 8, p. 3347-3354, 2010.

CHENOWETH, C.; SCHABERG, D. The epidemiology of enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 9, n. 2, p. 80-89, 1990.

CHIRURGI, V. A. et al. Nosocomial acquisition of beta-lactamase--negative, ampicillin-resistant *Enterococcus*. *Arch Intern Med*, v. 152, n. 7, p. 1457-1461, 1992.

CHONG, Y. et al. Antibiotic Rotation for Febrile Neutropenic Patients with Hematological Malignancies: Clinical Significance of Antibiotic Heterogeneity. *PLOS ONE*, v. 8, n. 1, p. e54190, 2013.

CHOW, J. W. et al. A novel gentamicin resistance gene in *Enterococcus*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 41, n. 3, p. 511-514, 1997.

CHOW, J. W. et al. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 37, n. 11, p. 2474-2477, 1993.

CHOW, JW. Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clin Infect Dis*, v. 31, n. 2, p. 586-589, 2000.

CHOWDHURY, S.A. et al. The majority of a collection of U.S. endocarditis *Enterococcus faecalis* isolates obtained from 1974 to 2004 lack capsular genes and belong to diverse, non-hospital-associated lineages. *J Clin Microbiol*, v.52, n.2, p.549-556, 2014.

CHRISTIANSEN, K. J. Eradication of a large outbreak of a single strain of *vanB* vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* at a major Australian teaching hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 25, n. 05, p. 384-390, 2004.

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

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. e15798, 2010.

CHUNHUI, C.; XIAOGANG, X. Genetic characteristics of vancomycin resistance gene cluster in *Enterococcus* spp. *Yi Chuan*, v. 37, n. 5, p. 452-457, 2015.

CHURCHWARD, G. The two faces of Janus: virulence gene regulation by CovR/S in group A streptococci. *Mol Microbiol*, v. 64, n. 1, p. 34-41, 2007.

CLARK, A. E. et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clin Microbiol*, v. 26, n. 3, p. 547-603, 2013.

CLARK, C. N. et al. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U. S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 37, n. 11, p. 2311-2317, 1993.

CLEWELL, D. B. Properties of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1, a member of a widely disseminated family of pheromone-responding, conjugative, virulence elements encoding cytolysin. *Plasmid*, v. 58, n. 3, p. 205-227, 2007.

CLEWELL, Don B. et al. *Extrachromosomal and mobile elements in enterococci: transmission, maintenance, and epidemiology*. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190430/> . Acesso em: 19 de mar de 2016.

CLEWELL, Don B.; DUNNY, Gary M. Conjugation and genetic exchange in enterococci. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*, p. 265-300, 2002.

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.

COHEN, A. L. et al. Expression of the collagen adhesin ace by *Enterococcus faecalis* strain OG1RF is not repressed by Ers but requires the Ers box. *FEMS Microbiol Lett*, v. 344, n. 1, p. 18-24, 2013.

CONCEIÇÃO, N. et al. Ampicillin Susceptibility Can Predict In Vitro Susceptibility of Penicillin-Resistant, Ampicillin-Susceptible *Enterococcus faecalis* Isolates to Amoxicillin but Not to Imipenem and Piperacillin. *J Clin Microbiol*, v. 50, n. 11, p. 3729-3731, 2012.

CONCEIÇÃO, N. et al. Penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* of hospital origin: *pbp4* gene polymorphism and genetic diversity. *Infect Genet Evol*, v. 28, p. 289-295, 2014.

CONCEIÇÃO, N. et al. Trends in antimicrobial resistance among clinical isolates of enterococci in a Brazilian tertiary hospital: a 4-year study. *Rev Soc Bras Med Trop*. v. 44, n. 2, p. 177-181, 2011.

COOMBS, G. W. et al. Australian Group on Antimicrobial Resistance Australian Group on Antimicrobial Resistance Australian Enterococcal Sepsis Outcome Programme annual report, 2014. *Commun Dis Intell Q Rep*, v. 40, n. 2, p. E236-E2243, 2016.

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

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

COOPER, E.; PAULL, A.; O'REILLY, M. Characteristics of a large cluster of vancomycin-resistant enterococci in an Australian hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 23, n. 03, p. 151-153, 2002.

COQUE TM. et al. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *J Infect Dis*, v. 171, n. 5, p. 1223-1229, 1995.

COQUE, T. M. et al. High occurrence of esp among ampicillin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* clones from hospitalized patients. *J Antimicrob Chemother*, v. 50, n. 6, p. 1035-1038, 2002.

CORANDER J. et al. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics*, v. 9, n. 1, p. 539, 2008.

CORANDER, J. et al. Population structure in the Neisseria, and the biological significance of fuzzy species. *J R Soc Interface*, v. 9, p. 1208–1215, 2012.

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

COREY, G. R. et al. Single-dose oritavancin in the treatment of acute bacterial skin infections. *N Engl J Med*; v. 370, n. 23, p. 2180-2190, 2014.

COREY, G. R. et al. Single-dose oritavancin versus 7-10 days of vancomycin in the treatment of Gram-positive acute bacterial skin and skin structure infections: the SOLO II noninferiority study. *Clin Infect Dis*, v. 60, p. 254-262, 2015.

CORREA, A. A. et al. Small hospitals matter: insights from the emergence and spread of vancomycin-resistant enterococci in 2 public hospitals in inner Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 82, n. 3, p. 227-233, 2015.

CORSO, A. et al. First report of VanA *Enterococcus gallinarum* dissemination within an intensive care unit in Argentina. *Int J Antimicrob Agents*, v. 25, n. 1, p. 51-56, 2005.

COTTER, P. D. et al. Identification and disruption of *lisRK*, a genetic locus encoding a two-component signal transduction system involved in stress tolerance and virulence in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*, v. 181, n. 21, p. 6840-6843, 1999.

COUDRON, P. E.; MARKOWITZ, S. M.; WONG, E. S. Isolation of a beta-lactamase-producing, aminoglycoside-resistant strain of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 36, n. 5, p. 1125-1126, 1992.

COURVALIN P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis*, v. 42, n. Supplement 1, p. S25-S34, 2006.

COX, C. R.; COBURN, P. S.; GILMORE, M. S. Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. *Curr Protein Pept Sci*, v. 6, n. 1, p. 77-84, 2005.

COX, C. R.; GILMORE, M. S. Native microbial colonization of *Drosophila melanogaster* and its use as a model of *Enterococcus faecalis* pathogenesis. *Infect Immun*, v. 75, n. 4, p. 1565-1576, 2007.

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.

CROTTY, M. P. et al. New gram-positive agents: the next generation of oxazolidinones and lipoglycopeptides. *J. Clin. Microbiol*, v. 54, n. 9, p. 2225-32, 2016.

CUNHA, B. A. Antimicrobial therapy of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*, vancomycin-resistant enterococci, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Med Clin North Am*, v. 90, n. 6, p. 1165-1168, 2006.

CZAJA, C. A. et al. Population-based epidemiologic analysis of acute pyelonephritis. *Clin Infect Dis*, v. 45, n. 3, p. 273-280, 2007.

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.

- DAGHIGHI, Z. et al. Molecular Detection of *vanA* and *vanB* Genes in Vancomycin-Resistant *Enterococcus* Isolated by Polymerase Chain Reaction From the Intestines of Children Admitted to the Intensive Care Units. *Pediatr Infect Dis*. v. 2, n. 4, 2014.
- DAHLEN, G. et al. Virulence factors and antibiotic susceptibility in enterococci isolated from oral mucosal and deep infections. *J Oral Microbiol*; v. 4, p. 10855, 2012.
- DALHOFF, A. Global fluoroquinolone resistance epidemiology and implications for clinical use. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, v. 2012, 2012.
- DALLA COSTA, L. M. et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brazil. *Braz J Infect Dis*, v. 2, n. 3, p. 160-163, 1998.
- DAMACENO, Q.; NICOLI, JR.; OLIVEIRA, A. Variability of cutaneous and nasal population levels between patients colonized and infected by multidrug-resistant bacteria in two Brazilian intensive care units. *SAGE Open Med*, v. 3, p. 2050312114566668, 2015.
- DAVLIEVA, M. et al. Biochemical characterization of cardiolipin synthase mutations associated with daptomycin resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 57, n. 1, p. 289-296, 2013.
- D'AZEVEDO, P. A. et al. Primeiro caso de *Enterococcus* resistentes à vancomicina isolada em Porto Alegre, RS. *J Bras Patol*, v. 36, n. suppl 3, p. 258, 2000.
- DE ALMEIDA, L. M. et al. Linezolid Resistance in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolates in a Brazilian Hospital. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 58, n. 5, p. 2993-2994, 2014.
- DE BEEN M. et al. Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages. *PLoS Genet*, v. 10, n. 12, p. e1004776, 2014.
- DE BEEN, M. et al. Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for High-Resolution Typing of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*, v. 53, n. 12, p. 3788-3797, 2015.
- DE BEEN, M. et al. Recent Recombination Events in the Core Genome Are Associated with Adaptive Evolution in *Enterococcus faecium*. *Genome Biol Evol*, v. 5, n. 8, p. 1524-1535, 2013.
- DE BRUIN M. A.; RILEY L. W. Does vancomycin prescribing intervention affect vancomycin-resistant *Enterococcus* infection and colonization in hospitals? A systematic review. *BMC Infect Dis*, v. 7, n. 1, p. 24, 2007.
- DE FRANCESCO, M. A. et al. Urinary tract infections in Brescia, Italy: etiology of uropathogens and antimicrobial resistance of common uropathogens. *Med Sci Monit*, v. 13, n. 6, p. BR136-BR144, 2007.
- DE KRAKER, M. E. A. et al. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clin. Microbiol Infect Dis*, v. 19, n. 9, p. 860-868, 2013.

DE MELLO, S. S. et al. High-Quality Draft Genome Sequence of the Multidrug-Resistant Clinical Isolate *Enterococcus faecium* VRE16. *Genome Announc*, v. 4, n. 5, p. e00992-16, 2016.

DE NIEDERHÄUSERN, S. et al. VanA-type vancomycin-resistant enterococci in equine and swine rectal swabs and in human clinical samples. *Curr Microbiol*, v. 55, n. 3, p. 240-246, 2007.

DE VECCHI, E. et al. Aetiology and antibiotic resistance patterns of urinary tract infections in the elderly: a 6-month study. *J. Med. Microbiol*, v. 62, n. 6, p. 859-863, 2013.

DEL CAMPO, R. et al. Antimicrobial resistance in recent fecal enterococci from healthy volunteers and food handler in Spain: genes and phenotypes. *Microbial Drug Resistance*. 2003; 9:47-60.

DEL CAMPO, R. et al. Detection of a single *vanA*-containing *Enterococcus faecalis* clone in hospitals in different regions in Spain. *J Antimicrob Chemother*, v. 48, n. 5, p. 746-747, 2001.

DELLIT, T.H. et al. Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship. *Clin Infect Dis*, v. 44, n. 2, p. 159-177, 2007.

DEPARDIEU, F.; REYNOLDS, P. E.; COURVALIN, P. VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* 10/96A. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47, n. 1, p. 7-18, 2003.

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.

DESAI P, P. M. et al. Etiology and antimicrobial resistance patterns of uropathogens in a hospital from suburb of Mumbai. *Int J Biol Med Res*, v. 3, p. 2007–2012, 2012.

DESCHEEMAER, P. et al. Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and Pulsed-Field Gel Electrophoresis of large genomic DNA fragments for identification of enterococci important in human Medicine. *Intern J Syst Bacteriol*, v. 47, n. 2, p. 555-561, 1997.

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.

DESHPANDE, L. M. et al. Detection of a New *cfr*-Like Gene, *cfr*(B), in *Enterococcus faecium* Isolates Recovered from Human Specimens in the United States as Part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 59, n. 10, p. 6256-6261, 2015.

DESOUKY, S. E. et al. High-throughput screening of inhibitors targeting Agr/Fsr quorum sensing in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *Biosci Biotechnol Biochem*, v. 77, n. 5, p. 923-927, 2013.

- DEZFULIAN, A. et al. Identification and Characterization of a High Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Harboring VanA Gene Cluster Isolated from Diabetic Foot Ulcer. *Iran J Basic Med Sci*, v. 15, n. 2, p. 803, 2012.
- DIAZ, L. et al. Transferable Plasmid-Mediated Resistance to Linezolid Due to *cfr* in a Human Clinical Isolate of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. v. 56, n. 7, p. 3917-3922, 2012.
- DIAZGRANADOS, 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.
- DJAHMI, N. et al. Molecular epidemiology of *Enterococcus* sp. isolated in a university hospital in Algeria. *Scand J Infect Dis*, v. 41, n. 3, p. 327-333, 2005.
- DO PRADO GV. et al. Virulence and resistance pattern of a novel sequence type of linezolid-resistant *Enterococcus faecium* identified by whole-genome sequencing. *J Glob Antimicrob Resist*, v. 6, p. 27-31, 2016.
- DONABEDIAN, S. M. et al. Molecular typing of ampicillin-resistant, non-beta-lactamase-producing *Enterococcus faecium* isolates from diverse geographic areas. *J Clin Microbiol*, v. 30, n. 11, p. 2757-2761, 1992.
- DONSKEY, C. J. et al. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N Engl J Med*, v. 343, n. 26, p. 1925-1932, 2000.
- DONSKEY, C.J. et al. Effect of parenteral antibiotic administration on persistence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in the mouse gastrointestinal tract. *J Infect Dis*, v. 180, n. 2, p. 384-390, 1999.
- DORAN, G. et al. Interpreting streptomycin susceptibility test results for *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Int J Antimicrob*, v. 27, n. 6, p. 538-540, 2006.
- DRAGHI, D. C. et al. Comparative surveillance study of telavancin activity against recently collected gram-positive clinical isolates from across the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 52, n. 7, p. 2383-2388, 2008.
- DUERKOP, B. A. et al. A composite bacteriophage alters colonization by an intestinal commensal bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 109, n. 43, p. 17621-17626, 2012.
- DUNNY, G, M. Genetic functions and cell-cell interactions in the pheromone-inducible plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol*, v. 4, n. 5, p. 689-696, 1990.
- DUNNY, G. M.; LEONARD, B. A.; HEDBERG, P. J. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: interbacterial and host-parasite chemical communication. *J Bacteriol*, v. 177, n. 4, p. 871, 1995.

- 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.
- EDELSBERG, J. et al. Prevalence of antibiotic resistance in US hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, v. 78, n. 3, p. 255-262, 2014.
- EISNER, A. et al. High prevalence of VanA-type vancomycin-resistant Enterococci in Austrian poultry. *Appl Environ Microbiol*, v. 71, n. 10, p. 6407-6409, 2005
- EKWEALOR, P. A. et al. Antimicrobial Evaluation of Bacterial Isolates from Urine Specimen of Patients with Complaints of Urinary Tract Infections in Awka, Nigeria. *Int J Microbiol*, v. 2016, p. 9740273, 2016.
- EL AMIN, N. A.; JALAL, S.; WRETLIND, B. Alterations in GyrA and ParC associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 43, n. 4, p. 947-949, 1999.
- EL KHOLY, A. et al. Antimicrobial resistance in Cairo, Egypt 1999-2000: a survey of five hospitals. *J Antimicrob Chemother*, v. 51, n. 3, p. 625-630, 2003.
- ELIOPOULOS, G. M. Antimicrobial resistance in the Enterococcus. In: WAX, R. G. et al. (org.). *Bacterial resistance to antimicrobials*. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 255–289.
- EL-MAHMOOD, A. M. Antimicrobial susceptibility of some quinolone antibiotics against some urinary tract pathogens in a tertiary hospital, Yola, Adamawa State, Nigeria. *J Clin Med Res*, v. 1, n. 2, p. 026-034, 2009.
- EMANEINI, M. et al. Prevalence of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in an Iranian hospital. *J Prev Med Hyg*, v. 57, n. 4, p. E197, 2016.
- EMANEINI, M.; ALIGHOLI, M.; AMINSHAHI, M. Characterization of glycopeptides, aminoglycosides and macrolide resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospitals in Tehran. *Pol J Microbiol*, v. 57, n. 2, p. 173-8, 2008.
- EMMERSON, A. M.; JONES, A. M. The quinolones: Decades of development and use. *J Antimicrob Chemother*. v. 51, n. suppl 1, p. 13-20, 2003.
- ENGELMANN, I. et al. A comprehensive analysis of gene expression changes provoked by bacterial and fungal infection in *C. elegans*. *PLoS ONE*, v. 6, n. 5, p. e19055, 2011.
- 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: ECDC, 2015. Disponível em:

<http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/antimicrobial-resistance-europe-2014.pdf>. Acesso em: 10 de nov de 2016.

EVERS, S. et al. Genetic linkage and cotransfer of a novel, *vanB*-containing transposon (Tn5382) and a low-affinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolate. *J Bacteriol*, v. 180, n. 17, p. 4426-4434, 1998.

FACKLAM, R. R.; CARVALHO, M. R. G. S.; TEIXEIRA, L. M. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In: GILMORE, M. S. (org.). *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. Washington: ASM Press, 2002. p. 1-55.

FAGAN, M. et al. Antibiotic resistance patterns of bacteria causing urinary tract infections in the elderly living in nursing homes versus the elderly living at home: an observational study. *BMC Geriatr*, v. 15, n. 1, p. 98, 2015.

FANG, H. et al. Emergence of VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Stockholm, Sweden. *Clin Microbiol Infect*, v. 13, n. 1, p. 106-108, 2007.

FARIA, A. R. *Enterococcus faecium*: caracterização molecular de amostras isoladas no período anterior e posterior a emergência da resistência à vancomicina no Estado do Rio de Janeiro. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica Humana) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

FEIL, E. J. et al. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol*, v. 186, n. 5, p. 1518-1530, 2004.

FEIZABADI, M. M. et al. Prevalence of aminoglycoside-modifying enzymes genes among isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Iran. *Microb Drug Resist*, v. 12, n. 4, p. 265-268, 2006.

FEIZABADI, M. M. et al. Transposon *Tn5281* is the main distributor of the aminoglycoside modifying enzyme gene among isolates of *Enterococcus faecalis* in Tehran hospitals. *Can J Microbiol*, v. 54, n. 10, p. 887-890, 2008.

FERNÁNDEZ-GUERRERO, M. L. et al. Nosocomial enterococcal endocarditis: a serious hazard for hospitalized patients with enterococcal bacteraemia. *J. Intern. Med.* 252, 510–515. 2002

FERNÁNDEZ-HIDALGO, N. et al. Ampicillin plus ceftriaxone is as effective as ampicillin plus gentamicin for treating *Enterococcus faecalis* infective endocarditis. *Clin Infect Dis*, v. 56, n. 9, p. 1261-1268, 2013.

FIEDLER, S. et al. Tigecycline resistance in clinical isolates of *Enterococcus faecium* is mediated by an upregulation of plasmid-encoded tetracycline determinants tet(L) and tet(M). *J. Antimicrob. Chemother*, v. 71, n. 4, p. 871-881, 2016.

- FILIPOVÁ, M. et al. Occurrence of aminoglycoside-modifying-enzyme genes *aac(6')*-*aph(2'')*, *aph(3')*, *ant(4')* and *ant(6)* in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* resistant to high-level of gentamicin and amikacin. *Folia Microbiol*, v. 51, n. 1, p. 57-61, 2006.
- FINES, M. et al. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 43, n. 9, p. 2161-2164, 1999.
- FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiol*, v. 155, n. 6, p. 1749-1757, 2009.
- FOGLIA, G. et al. Molecular analysis of Tn1546-like elements mediating high-level vancomycin resistance in *Enterococcus gallinarum*. *J Antimicrob Chemother*, v. 52, n. 5, p. 772-775, 2003.
- FONTANA, R. et al. Mechanisms of resistance to growth inhibition and killing by beta-lactam antibiotics in enterococci. *Clin Infect Dis*, v. 15, n. 3, p. 486-489, 1992.
- FORTINA, M. G. et al. Rapid identification of *Enterococcus italicus* by PCR with primers targeted to 16S rRNA gene. *Lett Appl Microbiol*, v. 44, n. 4, p. 443-446, 2007.
- FRAHER, M. H. et al. Daptomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a patient with no prior exposure to daptomycin. *J Hosp Infect*, v. 65, n. 4, p. 376-378, 2007.
- FRANCIA, M. V. et al. Completion of the nucleotide sequence of the *Enterococcus faecalis* conjugative virulence plasmid pAD1 and identification of a second transfer origin. *Plasmid*, v. 46, n. 2, p. 117-127, 2001.
- FRANK, K. L. et al. Evaluation of the *Enterococcus faecalis* Biofilm-Associated Virulence Factors AhrC and Eep in Rat Foreign Body Osteomyelitis and In Vitro Biofilm-Associated Antimicrobial Resistance. *PLoS ONE*, v. 10, n. 6, p. e0130187, 2015.
- FRANK, K. L. et al. AhrC and Eep Are Biofilm Infection-Associated Virulence Factors in *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*, v. 81, n. 5, p. 1696-1708, 2013.
- FRANK, K. L. et al. Use of recombinase-based in vivo expression technology to 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.
- FREITAS, A. R. et al. Clonal expansion within clonal complex 2 and spread of vancomycin-resistant plasmids among different genetic lineages of *Enterococcus faecalis* from Portugal. *J Antimicrob Chemother*, v. 63, n. 6, p. 1104-1111, 2009.
- FREITAS, A. R. et al. Human and swine hosts share vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* CC17 and CC5 and *Enterococcus faecalis* CC2 clonal clusters harboring Tn1546 on indistinguishable plasmids. *J Clin Microbiol*, v. 49, n. 3, p. 925-931, 2011.
- FREITAS, A.R. et al. Microevolutionary events involving narrow host plasmids influences local fixation of vancomycin-resistance in *Enterococcus* populations, *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, p. e60589, 2013.

- FRIDKIN, S. K. et al. Epidemiology of a dominant clonal strain of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* at separate hospitals in Boston, Massachusetts. *J Clin Microbiol*, v. 36, n. 4, p. 965-970, 1998.
- FURMANEK-BLASZK, B.; SEKTAS, M. The *Sfa*NI restriction-modification system from *Enterococcus faecalis* NEB215 is located on a putative mobile genetic element. *FEMS Microbiol. Lett*, v. 362, n. 8, p. fnv028, 2015.
- FURUMURA, M. T. et al. Características de hemolisina termo-estável produzida por *Enterococcus faecalis* provenientes de infecção hospitalar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 11., 2001, Foz do Iguaçu. Anais [...] Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001. p. 113.
- GALIANO, G. S. ReLAVRA. *PAHO*, 2016. Disponível em: <http://antimicrobianos.com.ar/category/resistencia/relavra/>. Acesso em: 15 de abr. de 2016.
- GALLI D.; WIRTH R. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* sex pheromone plasmids identifies a single homologous DNA region which codes for aggregation substance, *J Bacteriol*, v. 173, n. 9, p. 3029-3033, 1991.
- GALLI, D.; LOTTSPREICH, F.; WIRTH, R. Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. *Mol Microbiol*, v. 4, n. 6, p. 895-904, 1990.
- GALLOWAY-PEÑA, J. et al. Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium*. *PLoS ONE*, v. 7, n. 1, p. e30187, 2012.
- GALLOWAY-PEÑA, J. R. et al. Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. *J Infect Dis*, v. 200, n. 10, p. 1566-1573, 2009.
- GALLOWAY-PEÑA, J. R.; RICE, L. B.; MURRAY, B. E. Analysis of PBP5 of Early U.S. Isolates of *Enterococcus faecium*: Sequence Variation Alone Does Not Explain Increasing Ampicillin Resistance over Time. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 55, n. 7, p. 3272-3277, 2011.
- GARCIA-MIGURA, L. et al. Establishing streptomycin epidemiological cut-off values for *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist*, v. 18, n. 1, p. 88-93, 2012.
- GARG, S.; MOHAN, B.; TANEJA, N. Biofilm formation capability of enterococcal strains causing urinary tract infection vis-a-vis colonisation and correlation with enterococcal surface protein gene. *Indian J Med Microbiol*, v. 35, n. 1, p. 48, 2017.
- GARNIER, F. et al. Characterization of transposon Tn1549, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus* spp. *Microbiol*, v. 146, n. 6, p. 1481-1489, 2000.
- GARSIN, D. A. et al. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 98, n. 19, p. 10892-10897, 2001.

GARSIN, D. A. Microbiology. Peptide signals sense and destroy target cells. *Science*, v. 306, n. 5705, p. 2202-2203, 2004.

GENTRY-WEEKS, C. R. et al. Survival of *Enterococcus faecalis* in mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun*; v. 67, n. 5, p. 2160-2165, 1999.

GETACHEW, Y. et al. Genetic Variability of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Isolates from Humans, Chickens, and Pigs in Malaysia. *Appl Environ Microbiol*, v. 79, n. 15, p. 4528-4533, 2013.

GHANEM, G. et al. Outcomes for and risk factors associated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia in cancer patients. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 28, n. 09, p. 1054-1059, 2007.

GIEBEL, R. A.; FREDENBERG, W.; SANDRIN, T. R. Characterization of environmental isolates of *Enterococcus* spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Water Res*, v. 42, n. 4, p. 931-940, 2008.

GIKAS, A. et al. Epidemiology and molecular analysis of intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci in greek hospitals. *J Clin Microbiol*, v. 43, n. 11, p. 5796-5799, 2005.

GIRIDHARA UPADHYAYA, P. M.; UMAPATHY, B. L.; RAVIKUMAR, K. L. Comparative study for the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin and biofilm among clinical and commensal isolates of *Enterococcus faecalis*. *J Lab Physicians*, v. 2, n. 2, p. 100, 2010.

GOŁĘBIEWSKA, J. E.; DEBSKA-ŚLIZIEN, A.; RUTKOWSKI, B. Urinary tract infections during the first year after renal transplantation: one center's experience and a review of the literature. *Clin Transplant*, v. 28, n. 11, p. 1263-1270, 2014.

GOLINSKA, E. et al. Virulence factors of *Enterococcus* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol*, v. 19, n. 23, p. 3562, 2013.

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.

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

GOOSSENS H. European status of resistance in nosocomial infections. *Int J Exp Clin Chemother*, v. 51, n. 4, p. 177-181, 2005.

GORDON, D. M. et al. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol*, v. 10, n. 10, p. 2484-2496, 2008.

- GORDON, S. et al. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. Enterococcal Study Group. *J Clin Microbiol*, v. 30, n. 9, p. 2373-2378, 1992.
- GOTFRIED, M. H.; DANZIGER, L. H.; RODVOLD, K. A. Steady-state plasma and intrapulmonary concentrations of levofloxacin and ciprofloxacin in healthy adult subjects. *Chest J*, v. 119, n. 4, p. 1114-1122, 2001.
- GRAHAM, P. L.; AMPOFO, K.; SAIMAN, L. Linezolid treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ventriculitis. *Pediatr Infect Dis J*, v. 21, n. 8, p. 798-800, 2002.
- GREENFIELD, T. J. et al. The antisense RNA of the par locus of pAD1 regulates the expression of a 33-amino-acid toxic peptide by an unusual mechanism. *Mol Microbiol*, v. 37, n. 3, p. 652-660, 2000.
- GROSS, J. (org.). *Mass spectrometry a textbook*. 1. ed. Heidelberg: Springer, 2004. p. 1-10.
- GU, L. et al. A new Tn1546 type of VanB phenotype - vanA genotype vancomycin - resistant *Enterococcus faecium* isolates in mainland China. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 63, p. 70 - 75 , 2009
- GUARDABASSI, L. et al. Gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* sequence type 6 with reduced penicillin susceptibility: diagnostic and therapeutic implications. *J Clin Microbiol*, v. 48, n. 10, p. 3820-3821, 2010.
- GUITON, P. S. et al. Enterococcal Biofilm Formation and Virulence in an Optimized Murine Model of Foreign Body-Associated Urinary Tract Infections. *Infect Immun*, v. 78, n. 10, p. 4166-4175, 2010.
- GULHAN, T. et al. Characterization of *Enterococcus faecalis* isolates originating from different sources for their virulence factors and genes, antibiotic resistance patterns, genotypes and biofilm production. *Iran J Vet Res*, v. 16, n. 3, p. 261, 2015.
- GUPTA, K.; BHADLIA, N. Management of urinary tract infections from multidrug-resistant organisms. *Infect Dis Clin North Am*, v. 28, n. 1, p. 49-59, 2014.
- GUZMAN PRIETO, A. M. et al. Global Emergence and Dissemination of Enterococci as Nosocomial Pathogens: Attack of the Clones? *Front Microbiol*, v. 7, p. 788, 2016.
- HALL SNYDER, A. D. et al. Fosfomycin Enhances the Activity of Daptomycin against Vancomycin-Resistant Enterococci in an In Vitro Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model. *Antimicrob Agents Chemother*; 2 v. 60, n. 10, p. 5716-5723, 2016.
- HALL SNYDER, A. et al. Evaluation of the novel combination of daptomycin plus ceftriaxone against vancomycin-resistant enterococci in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic simulated endocardial vegetation model. *J Antimicrob Chemother*; v. 69, n. 8, p. 2148-2154, 2014.
- HALL, A. D. et al. Evaluation of standard-and high-dose daptomycin versus linezolid against vancomycin-resistant *Enterococcus* isolates in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic

model with simulated endocardial vegetations. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 56, n. 6, p. 3174-3180, 2012.

HALLGREN, A. et al. Genetic relatedness among *Enterococcus faecalis* with transposon-mediated high-level gentamicin resistance in Swedish intensive care units. *J Antimicrob Chemother*, v. 52, n. 2, p. 162-167, 2003.

HALVORSEN, E. M. Txe, an endoribonuclease of the enterococcal Axe-Txe toxin-antitoxin system, cleaves mRNA and inhibits protein synthesis. *Microbiol*, v. 157, n. 2, p. 387-397, 2011.

HANAGE, W. P. et al. Hyper-recombination, diversity, and antibiotic resistance in pneumococcus. *Science*, v. 324, n. 5933, p. 1454-1457, 2009.

HANCOCK, L. E.; GILMORE, M. S. Pathogenicity of enterococci. In: FISCHETTI, V. A.; NOVICK, R. P. (org.). *Gram-positive pathogens*. Washington: ASM Press, 2000. p. 251-258.

HANCOCK, L. E.; GILMORE, M. S. The capsular polysaccharide of *Enterococcus faecalis* and its relationship to other polysaccharides in the cell wall. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, n. 3, p. 1574-1579, 2002.

HANCOCK, L. E.; SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Molecular analysis of the *Enterococcus faecalis* serotype 2 polysaccharide determinant. *J Bacteriol*, v. 185, n. 15, p. 4393-4401, 2003.

HARRIS, R. A. et al. Comparison of sequencing-based methods to profile DNA methylation and identification of monoallelic epigenetic modifications. *Nat Biotechnol*, v. 28, n. 10, p. 1097-1105, 2010.

HARRIS, S. R. et al. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. *Science*, v. 327, n. 5964, p. 469-474, 2010.

HASANI; A. et al. Molecular screening of virulence genes in high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from clinical specimens in Northwest Iran. *Indian J Med Microbiol*, v. 30, n. 2, p. 175, 2012.

HASHIMOTO, Y. et al. Amino acid substitutions in the VanS sensor of the VanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus* strains result in high-level vancomycin resistance and low-level teicoplanin resistance. *FEMS Microbiol Lett*, v. 185, n. 2, p. 247-254, 2000.

HEGSTAD, K. et al. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect*, v. 16, n. 6, p. 541-554, 2010.

HEINTZ B. H.; HALILOVIC J.; Christensen C. L. Vancomycin-resistant enterococcal urinary tract infections. *Pharmacotherapy*, v. 30, n. 11, p. 1136-1149, 2010.

HENDRICKX, A. P. et al. LPxTG surface proteins of enterococci. *Trends Microbiol*, v. 17, n. 9, p. 423-430, 2009.

HENNINGHAM, A. et al. Mutual exclusivity of hyaluronan and hyaluronidase in invasive group A *Streptococcus*. *J Biol Chem*, v. 289, n. 46, p. 32303-32315, 2014.

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, n. 3, 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.

HIDRON, A. I. et al. National Healthcare Safety Network Team; Participating National Healthcare Safety Network Facilities. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 29, n. 11, p. 996–1011, 2008.

HIDRON, A. I. et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 29, n. 11, p. 996-1011, 2008. See Erratum v. 30, n. 1, p. 107, 2009.

HINDLER, J. A. et al. In vitro activity of daptomycin in combination with β -lactams, gentamicin, rifampin, and tigecycline against daptomycin-nonsusceptible enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 59, n. 7, p. 4279-4288, 2015.

HIRAGA, N. et al. Genetic analysis of faropenem-resistant *Enterococcus faecalis* in urinary isolates. *J Antibiot*, v. 61, n. 4, p. 213-221, 2008.

HISCOX, T. J. et al. Regulation of virulence by the RevR response regulator in *Clostridium perfringens*. *Infect Immun*, v. 79, n. 6, p. 2145-2153, 2011.

HOBAN, D. J. et al. Global in vitro activity of tigecycline and comparator agents: tigecycline Evaluation and Surveillance Trial 2004-2013. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, v. 14, n. 1, p. 27, 2015.

HODEL-CHRISTIAN, S. L.; MURRAY, B. E. Mobilization of the gentamicin resistance gene in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 34, n. 6, p. 1278-1280, 1990.

HODEL-CHRISTIAN, S.L.; MURRAY, B.E. Characterization of the gentamicin resistance transposon Tn5281 from *Enterococcus faecalis* and comparison to *Staphylococcal* transposons Tn4001 and Tn4031. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 35, n. 6, p. 1147-1152, 1991.

HOLDEN, M. T. et al. A genomic portrait of the emergence, evolution, and global spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic. *Genome Res*, v. 23, n. 4, p. 653-664, 2013.

HOLLAND, T.; FOWLER, V. G.; SHELBURNE S. A. Invasive gram-positive bacterial infection in cancer patients. *Clin Infect Dis*, v. 59, n. suppl 5, p. S331-S334, 2014.

HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. *Virulence*, v. 3, n. 5, p. 421-569, 2012.

HOMAN, W. L. et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*; v. 40, n. 6, p. 1963-1971, 2002.

HONG, H. J.; HUTCHINGS, M. I.; BUTTNER, M. J.; Biotechnology and Biological Sciences Research Council, UK.. Vancomycin resistance VanS/VanR two-component systems. *Adv Exp Med Biol*, v. 631, p. 200-13, 2008.

HOOBKAMP-KORSTANJE, J. A. In-vitro activities of ciprofloxacin, levofloxacin, lomefloxacin, ofloxacin, pefloxacin, sparfloxacin and trovafloxacin against gram-positive and gram-negative pathogens from respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother*, v. 40, n. 3, p. 427-431, 1997.

HORSLEY, H. et al. *Enterococcus faecalis* subverts and invades the host urothelium in patients with chronic urinary tract infection. *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, p. e83637, 2013.

HOWDEN, B. P. et al. Genomic insights to control the emergence of vancomycin-resistant enterococci. *Mbio*, v. 4, n. 4, p. e00412-13, 2013.

HSIEH, S. E. et al. Importance of amino acid alterations and expression of penicillin-binding protein 5 to ampicillin resistance of *Enterococcus faecium* in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents*, v. 28, n. 6, p. 514-519, 2006.

HSIEH, Y. C. et al. 2010. Clonal spread of CC17 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with multilocus sequence type 78 (ST78) and a novel ST444 in Taiwan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 29, n. 1, p. 25, 2010.

HSUEH, P. R. et al. Antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci in Taiwan. *J Formos Med Assoc*, v. 98, n. 1, p. 45-48, 1999.

HUO, W. et al. Genome Modification in *Enterococcus faecalis* OG1RF Assessed by Bisulfite Sequencing and Single-Molecule Real-Time Sequencing. *J Bacteriol*, v. 197, n. 11, p. 1939-1951, 2015.

HUTCHINGS, M. I.; HONG, H. J.; BUTTNER, M. J. The vancomycin resistance VanRS two-component signal transduction system of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*, v. 59, n. 3, p. 923-935, 2006.

HUYCKE, M. M.; SAHM, 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, n. 2, p. 239, 1998.

IBBERSON, C. B. et al. *Staphylococcus aureus* hyaluronidase is a CodY-regulated virulence factor. *Infect Immun*, v. 82, n. 10, p. 4253-4264, 2014.

INFANTE, V. H. et al. Evaluation of polymorphisms in *pbp4* gene and genetic diversity in penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* from hospitals in different states in Brazil. *FEMS Microbiol Lett*, v. 363, n. 7, p. fnw044, 2016.

IRA, P.; SUJATHA, S.; CHANDRA, P. S. Virulence factors in clinical and comensal isolates of *Enterococcus* species. *Indian J Pathol Microbiol*, v. 56, n. 1, p. 24, 2013.

ISHIKAWA, K. et al. The nationwide study of bacterial pathogens associated with urinary tract infections conducted by the Japanese Society of Chemotherapy. *J Infect Chemother*, v. 17, n. 1, p. 126-138, 2011.

JACKSON, B. R. et al. Implementation of Nationwide Real-time Whole-genome Sequencing to Enhance Listeriosis Outbreak Detection and Investigation. *Clin Infect Dis*, v. 63, n. 3, p. 380-386, 2016.

JACKSON, C. R.; FEDORKA-CRAY, P. J.; BARRETT, J. B. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J Clin Microbiol*, v. 42, n. 8, p. 3558-3565, 2004.

JACOBY, G. A.; STRAHILEVITZ J.; HOOPER D. C. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol Spectr*, v. 2, n. 5, 2014. DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013.

JACQUELINE, C. et al. In vivo activity of a novel anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cephalosporin, ceftaro-line, against vancomycin-susceptible and -resistant *Enterococcus faecalis* strains in a rabbit endocarditis model: a comparative study with linezolid and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 53, n. 12, p. 5300-5302, 2009.

JAMET, E. et al. Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. *Food Microbiol*, v.31, n.2, p.191-198, 2012.

JASPAN, H. B. et al. Multidrug-resistant *Enterococcus faecium* meningitis in a toddler: characterization of the organism and successful treatment with intravascular daptomycin and tigecycline. *Pediatr Infect Dis J*, v. 29, n. 4, p. 379, 2010.

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.

JETT, B. D.; HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev*, v. 7, n. 4, p. 462-478, 1994.

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.

JIMÉNEZ, E. et al. Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human milk. *BMC Microbiol*, v. 13, n. 1, p. 288, 2013.

JOHNSEN, P. J. et al. Persistence of animal and human glycopeptides-resistant enterococci on two Norwegian poultry farms formerly exposed to avoparcin is associated with a widespread plasmid-mediated VanA element within a polyclonal *Enterococcus faecium* population. *Appl Environ Microbiol*, v. 71, n. 1, p. 159-168, 2005.

JOHNSON, M. et al. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). *Nucleic Acids Res* , 2017. Disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>. Acesso em: 1 mar. 2017.

JOHNSON, P. D. A sustained hospital outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia due to emergence of *vanB E. faecium* sequence type 203. *J Infect Dis*, v. 202, n. 8, p. 1278-1286, 2010.

JOLIVET, S. et al. First nosocomial outbreak of *vanA*-type vancomycin-resistant *Enterococcus raffinosus* in France. *J Hosp Infect*, v. 94, n. 4, p. 346-350, 2016.

JOLLEY, K. A. et al. Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics*, v. 17, n. 12, p. 1230-1231, 2001.

Jolley, K. A.; Maiden, E. B. MULTI LOCUS SEQUENCE TYPING FOR *Enterococcus faecalis*. *BMC Bioinformatics*, 2010. Disponível em: <https://pubmlst.org/efaecalis/>. Acesso em: 20 de fev. de 2016.

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

JONES, R. N. et al. Resistance surveillance program report for selected European nations: 2011. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v.78, p. 429–436, 2014.

JONES, R. N. et al. Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program: 2011. *Braz J Infect Dis*, v. 7, n. 6, p. 672–681, 2013

JONES, R. N.; SADER, H. S.; FLAMM, R. K. Update of dalbavancin spectrum and potency in the USA: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2011). *Diagn Microbiol Infect. Dis*, v.75, p. 304–307, 2013.

JUNG, W. K. et al. Phenotypic and genetic characterization of vancomycin-resistant enterococci from hospitalized humans and from poultry in Korea. *FEMS Microbiol Lett*, v. 260, n. 2, p. 193-200, 2006.

JUNGERMANN, G. B. et al. Antibiotic resistance in primary and persistent endodontic infections. *J Endod*, v. 37, n. 10, p. 1337-1344, 2011.

JUREEN, R. et al. Comparative analysis of amplified fragment length polymorphism and Pulsed-Field Gel Electrophoresis in a hospital outbreak and subsequent endemicity of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 40, n. 1, p. 33-39, 2004.

JURKOVIC, D. et al. Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese. *Lett Appl Microbiol*, v. 42, n. 6, p. 553-559, 2006.

KAFIL H. S.; MOBAREZ, A. M.; MOGHADAM, M. F. Adhesion and virulence factor properties of Enterococci isolated from clinical samples in Iran. *Indian J Pathol Microbiol*, v. 56, n. 3, p. 238, 2013.

KAFIL, H. S.; MOBAREZ, A. M. Spread of Enterococcal Surface Protein in Antibiotic Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates from Urinary Tract Infections. *Open Microbiol J*, v. 9, p. 14, 2015.

KAFIL, H. S.; MOBAREZ, A. M.; MOGHADAM, M. F. Adhesion and virulence factor properties of Enterococci isolated from clinical samples in Iran. *Indian J Pathol Microbiol*, v. 56, n. 3, p. 238, 2013.

KAHLMETER, G. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 6.0, 2016. *J Antimicrob Chemother*, 2016. Disponível em: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_Tables.pdf/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Tables.pdf. Acesso em: 20 de fev. de 2016.

KAHLMETER, G. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 5.0, 2015. *J Antimicrob Chemother*, 2015. Disponível em: <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media>. Acesso em: 20 de fev. de 2016.

KAINER, M. A. et al. Response to emerging infection leading to outbreak of linezolid-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis*, v. 13, n. 7, p. 1024, 2007.

KAJIHARA, T. et al. Clinical characteristics and risk factors of enterococcal infections in Nagasaki, Japan: a retrospective study. *BMC Infect Dis*, v. 15, n. 1, p. 426, 2015.

KAMBOJ, M. et al. What is the source of bloodstream infection due to vancomycin-resistant enterococci in persons with mucosal barrier injury? *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 35, n. 01, p. 99-101, 2014.

KANEMATSU, E. et al. Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of DNA topoisomerase IV associated with quinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 42, n. 2, p. 433-435, 1998.

KAO, S. J. et al. Detection of the high-level aminoglycoside resistance gene *aph(2'')-Ib* in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, n. 10, p. 2876-2879, 2000.

KARA, A. et al. Risk of vancomycin-resistant enterococci bloodstream infection among patients colonized with vancomycin-resistant enterococci. *Braz J Infect Dis*, v. 19, n. 1, p. 58-61, 2015.

KARIYAMA, R. et al. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol*, v. 38, n. 8, p. 3092-3095, 2000.

KARKI, S. et al. Long-term carriage of vancomycin-resistant enterococci in patients discharged from hospitals: a 12-year retrospective cohort study. *J Clin Microbiol*, v. 51, n. 10, p. 3374-3379, 2013.

KARLOWSKY, J. A. et al. In vitro activity of Oritavancin against gram-positive pathogens isolated in Canadian hospital laboratories from 2011 to 2015. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 87, n. 4, p. 349-356, 2017.

KARLOWSKY, J. A. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, v. 3, n. 1, p. 7, 2004.

KARLOWSKY, J. A. In vitro activity of oritavancin against Gram-positive pathogens isolated in Canadian hospital laboratories from 2011 to 2013. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 80, n. 4, p. 311-315, 2014.

KARLOWSKY, J. A.; NICHOL, K.; ZHANEL, G. G. Telavancin: mechanisms of action, in vitro activity, and mechanisms of resistance. *Clin Infect Dis*, v. 61, n. suppl 2, p. S58-S68, 2015.

KAUSHAL, S. et al. Vancomycin-resistant enterococci in neonatal stool as a cause of septicemia: Challenges for infection control practices. *Indian J Pathol Microbiol*, v. 59, n. 4, p. 548, 2016.

KAWALEC, M. et al. Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish hospitals: the characterization of epidemic clones. *J Clin Microbiol*, v. 45, n. 1, p. 147-153, 2007.

KAWALEC, M. et al. Hospital outbreak of vancomycin-resistant enterococci caused by a single clone of *Enterococcus raffinosus* and several clones of *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect*, v. 13, n. 9, p. 893-901, 2007.

KAYSER FH. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int J Food Microbiol*, v. 88, n. 2, p. 255-262, 2003.

KE, D. et al. Development of a PCR Assay for Rapid Detection of Enterococci. *J Clinl Microbiol*, v. 88, n. 2, p. 255-262, 2003.

KEATING, G. M. Fosfomycin trometamol: a review of its use as a single-dose oral treatment for patients with acute lower urinary tract infections and pregnant women with asymptomatic bacteriuria. *Drugs*, v. 73, n. 17, p. 1951-1966, 2013.

KEIM, P. et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol*, v. 182, n. 10, p. 2928-2936, 2000.

KELESIDIS, T. et al. Daptomycin nonsusceptible enterococci: an emerging challenge for clinicians. *Clin Infect Dis*, v. 52, n. 2, p. 228-234, 2011.

KELESIDIS, T. et al. De novo daptomycin-nonsusceptible enterococcal infections. *Emerg Infect Dis*, v. 18, n. 4, p. 674, 2012.

KERBAUY, G. et al. Vancomycin-dependent *Enterococcus faecium vanA*: characterization of the first case isolated in a university hospital in Brazil. *Braz J Med Biol Res*, v. 44, n. 3, p. 253-257, 2011.

KHAN, S. A. et al. Heteroresistance to vancomycin and novel point mutations in Tn1546 of *Enterococcus faecium* ATCC 51559. *Int J Antimicrob Agents*, v. 31, n. 1, p. 27-36, 2008

KHANI, M. et al. Increasing Prevalence of Aminoglycoside-Resistant *Enterococcus faecalis* Isolates Due to the *aac(6')-aph(2'')* Gene: A Therapeutic Problem in Kermanshah, Iran. *Jundishapur J Microbiol*, v. 9, n. 3, p. e28923, 2016.

KHOSHBAKHT, R. et al. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from urinary tract infections in Karaj, Iran. *Jundishapur J Microbiol*, v. 6, n. 1, p. 86-90, 2012.

KIM, H. B. et al. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 53, n. 8, p. 3582-3584, 2009.

KIM, W. Y. et al. Comparable Efficacy of Tigecycline versus Colistin Therapy for Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Pneumonia in Critically Ill Patients. *PLOS ONE*, v. 11, n. 3, p. e0150642, 2016.

KLARE, I. et al. Increased frequency of linezolid resistance among clinical *Enterococcus faecium* isolates from German hospital patients. *J Glob Antimicrob Resist*, v. 3, n. 2, p. 128-131, 2015.

KLARE, I. et al. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol*, v. 88, n. 2, p. 269-290, 2003.

KLARE, I. et al. Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. *Eur Clin Microbiol Infect Dis*, v. 24, n. 12, p. 815, 2005.

KLAUSNER, H. A. et al. A trial of levofloxacin 750 mg once daily for 5 days versus ciprofloxacin 400 mg and/or 500 mg twice daily for 10 days in the treatment of acute pyelonephritis. *Curr Med Res Opin*, v. 23, n. 11, p. 2637-2645, 2007.

KLIBI, N. et al. Detection of virulence factors in high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from a Tunisian hospital. *Can J Microbiol*, v. 53, n. 3, p. 372-379, 2007.

KLIEM, M.; SAUER, S. The essence on mass spectrometry based microbial diagnostics. *Curr Opin Microbiol*, v. 15, n. 3, p. 397-402, 2012.

KLUPP, E. M. et al. Tedizolid susceptibility in linezolid- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 35, n. 12, p. 1957-1961, 2016.

KNIFF, E. et al. Rapid identification of *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae* by PCR with primers targeted to the *ddl* genes. *J Microbiol Methods*, v. 47, n. 1, p. 35-40, 2001.

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

KOH, T. H. et al. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in Singapore. *Pathology*, v. 41, n. 7, p. 676-680, 2009.

- KORTEN, V.; HUANG, W. M.; MURRAY, B. E. Analysis by PCR and direct DNA sequencing of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 38, n. 9, p. 2091-2094, 1994.
- KOSER, C. U. et al. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PLoS Pathog*, v. 8, n. 8, p. e1002824, 2012.
- KOSER, C.U. et al. Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak. *N Engl J Med*, v. 366, n. 24, p. 2267-2275, 2012.
- KOSOWSKA-SHICK, K. et al. Activity of telavancin against staphylococci and enterococci determined by MIC and resistance selection studies. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 53, n. 10, p. 4217-4224, 2009.
- KOTEVA, K. et al. A vancomycin photoprobe identifies the histidine kinase VanSsc as a vancomycin receptor. *Nat Chem Biol*, v. 6, n. 5, p. 327-329, 2010.
- KOTRA LP, HADDAD J, MOBASHERY S. Aminoglycoside perspective on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, n. 12, p. 3249-3256, 2000.
- KOUSALYA, K. et al. Antimicrobial resistance of bacterial agents of the upper respiratory tract in south indian population. *J Adv Pharm Technol Res*, v. 1, n. 2, p. 207, 2010.
- KOWALSKI, W. J. *Enterococcus faecalis* adhesin, Ace, mediates attachment to particulate dentin. *J Endod*, v. 32, n. 7, p. 634-637, 2006.
- KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis*, v. 6, n. 1, p. 130, 2006.
- KREFT, B. et al. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect Immun*, v. 60, n. 1, p. 25-30, 1992.
- KRISTICH, C. J. et al. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*, v. 186, n. 1, p. 154-163, 2004.
- KRISTICH, C.; RICE, L.; ARIAS, C. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. In: GILMORE, M. S. et al. (org.). *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190424/>. Acesso em: 15 de abr. de 2016.
- KRULL, M. Emergence of linezolid- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a department for hematologic stem cell transplantation. *Antimicrob Resist Infect Control*; v. 5, n. 1, p. 31, 2016.

- KRUTCHINSKY, A. N.; KALKUM M.; CHAIT, B. T. Automatic identification of proteins with a MALDI-quadrupole ion trap mass spectrometer. *Anal Chem*, v. 73, n. 21, p. 5066-5077, 2001.
- KUCH, A. et al. Insight into antimicrobial susceptibility and population structure of contemporary human *Enterococcus faecalis* isolates from Europe. *J Antimicrob Chemother*, v. 67, n. 3, p. 551-558, 2012.
- KÜHN, I. et al. Biochemical fingerprinting compared with ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis of DNA for epidemiological typing of enterococci. *J Clin Microbiol*, v. 33, n. 11, p. 2812-2817, 1995.
- KUMAR, S. et al. The first linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in India: High level resistance in a patient with no previous antibiotic exposure. *Avicenna J Med*; v. 4, n. 1, p. 13, 2014.
- KWONG, J. C. et al. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology*, v. 47, n. 3, p. 199-210, 2015.
- La Rosa, S. L. et al. A genomic virulence reference map of *Enterococcus faecalis* reveals an important contribution of phage03-like elements in nosocomial genetic lineages to pathogenicity in a *Caenorhabditis elegans* infection model. *Infect Immun*, v. 83, n. 5, p. 2156-2167, 2015.
- LACOUX, P. A. et al. Characterization of enterococcal isolates by restriction enzyme analysis of genomic DNA. *Epidemiol Infect*, v. 109, n. 1, p. 69, 1992.
- LAI, K. K. et al. The epidemiology of fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 24, n. 04, p. 264-268, 2003.
- Lam, M. M. Comparative analysis of the first complete *Enterococcus faecium* genome. *J Bacteriol*, v. 194, n. 9, p. 2334-2341, 2012.
- LANDMAN, D. et al. Ampicillin plus ciprofloxacin therapy of experimental endocarditis caused by multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother*, v. 36, n. 1, p. 253-258, 1995.
- LANDMAN, D.; QUALE, J. M. Management of infections due to resistant enterococci: a review of therapeutic options. *J Antimicrob Chemother*, v. 40, n. 2, p. 161-170, 1997.
- LARSEN, J. et al. Porcine and Human Community Reservoirs of *Enterococcus faecalis*, Denmark. *Emerg Infect Dis*, v. 17, n. 12, p. 2395, 2011.
- LARSEN, J. et al. Porcine-Origin Gentamicin-Resistant *Enterococcus faecalis* in Humans, Denmark. *Emerg Infect Dis*, v. 16, n. 4, p. 682, 2010.
- Lasch P. et al. Insufficient discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* isolates. *J Microbiol Methods*, v. 100, p. 58-69, 2014.

- LATASA, C. et al. Biofilm-associated proteins. *C R Biol*, v. 329, n. 11, p. 849-857, 2006.
- LAUDERDALE, T. L. et al. Effect of banning vancomycin analogue avoparcin on vancomycin-resistant enterococci in chicken farms in Taiwan. *Environ Microbiol*, v. 9, n. 3, p. 819-823, 2007.
- 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. Intra- and interspecies genomic transfer of the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. *PLoS ONE*, v. 6, n. 4, p. e16720, 2011.
- LEAVIS, H. et al. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J Bacteriol*, v. 186, n. 3, p. 672-682, 2004.
- LEAVIS, H. L. et al. Epidemic and nonepidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. *Emerg Infect Dis*, v. 9, n. 9, p. 1108-1115, 2003.
- LEAVIS, H. L. et al. 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.
- LEAVIS, H. L. et al. Insertion sequence-driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faecium*. *PLoS Pathog*, v. 3, n. 1, p. e7, 2007.
- LEAVIS, H. L.; BONTEN, M. J.; WILLEMS, R. J. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol*, v. 9, n. 5, p. 454-460, 2006.
- LEBRETON, F. et al. *ace*, Which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by Ers and is involved in virulence. *Infect Immun*, v. 77, n. 7, p. 2832-2839, 2009.
- LEBRETON, F. et al. D-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 55, n. 10, p. 4606-4612, 2011.
- LEBRETON, F. et al. Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. *Mbio*, v. 4, n. 4, p. e00534-13, 2013.
- LECLERCQ R. et al. Vancomycin resistance gene *vanC* is specific to *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob Agents and Chemother*, v. 36, n. 9, p. 2005-2008, 1992.
- LECLERCQ, R. et al. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med*, v. 319, n. 3, p. 157-161, 1988.
- LECLERCQ, R.; COUR VALIN, P. Resistance to glycopeptides in Enterococci. *Clin. Infect Dis*, v. 24, n. 4, p. 545-554, 1997.

- LEE P. P.; FERGUSON D. A Jr.; LAFFAN J. J. Vancomycin-Resistant *Enterococcus avium* Infections: Report of 2 Cases and a Review of *Enterococcus avium* Infections. *Infect Dis Clin Pract*, v. 12, n. 4, p. 239-244, 2004.
- LEE, C. E. et al. The incidence of antimicrobial allergies in hospitalized patients: implications regarding prescribing patterns and emerging bacterial resistance. *Arch Intern Med*, v. 160, n. 18, p. 2819-2822, 2000.
- LEE, C-R. et al. Strategies to Minimize Antibiotic Resistance. *Int J Environ Res Public Health*, v. 10, n. 9, p. 4274-4305, 2013.
- LEE, E. W. et al. EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*; v. 47, n. 12, p. 3733-3738, 2003.
- LEE, E-W. et al. Functional cloning and expression of *emeA* and characterization of EmeA, a multidrug efflux pump from *Enterococcus faecalis*. *Biol Pharm Bull*, v. 26, n. 2, p. 266-270, 2003.
- LEE, H. K. et al. Mutations in the *aph(2'')-Ic* gene are responsible for increased levels of aminoglycoside resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, n. 10, p. 3253-3256, 2002.
- LEE, S. J. et al. Antimicrobial resistance in community-acquired urinary tract infections: results from the Korean Antimicrobial Resistance Monitoring System. *J Infect Chemother*, v. 17, n. 3, p. 440-446, 2011.
- LEEKITCHAROENPHON, P. et al. Evaluation of whole genome sequencing for outbreak detection of *Salmonella enterica*. *PLoS One*, v. 9, n. 2, p. e87991, 2014.
- LEELAPORN, A. et al. A novel structure of Tn4001-truncated element, type V, in clinical enterococcal isolates and multiplex PCR for detecting aminoglycoside resistance genes. *Int J Antimicrob Agents*, v. 31, n. 3, p. 250-254, 2008.
- LEFORT, A. et al. Activity of LY333328 combined with gentamicin in vitro and in rabbit experimental endocarditis due to vancomycin-susceptible or -resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, n. 11, p. 3017-3021, 2000.
- LELLEK, H. et al. Emergence of daptomycin non-susceptibility in colonizing vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates during daptomycin therapy. *Int J Med Microbiol*; v. 305, n. 8, p. 902-909, 2015.
- LEONE, S.; NOVIELLO, S.; ESPOSITO, S. Combination antibiotic therapy for the treatment of infective endocarditis due to enterococci. *Infection*; v. 44, n. 3, p. 273-281, 2016.
- LEONE, S.; NOVIELLO, S.; ESPOSITO, S. Combination antibiotic therapy for the treatment of infective endocarditis due to enterococci. *Infection*, v. 44, n. 3, p. 273-281, 2016.
- LESTER, C. H. et al. Emergence of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* in Danish hospitals. *J Antimicrob Chemother*, v. 62, n. 6, p. 1203-1206, 2008.

- LEWIS C M, ZERVOS MJ. Clinical manifestations of enterococcal infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; . v. 9, n. 2, p. 111-117, 1990.
- LEWIS, J. S. et al. Emergence of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, n. 4, p. 1664-1665, 2005. Erratum in: *Antimicrob Agents Chemother*; v. 49, n. 5, p. 2152, 2005.
- LINDEN, P. K. Optimizing therapy for vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Semin Respir Crit Care Med*, v. 28, n. 6, p. 632-645, 2007.
- LINDENSTRAUSS, 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.
- LINDSTEDT, B. A. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis*, v. 26, n. 13, p. 2567-2582, 2005.
- LIPSKY, B. A. Urinary tract infections in men. Epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Ann Intern Med*, v. 110, n. 2, p. 138-150, 1989.
- LISTER, P. D. Pharmacodynamics of 750 mg and 500 mg doses of levofloxacin against ciprofloxacin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 44, n. 1, p. 43-49, 2002.
- LO, H. H.; CHENG, W. S. Distribution of virulence factors and association with *emm* polymorphism or isolation site among beta-hemolytic group G *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*. *APMIS*, v. 123, n. 1, p. 45-52, 2015.
- LÓPEZ, M. et al. Characterization of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in vancomycin-resistant enterococci of different origins. *J Chemother*, v. 23, n. 2, p. 87-91, 2011.
- LÓPEZ, M. et al. Detection and characterization of a ST6 clone of *vanB2-Enterococcus faecalis* from three different hospitals in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 31, n. 3, p. 257-260, 2012.
- LÓPEZ, M. et al. Diversity of clones and genotypes among vancomycin-resistant clinical *Enterococcus* isolates recovered in a Spanish hospital. *Microb Drug Resist*, v. 18, n. 5, p. 484-491, 2012.
- LOW, D. E. et al. Enterococcus: pathogens of the 90s. *Eur J Surg Suppl*; n. 573, p. 19-24, 1993.
- LOW, E. D. et al. Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the Sentry Antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin Infect Dis*, v. 32, n. Supplement 2, p. S133-S145, 2001.

- LOWE, A. M.; LAMBERT, P. A.; SMITH, A. W. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect Immun*, v. 63, n. 2, p. 703-706, 1995.
- LUGINBUHL, L. M. et al. Neonatal enterococcal sepsis: case-control study and description of an outbreak. *Pediatr Infect Dis J*, v. 6, n. 11, p. 1022-1026, 1987.
- 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.
- MAC, K. et al. Species identification and detection of vancomycin resistance genes in enterococci of animal origin by multiplex PCR. *Int J of Food Microbiol*, v. 88, n. 2-3, p. 305-309, 2003.
- MAHBUB, A. M. et al. Detection of a novel *aph(2'')* allele (*aph[2'']-Ie*) conferring high-level gentamicin resistance and a spectinomycin resistance gene *ant(9)-Ia (aad 9)* in clinical isolates of enterococci. *Microb Drug Resist*, v. 11, n. 3, p. 239-247, 2005.
- MAIDEN, M. C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, n. 6, p. 3140-3145, 1998.
- MAIDEN, M. C. J. et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol*, v. 11, n. 10, p. 728-736, 2013.
- MALATHUM, K. et al. Repetitive sequence-based PCR versus Pulsed-Field Gel Electrophoresis for typing of *Enterococcus faecalis* at the subspecies level. *J Clin Microbiol*, v. 36, n. 1, p. 211-215, 1998.
- MANCINI, E. M, BOTEN, M. J. Vancomycin-resistant enterococci: consequences for therapy and infection control. *Clin Microbiol Infect*, v. 11, n. s4, p. 43-56, 2005.
- MANDAL, S. M.; GHOSH, A. K.; PATI, B. R. Dissemination of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *S aureus* strains isolated from hospital effluents. *Am J Infect Control*, v. 43, n. 12, p. e87-e88, 2015.
- MANEERAT, K. et al. Virulence genes and genetic diversity of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from Thailand. *Transbound Emerg Dis*, v. 60, n. s2, p. 69-79, 2013.
- 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.
- MANSON, J. M.; HANCOCK, L. E.; GILMORE, M. S. Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 107, n. 27, p. 12269-12274, 2010.

- MASTERTON, R.G. Antibiotic heterogeneity. *Int J Antimicrob Agents*, v. 36, n. 3, p. S15–S18, 2010.
- MATOS, R. C. et al. *Enterococcus faecalis* prophage dynamics and contributions to pathogenic traits. *PLoS Genet*, v. 9, n. 6, p. e1003539, 2013.
- MATSUMOTO, T. et al. Nationwide survey of antibacterial activity against clinical isolates from urinary tract infections in Japan. *Int J Antimicrob Agents*, v. 37, n. 3, p. 210-218, 2011.
- MATSUMOTO, T. et al. No regional spread of vancomycin-resistant enterococci with vanA or vanB in Kitakyusyu, Japan. *J Infect Chemother*, v. 10, n. 6, p. 331-334, 2004.
- MAZAHERI NEZHAD FARD, R.; BARTON M. D.; HEUZENROEDER, M. W. Novel Bacteriophages in *Enterococcus* spp. *Curr Microbiol*, v. 60, n. 6, p. 400-406, 2010.
- MAZAHERI NEZHAD, F. R.; BARTON, M. D.; HEUZENROEDER, M. W. Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci. *Lett Appl Microbiol*, v. 52, n. 6, p. 559-564, 2011.
- MCBRIDE, S. M. et al. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS One*; v. 2, n. 7, p. e582, 2007.
- McBride, S. M. et al. Genetic variation and evolution of the pathogenicity island of *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*, v. 191, n. 10, p. 3392-3402, 2009.
- MCCRACKEN, M. et al. 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. 1505-1509, 2013.
- McGOWAN JE. Debate-Guidelines for control of glycopeptide-resistant enterococci (GRE) have not yet worked. *J Hosp Infect*; v. 57, n. 4, p. 281-284, 2004.
- MCGREGOR, J. C.; ALLEN, G. P.; BEARDEN, D.T. Levofloxacin in the treatment of complicated urinary tract infections and acute pyelonephritis. *Ther Clin Risk Manag*, v. 4, n. 5, p. 843, 2008.
- MCKESSAR, S. J. et al. Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*; v. 44, n. 11, p. 3224-3228, 2000.
- 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.
- MELAKU, S. et al. Antibiogram of nosocomial urinary tract infections in Felege Hiwot referral hospital, Ethiopia. *Afr Health Sci*, v. 12, n. 2, p. 134-139, 2012.
- MENDES, R. E. et al. Activity of oritavancin against Gram-positive clinical isolates responsible for documented skin and soft-tissue infections in European and US hospitals (2010-13). *J Antimicrob Chemother*, v. 70, n. 2, p. 498-504, 2015.

- MENDES, R. E. et al. Oritavancin microbiologic features and activity results from the surveillance program in the United States. *Clin Infect Dis*, v. 54, n. suppl 3, p. S203-S213, 2012.
- MENDES, R. E. et al. β -Lactamase Characterization of Gram-Negative Pathogens Recovered from Patients Enrolled in the Phase 2 Trials for Ceftazidime-Avibactam: Clinical Efficacies Analyzed against Subsets of Molecularly Characterized Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*; v. 60, n. 3, p. 1328-1335, 2016.
- MERCIER R. C.; KENNEDY C.; MEADOWS C. Antimicrobial activity of tigecycline (GAR-936) against *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* used alone and in combination. *Pharmacotherapy*, v. 22, n. 12, p. 1517-1523, 2002.
- MERLO, T. P.; DABUL, A. N.; CAMARGO, I. L. Different VanA elements in *E. faecalis* and in *E. faecium* suggest at least two origins of Tn1546 among VRE in a Brazilian hospital. *Microb Drug Resist*, v. 21, n. 3, p. 320-328, 2015.
- MERQUIOR, V. L. et al. Emergence and characterisation of *vanB* vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 4, p. 557-560, 2012.
- METZIDIE, E. et al. Spread of an unusual penicillin- and imipenem-resistant but ampicillin-susceptible phenotype among *Enterococcus faecalis* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*, v. 57, n. 1, p. 158-160, 2006.
- MEZIANE-CHERIF, D. et al. Structural and Functional Characterization of VanG d-Ala:d-Ser Ligase Associated with Vancomycin Resistance in *Enterococcus faecalis*. *J Biol Chem*, v. 287, n. 45, p. 37583-37592, 2012.
- 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. Erratum in: *BMC Genomics*. V. 16, n. 1, p. 689, 2015.
- MINGEOT-LECLERCQ, M-P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P. M. Aminoglycosides: Activity and Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 43, n. 4, p. 727-737, 1999.
- MIRANDA AG, SINGH KV, MURRAY BE. Determination of the chromosomal size of three different strains of *Enterococcus faecalis* and one strain of *Enterococcus faecium*. *DNA and Cell Biology*. 1992; 11:331-335.
- MITCHELL, M. et al. Enhancing MALDI Time-Of-Flight Mass Spectrometer Performance through Spectrum Averaging. *PLoS ONE*; v. 10, n. 3, p. e0120932, 2015.
- MIYAZAKI, S. et al. Cytotoxic effect of hemolytic culture supernatant from *Enterococcus faecalis* on mouse polymorphonuclear neutrophils and macrophages. *Microbiol Immunol*, v. 37, n. 4, p. 265-270, 1993.
- MOEHRING, R.W.; ANDERSON D. J. Antimicrobial stewardship as part of the infection prevention effort. *Curr Infect Dis Rep*, v. 14, n. 6, p. 592-600, 2012.

- MOELLERING, R. C. Chloramphenicol: an option for vancomycin-resistant enterococci? *J Crit Illness*, v. 11, p. 705, 1996.
- MOELLERING, R. C. et al. A novel mechanism of resistance to penicillin-gentamicin synergism in *Streptococcus faecalis*. *J Infect Dis*; v. 141, n. 1, p. 81-86, 1980.
- MOELLERING, R. C.; WEINBERG, A. N. Studies on antibiotic synergism against enterococci: II. Effect of various antibiotics on the uptake of ¹⁴C-labeled streptomycin by enterococci. *J Clin Invest*, v. 50, n. 12, p. 2580, 1971.
- MOHAMED, J. A.; MURRAY, B. E. Lack of correlation of gelatinase production and biofilm formation in a large collection of *Enterococcus faecalis* isolates. *J Clin Microbiol*, v. 43, n. 10, p. 5405-5407, 2005.
- MOHN, S. C.; HARTHUG, S.; LANGELAND, N. Outbreak of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* risk factors for faecal colonisation. *APMIS*, v. 108, n. 4, p. 296-302, 2000.
- MONTECALVO, M. A. et al. Natural history of colonization with vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 16, n. 12, p. 680-685, 1995.
- MOORE, L. S. P. et al. Homogeneity of antimicrobial policy, yet heterogeneity of antimicrobial resistance: antimicrobial non-susceptibility among 108717 clinical isolates from primary, secondary and tertiary care patients in London. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, n. 12, p. 3409-3422.
- MORAES, P. M. et al. Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. *J Appl Microbiol*, v. 113, n. 2, p. 318-328, 2012.
- MORAN, G. J. et al. Tedizolid for 6 days versus linezolid for 10 days for acute bacterial skin and skin-structure infections (ESTABLISH-2): a randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis*, v. 14, n. 8, p. 696-705, 2014.
- MORGAN-LINNELL, S. K. et al. Mechanisms accounting for fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 53, n. 1, p. 235-241, 2009.
- MORITZ, E. M.; HERGENROTHER, P. J. Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and plasmid-encoded in vancomycin-resistant enterococci. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, n. 1, p. 311-316, 2007.
- MOTAMEDIFAR, M. et al. Antimicrobial Susceptibility Pattern and Age Dependent Etiology of Urinary Tract Infections in Nemazee Hospital, Shiraz, South-West of Iran. *Int J Enteric Pathog*; v. 3, n. 3, p. e26931, 2015.
- MOURA, T. M. et al. Detection of *vanC1* gene transcription in vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 4, p. 453-456, 2013.
- MUKHOPADHYAY, R. DNA sequencers: The next generation. *Anal Chem*, v. 81, p. 1736-1740, 2009.

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.

MUNOZ-PRICE L. S.; LOLANS, K.; QUINN, J. P. Emergence of resistance to daptomycin during treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* infection. *Clin Infect Dis*, v. 41, n. 4, p. 565-566, 2005.

MURATANI T.; MATSUMOTO T. Bacterial resistance to antimicrobials in urinary isolates. *Int J Antimicrob Agents*, v. 24, p. 28-31, 2004.

MURRAY, B. E. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis*, v. 4, n. 1, p. 37, 1998.

MURRAY, B. E. et al. Comparison of two beta-lactamase-producing strains of *Streptococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 30, n. 6, p. 861-864, 1986.

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

MURRAY, B. E.; MEDERSKI-SAMAROJ, B. Transferable beta-lactamase. A new mechanism for in vitro penicillin resistance in *Streptococcus faecalis*. *J Clin Invest*, v. 72, n. 3, p. 1168, 1983.

MURUZÁBAL-LECUMBERRI, I. et al. Spread of an *Enterococcus faecalis* sequence type 6 (CC2) clone in patients undergoing selective decontamination of the digestive tract. *APMIS*, v. 123, n. 3, p. 245-251, 2015.

MUSCHOLL-SILBERHORN A. Cloning and functional analysis of Asa373, a novel adhesin unrelated to the other sex pheromone plasmid-encoded aggregation substances of *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol*, v. 34, n. 3, p. 620-630, 1999.

Muto, C.A. et al. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 24, n. 5, p. 362-386, 2003.

NALLAPAREDDY, S. R. et al. Diversity of *ace*, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of Ace during human infections. *Infect Immun*; v. 68, n. 9, p. 5210-5217, 2000.

NALLAPAREDDY, S. R. et al. *Enterococcus faecalis* adhesin, Ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect Immun*, v. 68, n. 9, p. 5218-5224, 2000.

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

- NALLAPAREDDY, S. R. et al. Molecular characterization of a widespread, pathogenic, and antibiotic resistance-receptive *Enterococcus faecalis* lineage and dissemination of its putative pathogenicity island. *J Bacteriol*, v. 187, n. 16, p. 5709-5718, 2005.
- NASAJ, M. et al. Prevalence of Virulence Factors and Vancomycin-resistant Genes among *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* Isolated from Clinical Specimens. *Iran J Public Health*, v. 45, n. 6, p. 806, 2016.
- NAVARRO, F.; COURVALIN, P. Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 38, n. 8, p. 1788-1793, 1994.
- NDIP, R. N. et al. Antimicrobial Resistance of Bacterial Agents of the Upper Respiratory Tract of School Children in Buea, Cameroon. *J Health Popul Nutr*, v. 26, n. 4, p. 397-404, 2008.
- NEELAKANTA, A. et al. Impact of changes in the NHSN catheter-associated urinary tract infection (CAUTI) surveillance criteria on the frequency and epidemiology of CAUTI in intensive care units (ICUs). *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 36, n. 03, p. 346-349, 2015.
- NEVES, F. P. et al. Emergence of the *vanA* genotype among *Enterococcus gallinarum* isolates colonising the intestinal tract of patients in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents*, v. 33, n. 3, p. 211-215, 2009.
- NGUYEN, L.; THOMPSON, C. J. Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm. *Trends Microbiol*, v. 14, n. 7, p. 304-312, 2006.
- NIEBEL, M. et al. Deletions in a ribosomal protein-coding gene are associated with tigecycline resistance in *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents*, v. 46, n. 5, p. 572-575, 2015.
- NILADRI, D. S.; KUHU, P. Antimicrobial profile of urinary pathogens to determine empirical therapy for urinary tract infections in a rural teaching hospital of west Bengal. *J Drug Deliv Ther*, v. 3, p. 16-19, 2013.
- NISHIMOTO, Y. et al. Analysis of the prevalence of tetracycline resistance genes in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a Japanese hospital. *Microb Drug Resist*; v. 11, n. 2, p. 146-153, 2005.
- NISHIYAMA, M.; IGUCHI A.; SUZUKI, Y. Identification of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* as *vanC*-type Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) from sewage and river water in the provincial city of Miyazaki, Japan. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, v. 50, n. 1, p. 16-25, 2015.
- NORRIS, A. H. et al. Chloramphenicol for the treatment of vancomycin-resistant enterococcal infections. *Clin Infect Dis*, v. 20, n. 5, p. 1137-1144, 1995.
- NOSKIN, G. A. et al. High-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis* bacteremia. *J Infect Dis*, v. 164, n. 6, p. 1212-1215, 1991.

- NOSKIN, G. A. et al. Recovery of vancomycin-resistant enterococci on fingertips and environmental surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 16, n. 10, p. 577-581, 1995.
- NOVAIS, C. et al. Diversity of *Tn1546* and its role in the dissemination of vancomycin-resistant enterococci in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 52, n.3, p. 1001-1008, 2008.
- NOVAIS, C. et al. Spread of multidrug-resistant *Enterococcus* to animals and humans: an underestimated role for the pig farm environment. *J Antimicrob Chemother*, v. 68, n. 12, p. 2746-2754, 2013.
- NTOKOU, E. et al. Intensive care unit dissemination of multiple clones of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother*, v. 67, n. 8, p. 1819-1823, 2012.
- OANCEA, C. et al. Conjugative transfer of the virulence gene, *esp*, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother*, v. 54, n. 1, p. 232-235, 2004.
- OFNER-AGOSTINI, M. et al. Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. Vancomycin-resistant enterococci in Canada: results from the Canadian nosocomial infection surveillance program, 1999-2005. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 29, n. 03, p. 271-274, 2008.
- OH, J. Y. et al. Phenotypic and genotypic differences of the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from humans and poultry in Korea. *J Microbiol* (Seoul, Korea), v. 45, n. 5, p. 466-472, 2007.
- OLIVA, A. et al. Activities of fosfomycin and rifampin on planktonic and adherent *Enterococcus faecalis* strains in an experimental foreign-body infection model. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 58, n. 3, p. 1284-1293, 2014.
- OLMSTED, S. B. et al. A plasmid-encoded surface protein on *Enterococcus faecalis* augments its internalization by cultured intestinal epithelial cells. *J Infect Dis*, v. 170, n. 6, p. 1549-1556, 1994.
- 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.
- ONO, S.; MURATANI, T.; MATSUMOTO, T. Mechanisms of resistance to imipenem and ampicillin in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, n. 7, p. 2954-2958, 2005.
- 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.

- OSTROWSKY, B. E. et al. A cluster of VanD vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: molecular characterization and clinical epidemiology. *J Infect Dis*, v. 180, n. 4, p. 1177-1185, 1999.
- OSUKA, H. et al. High-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* causing invasive infection: Twelve-year surveillance in the Minami Ibaraki Area. *J Infect Chemother*, v. 22, n. 1, p. 61-63, 2016.
- OYAMADA, Y. et al. Combination of known and unknown mechanisms confers high-level resistance to fluoroquinolones in *Enterococcus faecium*. *J Med Microbiol*, v. 55, n. 6, p. 729-736, 2006.
- PADMASINI, E. et al. Distribution of *cylA*, *esp*, *asa1*, *hyl* and *gelE* virulence genes among clinical isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *BMC Infect Dis*, v. 14, n. 3, p. P32, 2014.
- PAGANELLI, F. L.; WILLEMS, R. J.; LEAVIS H. L. Optimizing future treatment of enterococcal infections: attacking the biofilm? *Trends Microbiol*, v. 20, n. 1, p. 40-49, 2012.
- PALAZZO, I. C. Changes in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing outbreaks in Brazil. *J Hosp Infect*, v. 79, n. 1, p. 70-74, 2011.
- PALMER A.C.; KISHONY R. Understanding, predicting and manipulating the genotypic evolution of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Genet.* v. 14, n. 4, p. 243-248, 2013.
- PALMER, K. L. et al. Comparative genomics of enterococci: variation in *Enterococcus faecalis*, clade structure in *E. faecium*, and defining characteristics of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*. *MBio*; v. 3, n. 1, p. e00318-11, 2012.
- 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*, Colombia. *Emerg Infect Dis*, v. 8, n. 9, p. 961-965, 2002.
- PANESSO, D. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in South American hospitals. *J Clin Microbiol*, v. 48, n. 5, p. 1562-1569, 2010.
- PANKEY G.; ASHCRAFT D.; PATEL N. In vitro synergy of daptomycin plus rifampin against *Enterococcus faecium* resistant to both linezolid and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, n. 12, p. 5166-5168, 2005.
- PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS, M. et al. Risk factors for enterococcal infection and colonization by vancomycin-resistant enterococci in critically ill patients. *Infection*, v. 42, n. 6, p. 1013-1022, 2014.
- PAPAPARASKEVAS, J. et al. Diversity among high-level aminoglycoside-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother*, v. 45, n. 3, p. 277-283, 2000.

- PARK, I. J. et al. Genetic rearrangements of Tn1546 -like elements in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates collected from hospitalized patients over a seven-year period. *J Clin Microbiol*, v. 45, n. 12, p. 3903-3908; 2007.
- PARK, S. H. et al. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bloodstream infections among patients with neutropenia over a 6-year period in South Korea. *Microb Drug Resist*, v. 17, n. 1, p. 59-65, 2011.
- PASA-TOLIC, L. et al. Ultrahigh-resolution matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectra of peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, v. 30, n. 6, p. 825-833, 1995.
- PATEL, R. et al. Determination of 16S rRNA sequences of enterococci and application to species identification of nonmotile *Enterococcus gallinarum* isolates. *J Clin Microbiol*, v. 36, n. 11, p. 3399-3407, 1998.
- PATEL, R. et al. In vitro activity of GAR-936 against vancomycin-resistant enterococci, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 38, n. 3, p. 177-179, 2000.
- PATTERSON, J. E. et al. An analysis of 110 serious enterococcal infections. Epidemiology, antibiotic susceptibility, and outcome. *Medicine (Baltimore)*, v. 74, n. 4, p. 191-200, 1995.
- PATTI, G. J. et al. Vancomycin and oritavancin have different modes of action in *Enterococcus faecium*. *J Mol Biol*, v. 392, n. 5, p. 1178-1191, 2009.
- PAULSEN, I. T. et al. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*, v. 299, n. 5615, p. 2071-2074, 2003.
- PEGUES, D. A. et al. Emergence and dissemination of a highly vancomycin-resistant *vanA* strain of *Enterococcus faecium* at a large teaching hospital. *J Clin Microbiol*, v. 35, n. 6, p. 1565-1570, 1997.
- PENAS, P. P. et al. Analysis of genetic lineages and their correlation with virulence genes in *Enterococcus faecalis* clinical isolates from root canal and systemic infections. *J Endod*, v. 39, n. 7, p. 858-864, 2013.
- PENDLETON, J. N.; GORMAN, S. P, GILMORE, B. F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther*, v. 11, n. 3, p. 297-308, 2013.
- PEREIRA, G. H. et al. Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital: the lack of effect of measures directed mainly by surveillance cultures and differences in response between *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Am J Infect Control*, v. 38, n. 5, p. 406-409, 2010.
- PEREZ, M. et al. IS256 abolishes gelatinase activity and biofilm formation in a mutante of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecalis* V583. *Can J Microbiol*, v. 61, n. 7, p. 517-519, 2015.

PERICÁS, J. M. et al. Enterococcal endocarditis revisited. *Future Microbiol*, v. 10, n. 7, p. 1215-1240, 2015.

PÉRICHON, B.; COURVALIN, P. VanA-Type Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*; v. 53, n. 11, p. 4580-4587, 2009.

PERRY, D. J.; FORD, M.; GOULD, F. K. Susceptibility of enterococci to ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother*, v. 34, n. 2, p. 297–298, 1994.

PETERSEN, P. J. et al. In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time–kill kinetic analysis. *J Antimicrob Chemother*, v. 57, n. 3, p. 573-576, 2006.

PETERSON, J. et al. A double-blind, randomized comparison of levofloxacin 750 mg once-daily for five days with ciprofloxacin 400/500 mg twice-daily for 10 days for the treatment of complicated urinary tract infections and acute pyelonephritis. *Urology*, v. 71, n. 1, p. 17-22, 2008.

PFALLER, M. A. *Manual of Clinical Microbiology*. 9. ed. Washington: ASM Press, 2007. p. 255–289.

PFALLER, M. A. Molecular epidemiology in the care of patients. *Arch Pathol Lab Med*, v. 123, n. 11, p. 1007–1010, 1999.

PFALLER, M. A. Survey of bloodstream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 33, n. 4, p. 283-297, 1999.

PHUKAN, C. et al. Emergence of *vanA* gene among vancomycin-resistant enterococci in a tertiary care hospital of North-East India. *Indian J Med Res*, v. 143, n. 3, p. 357-361, 2016.

PILLAI, S. K. et al. Prevalence Of The *fsr* locus in *Enterococcus faecalis* infections. *J. Clin. Microbiol*, v. 40, n. 7, p. 2651-2652, 2002.

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.

PINKSTON, K. L. et al. The Fsr quorum-sensing system of *Enterococcus faecalis* modulates surface display of the collagen-binding MSCRAMM Ace through regulation of *gelE*. *J Bacteriol*, v. 193, n. 17, p. 4317-4325, 2011.

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.

PIPER G. L.; KAPLAN L. J. Antibiotic heterogeneity optimizes antimicrobial prescription and enables resistant pathogen control in the intensive care unit. *Surg Infect (Larchmt)*, v. 13, n. 4, p. 194-202, 2012.

- POETA, P. et al. Detection of antimicrobial activities and bacteriocin structural genes in faecal enterococci of wild animals. *Microbiol Res*, v. 162, n. 3, p. 257-263, 2007.
- POGUE, J. M. et al. Determination of risk factors associated with isolation of linezolid-resistant strains of vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 28, n. 12, p. 1382-1388, 2007.
- POLIDORI, M. et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) bacteremia in infective endocarditis successfully treated with combination daptomycin and tigecycline. *J. Chemother* (Florence Italy), v. 23, n. 4, p. 240, 2011.
- PORTILLO, A. et al. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, n. 4, p. 967-971, 2000.
- POULSEN, L. L. et al.. *Enterococcus faecalis* Clones in Poultry and in Humans with Urinary Tract Infections, Vietnam. *Emerg Infect Dis*, v. 18, n. 7, p. 1096, 2012.
- PREMATUNGE, C. et al. VRE and VSE Bacteremia Outcomes in the Era of Effective VRE Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 37, n. 01, p. 26-35, 2016.
- PRICE, J. R. et al. Whole-genome sequencing shows that patient-to-patient transmission rarely accounts for acquisition of *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *Clin Infect Dis*, v. 58, n. 5, p. 609-618, 2014.
- PROTONOTARIOU, E. Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Greece between 2002 and 2007. *J Hosp Infect*, v. 75, n. 3, p. 225-227, 2010.
- PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA. Canadian Antimicrobial Resistance Surveillance System—report 2016. 2016. Disponível em: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/drugs-health-products/canadian-antimicrobial-resistance-surveillance-system-report-2016.html>. Acesso em 10 de nov. de 2016.
- QIN, X. et al. Complete genome sequence of *Enterococcus faecium* strain TX16 and comparative genomic analysis of *Enterococcus faecium* genomes. *BMC Microbiol*, v. 12, n. 1, p. 135, 2012.
- QIN, X. et al. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect Immun*, v. 68, n. 5, p. 2579-2586, 2000.
- QU, T. T. et al. Genotypic diversity and epidemiology of high-level gentamicin resistant *Enterococcus* in a Chinese hospital. *J Infect*, v. 52, n. 2, p. 124-130, 2006.
- QUEDNAU, M. et al. Identification of clinically important species of *Enterococcus* within 1 day with randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Curr Microbiol*, v. 36, n. 6, p. 332-336, 1998.

- QUIÑONES, D. et al. Enterococci spp. isolated from Cuba: species frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile. *Diagn. Microbiol Infect Dis*, v. 51, n. 1, p. 63-67, 2005.
- QUIÑONES, D.; KOBAYASHI, N.; NAGASHIMA S. Molecular epidemiologic analysis of *Enterococcus faecalis* isolates in Cuba by Multilocus Sequence Typing. *Microb Drug Resist*, v. 15, n. 4, p. 287-293, 2009.
- RAHIM, S. et al. Linezolid-resistant, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection in patients without prior exposure to linezolid. *Clin Infect Dis*, v. 36, n. 11, p. e146-e148, 2003.
- RAHIMI, F. et al. Distribution of enterococcal species and detection of vancomycin resistance genes by multiplex PCR in Tehran sewage. *Iran Biomed J*, v. 11, n. 3, p. 161-167, 2007.
- RAKITA, R. M. et al. *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. *Infect immun*, v. 67, n. 11, p. 6067-6075, 1999.
- RAMASWAMY, D. P.; AMODIO-GROTON, M; SCHOLAND, S. J. Use of daptomycin in the treatment of vancomycin-resistant enterococcal urinary tract infections: a short case series. *BMC Urol*, v. 13, n. 1, p. 33, 2013.
- RAMBALDI, M. et al. Combination of co-trimoxazole and ciprofloxacin as therapy of a patient with infective endocarditis caused by an enterococcus highly resistant to gentamicin. *J Antimicrob Chemother*, v. 40, n. 5, p. 737-738, 1997.
- RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*, v. 13, n. 6, p. 151-171, 2010.
- RAO, S. C.; AHMED, M.; HAGAN, R. One dose per day compared to multiple doses per day of gentamicin for treatment of suspected or proven sepsis in neonates. *Cochrane Database Syst Rev*, n. 11, p. CD005091, 2011.
- RAO, Y. et al. Trisaccharide mimetics of the aminoglycoside antibiotic neomycin. *Org Biomol Chem*, v. 4, n. 7, p. 1328-1337, 2006.
- RASKO, D. A. et al. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *N Engl J Med*, v. 365, n. 8, p. 709-717, 2011.
- RATTANAUMPAWAN, P. et al. Risk factors for fluoroquinolone resistance in *Enterococcus* urinary tract infections in hospitalized patients. *Epidemiol Infect*. v. 139, n. 06, p. 955-961, 2011.
- RAVEN, K. E. et al. Genome-based characterization of hospital-adapted *Enterococcus faecalis* lineages. *Nat Microbiol*, v. 1, p. 15033, 2016.
- RENDU, W. et al. Evidence supporting an intentional Neandertal burial at La Chapelle-aux-Saints. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 111, n. 1, p. 81-86, 2014.

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.

REYNAUD AF GEIJERSSTAM, A. et al. Comparative analysis of virulence determinants and mass spectral profiles of Finnish and Lithuanian endodontic *Enterococcus faecalis* isolates. *Oral Microbiol Immunol*, v. 22, n. 2, p. 87-94, 2007.

REZVANI, J. et al. Frequency of VanA, VanB and VanH variants amongst vancomycin-resistant enterococci isolated from patients in central region of Iran. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, v. 9, n. 4, p. 308-315, 2016.

RIBAS, R. M. et al. Vancomycin-resistant VanA phenotype *Enterococcus faecalis*. First case in Minas Gerais state and epidemiological considerations. *Braz J Infect Dis*, v. 11, n. 4, p. 439-440, 2007.

RICAURTE, J. C. et al. Chloramphenicol treatment for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia. *Clin Microbiol Infect*, v. 7, n. 1, p. 17-21, 2000.

RICE L. B.; ELIOPOULOS G. M.; MOELLERING R. C. In vitro synergism between daptomycin and fosfomycin against *Enterococcus faecalis* isolates with high-level gentamicin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 33, n. 4, p. 470-473, 1989.

RICE, L. B. et al. Penicillin-Binding Protein 5 and Expression of Ampicillin Resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 45, n. 5, p. 1480-1486, 2001.

RICE, L.B.; CARIAS, L.L. Transfer of Tn5385, a composite, multiresistance chromosomal element from *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*, v. 180, n. 3, p. 714-721, 1998.

RICE, L.B.; CARIAS, L.L.; MARSHALL, S.H. Tn5384, a composite enterococcal mobile element conferring resistance to erythromycin and gentamicin whose ends are directly repeated copies of IS256. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 39, n. 5, p. 1147-1153, 1995.

RICH, R. L. et al. Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J Biol Chem*, v. 274, n. 38, p. 26939-26945, 1999.

RICHARDS, M. J. et al. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 21, n. 08, p. 510-515, 2000

ROBERTS, J. C. et al. Molecular epidemiology of the *fsr* locus and of gelatinase production among different subsets of *Enterococcus faecalis* isolates. *J Clin Microbiol*, v. 42, n. 5, p. 2317-2320, 2004.

ROBICSEK, A. et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med*, v. 12, n. 1, p. 83-88, 2006.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M. et al. Qnr-like pentapeptide repeat proteins in Gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother*, v. 61, n. 6, p. 1240-1243, 2008.

- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, M. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother*, v. 17, n. 2, p. 149-182, 2011.
- ROH, J. H. et al. The two-component system GrvRS (EtaRS) regulates ace expression in *Enterococcus faecalis* OG1RF. *Infect Immun*, v. 83, n. 1, p. 389-395, 2015.
- ROSSI, F. et al. Horizontal gene transfer among microorganisms in food: current knowledge and future perspectives. *Food Microbiol*, v. 42, p. 232-243, 2014.
- ROSVOLL, T. C. et al. Increased high-level gentamicin resistance in invasive *Enterococcus faecium* is associated with *aac(6')Ie-aph(2'')Ia*-encoding transferable megaplasmids hosted by major hospital-adapted lineages. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 66, n. 2, p. 166-176, 2012.
- RUDY, M. et al. Antibiotic susceptibility analysis of *Enterococcus* spp. isolated from urine. *Przegl Lek*, v. 61, n. 5, p. 473-476, 2003.
- RUIZ, E. et al. Changes in ciprofloxacin resistance levels in *Enterobacter aerogenes* isolates associated with variable expression of the *aac(6')-Ib-cr* gene. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 56, n. 2, p. 1097-1100, 2012.
- RUIZ-GARBAJOSA, P. et al. High-density fecal *Enterococcus faecium* colonization in hospitalized patients is associated with the presence of the polyclonal subcluster CC17. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 31, n. 4, p. 519-522, 2012.
- RUIZ-GARBAJOSA, P. et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *J Clin Microbiol*, v. 44, n. 6, p. 2220-2228, 2006.
- RUMPEL, S. et al. Structure and DNA-binding properties of the cytolysin regulator CylR2 from *Enterococcus faecalis*. *EMBO J*; v. 23, n. 18, p. 3632-3642, 2004.
- RUOFF, K. L. et al. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol*, v. 28, n. 3, p. 435-437, 1990.
- SAAGER, B. et al. Molecular characterisation of linezolid resistance in two vancomycin-resistant (VanB) *Enterococcus faecium* isolates using Pyrosequencing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; v. 27, n. 9, p. 873-878, 2008.
- SABIA, C. et al. Detection of bacteriocin production and virulence traits in vancomycin-resistant enterococci of different sources. *J Appl Microbiol*, v. 104, n. 4, p. 970-979, 2008.
- SABOL, K. et al. Emergence of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, n. 4, p. 1664-1665, 2005.
- SADER, H. S. et al. Daptomycin activity tested against 164457 bacterial isolates from hospitalised patients: summary of 8 years of a Worldwide Surveillance Programme (2005-2012). *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 43, n. 5, p. 465-469, 2014.

- SADER, H. S.; JONES, R. N. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria isolated from US medical centers: results of the Daptomycin Surveillance Program (2007-2008). *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 65, n. 2, p. 158-162, 2009.
- SADER, H. S.; MOET, G.; JONES, R. N. Update on the in vitro activity of daptomycin tested against 17,193 Gram-positive bacteria isolated from European medical centers (2005–2007). *J Chemother*, v. 21, n. 5, p. 500-506, 2009.
- SAEEDI, B. et al. Genetic relatedness of *Enterococcus faecalis* isolates with high-level gentamicin resistance from patients with bacteraemia in the south east of Sweden 1994-2001. *Scand J Infect Dis*, v. 36, n. 6-7, p. 405-409, 2004.
- SAFDAR, A. et al. Prosthetic valve endocarditis due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: treatment with chloramphenicol plus minocycline. *Clin Infect Dis*, v. 34, n. 11, p. e61-e63, 2002.
- SAKOULAS, G. et al. Ampicillin enhances daptomycin- and cationic host defense peptide-mediated killing of ampicillin- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 56, n. 2, p. 838-844, 2012.
- SAKOULAS, G. et al. Ceftaroline restores daptomycin activity against daptomycin-nonsusceptible vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 58, n. 3, p. 1494-1500, 2014.
- SALEH-MGHIR, A. et al. Activity and diffusion of LY333328 in experimental endocarditis due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 43, n. 1, p. 115-120, 1999.
- 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.
- SÁNCHEZ-DÍAZ, A. M. et al. The rise of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* high-risk clones as a frequent intestinal colonizer in oncohaematological neutropenic patients on levofloxacin prophylaxis: a risk for bacteraemia? *Clin Microbiol Infect*, v. 22, n. 1, p. 59. e1-59. e8, 2016.
- SANTAGATI, M.; CAMPANILE, F.; STEFANI, S. Genomic diversification of enterococci in hosts: the role of the mobilome. *Front Microbiol*, v. 3, p. 95, 2012.
- SANTOS, S. F. Caracterização e diversidade molecular do transposon Tn1546, carreador do gene *vanA*, responsável pela expressão de resistência à vancomicina, em amostras clínicas de diferentes espécies de *Enterococcus*. Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2014.
- SARAVOLATZ, L. D.; STEIN, G. E.; JOHNSON, L. B. Telavancin: a novel lipoglycopeptide. *Clin Infect Dis*, v. 49, n. 12, p. 1908-1914, 2009.
- SAVA, IG.; HEIKENS, E.; HUEBNER, J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect*, v. 16, n. 6, p. 533-540, 2010.

- SAVOR, C. et al. Comparison of genomic methods for differentiating strains of *Enterococcus faecium*: assessment using clinical epidemiologic data. *J Clin Microbiol*, v. 36, n. 11, p. 3327-3331, 1998.
- SCHLIEVERT, P. M. *Enterococcus faecalis* endocarditis severity in rabbits is reduced by IgG Fabs interfering with aggregation substance. *PLOS One*, v. 5, n. 10, p. e13194, 2010.
- SCHUTT A. C; BOHM N. M. Multidrug-resistant *Enterococcus faecium* endocarditis treated with combination tigecycline and high-dose daptomycin. *Ann Pharmacother*, v. 43, n. 12, p. 2108-2112, 2009.
- SEFTON, A. M. Mechanisms of antimicrobial resistance: Their clinical relevance in the new millennium. *Drugs*, v. 62, n. 4, p. 557-566, 2002.
- SEMEDO, T. et al. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *J Clin Microbiol*, v. 41, n. 6, p. 2569-2576, 2003.
- SENNEVILLE, E. et al. Towards a definition of daptomycin optimal dose: Lessons learned from experimental and clinical data. *Int J Antimicrob Agents*, v. 47, n. 1, p. 12-19, 2016.
- SHANKAR, N. et al. Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int J Med Microbiol*, v. 293, n. 7-8, p. 609-618, 2004.
- SHANKAR, N. et al. Presence of Pathogenicity Island Genes in *Enterococcus faecalis* Isolates from Pigs in Denmark . *J Clinical Microbiol*, v. 44, n. 11, p. 4200-4203, 2006.
- SHANKAR, N. et al. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun*, v. 69, n. 7, p. 4366-4372, 2001.
- 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.
- SHANKAR, V.; BAGHDAYAN, A. S.; GILMORE, M. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature*, v. 417, n. 6890, p. 746-750, 2002.
- 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, p. 34-39, 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.
- SHARIFI-RAD, M. et al. First case of *vanA*-positive *Enterococcus mundtii* in human urinary tract infection in Iran. *New Microbes New Infect*, v. 11, p. 68-70, 2016.
- SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Differential expression of virulence-related genes in *Enterococcus faecalis* in response to biological cues in serum and urine. *Infect Immun*, v. 70, n. 8, p. 4344-4352, 2002.

- SHEPPARD, S. K. et al. Niche segregation and genetic structure of *Campylobacter jejuni* populations from wild and agricultural host species. *Mol Ecol*, v. 20, n. 16, p. 3484-3490, 2011.
- SHIRANO, M. et al. Regional spread of *vanA*- or *vanB*-positive *Enterococcus gallinarum* in hospitals and long-term care facilities in Kyoto prefecture, Japan. *Epidemiol Infect*, v. 139, n. 03, p. 430-436, 2011.
- SIEGEL, J. D. et al. Health care infection control practices advisory committee 2007. Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings. *Am J Infect Control*, v. 35, n. 10, p. S65-S164, 2007.
- SIERRA-HOFFMAN, M. et al. Combination therapy with ampicillin and daptomycin for treatment of *Enterococcus faecalis* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 56, n. 11, p. 6064-6064, 2012.
- SIEVERT, DM. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 34, n. 1, p. 1-14, 2013.
- SILVA-DEL TORO, S. L. et al. In vitro activity of tedizolid against linezolid-resistant staphylococci and enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 85, n. 1, p. 102-104, 2016.
- SILVEIRA, E. et al. Co-transfer of resistance to high concentrations of copper and first-line antibiotics among *Enterococcus* from different origins (humans, animals, the environment and foods) and clonal lineages. *J Antimicrob Chemother*, v. 69, n. 4, p. 899-906, 2014.
- SIMNER, P. J. et al. Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in Canadian hospitals (CANWARD study, 2007 to 2013). *Antimicrob Agents Chemother*, v. 59, n. 7, p. 4315-4317, 2015.
- SIMONSEN, G. S. et al. Prevalence of resistance to ampicillin, gentamicin and vancomycin in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from clinical specimens and use of antimicrobials in five Nordic hospitals. *J Antimicrob Chemother*, v. 51, n. 2, p. 323-331, 2003.
- SINGH, K. V.; LEWIS, R. J.; MURRAY, B. E. Importance of the *epa* locus of *Enterococcus faecalis* OG1RF in a mouse model of ascending urinary tract infection. *J Infect Dis*, v. 200, n. 3, p. 417-420, 2009.
- 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. et al. In vivo testing of an *Enterococcus faecalis efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 21, n. 4, p. 323-331, 1998.

SINGH, K. V.; NALLAPAREDDY, S. R.; MURRAY, B. E. Importance of the *ebp* (endocarditis- and biofilm-associated pilus) locus in the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* ascending urinary tract infection. *J Infect Dis*, v. 195, n. 11, p. 1671-1677, 2007.

SMITH, J. R. et al. β -Lactam combinations with daptomycin provide synergy against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother*, v. 70, n. 6, p. 1738-1743, 2015.

SMITH, J. R. et al. β -Lactams enhance daptomycin activity against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic models. *Antimicrob Agents Chemother*; v. 59, n. 5, p. 2842-2848, 2015.

SMITHSON, A. et al. Prevalence and risk factors for quinolone resistance among *Escherichia coli* strains isolated from males with community febrile urinary tract infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. v. 31, n. 4, p. 423-430, 2012.

SNITKIN, E. S. et al. Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing. *Sci Transl Med*, v. 4, n. 148, p. 148ra116, 2012.

SNYDMAN, D. R.; MCDERMOTT, L. A.; JACOBUS, N. V. Evaluation of in vitro interaction of daptomycin with gentamicin or beta-lactam antibiotics against *Staphylococcus aureus* and Enterococci by FIC index and timed-kill curves. *J Chemother*, v. 17, n. 6, p. 614-621, 2005.

SOARES, R. O. et al. Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. *Virulence*; v. 5, n. 5, p. 634-637, 2014.

SODERBLOM, T. et al. Alarming spread of vancomycin resistant enterococci in Sweden since 2007. *Euro Surveill*, v. 15, n. 29, p. 19620, 2010.

SOHEILI, S. et al. The *mazEF* toxin-antitoxin system as an attractive target in clinical isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Drug Des Devel Ther*, v. 9, p. 2553, 2015.

SOLHEIM, M. et al. Comparative genomic analysis reveals significant enrichment of mobile genetic elements and genes encoding surface structure-proteins in hospital-associated clonal complex 2 *Enterococcus faecalis*. *BMC Microbiol*; v. 11, n. 1, p. 3, 2011.

SOLHEIM, M. et al. Comparative genomics of *Enterococcus faecalis* from healthy Norwegian infants. *BMC Genomics*, v. 10, n. 1, p. 194, 2009.

SOLTANI, M. et al. Mechanisms of Resistance to Quinupristin-Dalfopristin among Isolates of *Enterococcus faecium* from Animals, Raw Meat, and Hospital Patients in Western Europe. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, n. 2, p. 433-436, 2000.

SOMILY, A. M. et al. Molecular epidemiology of vancomycin resistant enterococci in a tertiary care hospital in Saudi Arabia. *Microb Pathog*, v. 97, p. 79-83, 2016.

- SONG, J. Y. et al. Clinical and microbiological characteristics of vancomycin-resistant enterococci with the VanD phenotype and *vanA* genotype. *Jpn J Infect Dis*, v. 66, n. 1, p. 1-5, 2013.
- SOUZA, C. M. O. C. C.; ABRANTES, S. M. P. Ocorrência de *Enterococcus faecalis* em amostras de café torrado e moído comercializado no município do Rio de Janeiro. *Analytica, São Paulo*, v. 10, n. 56, p. 38-41, 2012.
- STANDIFORD, H.C. et al. Antimicrobial stewardship at a large tertiary care academic medical center: Cost analysis before, during, and after a 7-year program. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 33, n. 4, p. 338-345, 2012.
- STARLANDER, G.; TELLGREN-ROTH, C.; MELHUS, Å. Fatal acquisition of *vanD* gene during vancomycin treatment of septicaemia caused by *Enterococcus faecium*. *J Hosp Infect*, v. 4, n. 92, p. 409-410, 2016.
- STEVENS M. P.; EDMOND M. B. Endocarditis due to vancomycin-resistant enterococci: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis*, v. 41, n. 8, p. 1134-1142, 2005.
- STRZELECKI, J.; HRYNIEWICZ, W.; SADOWY, E. Gelatinase-associated phenotypes and genotypes among clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in Poland. *Pol J Microbiol*, v. 60, p. 287-92, 2011.
- SUN, H. et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. Clinical isolates recovered from hospitalized patients among several medical institutions in China. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 74, n. 4, p. 399-403, 2012.
- SUN, J. et al. Occurrence, population structure, and antimicrobial resistance of enterococci in marginal and apical periodontitis. *J Clin Microbiol*, v. 74, n. 4, p. 399-403, 2012.
- SUN, M. et al. The first report of the *vanC₁* gene in *Enterococcus faecium* isolated from a human clinical specimen. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 6, p. 712-715, 2014.
- SVEC, P. et al. *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 51, n. 4, p. 1567-1574, 2001.
- SWENSON, J. M. et al. Multilaboratory evaluation of screening methods for detection of high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *J Clin Microbiol*, v. 33, n. 11, p. 3008-3018, 1995.
- TACCONELLI E.; CATALDO M. A. Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE): transmission and control. *Int J Antimicrob Agents*, v. 31, n. 2, p. 99-106, 2008.
- TALAN, D. A. et al. Once daily, extended release ciprofloxacin for complicated urinary tract infections and acute uncomplicated pyelonephritis. *J Urol*, v. 171, n. 2, p. 734-739, 2004.
- 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.

TANG, J. et al. Identifying currents in the gene pool for bacterial populations using an integrative approach. *PLoS Comput Biol*, v. 5, n. 8, p. e1000455, 2009.

TANG, S. S.; APISARNTHANARAK, A.; HSUC, L.Y. Mechanisms of Beta-lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community and health care associated multidrug-resistant bacteria. *Adv Drug Deliv Rev.*, v. 78, p. 3 - 13, 2014.

TAYEBI, Z. et al. Frequency and antibiotic resistance pattern in gram positive uropathogens isolated from hospitalized patients with urinary tract infection in Tehran, Iran. *J Genes Microb Immun*; p. 1-9, 2014.

TEDIM, A. P. et al. Population biology of intestinal enterococcus isolates from hospitalized and nonhospitalized individuals in different age groups. *Appl Environ Microbiol*, v. 81, n. 5, p. 1820-1831, 2015.

TEIXEIRA L. M. et al. *Enterococcus*. In: JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; WARNOCK, D. W. (org.). *Manual of Clinical Microbiology*. 10. ed. Washington: ASM Press, 2011. p. 350-364.

TEIXEIRA, L. M, CARVALHO M. G.; FACKLAM, R. R. *Enterococcus*. In: MURRAY, B. E. et al. (org.). *Manual of Clinical Microbiology*. 9. ed. Washington: ASM Press, 2007. p. 430-442.

TEIXEIRA, L.M. et al. *Enterococcus*. In: JORGENSEN, J. H. et al. (org.). *Manual of Clinical Microbiology*. 11. ed. Washington: ASM Press, 2015. p. 403-421.

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

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, v. 33, n. 9, p. 2233, 1995.

TENOVER, F. C.; MCDONALD, L. C. Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. *Curr Opin Infect Dis*, v. 18, n. 4, p. 300-305, 2005.

TEO, J. W. P. et al. Detection of an Unusual *van* Genotype in a Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Hospital Isolate. *J Clin Microbiol*. v. 49, n. 12, p. 4297-4298, 2011.

THAL, L.A. et al. Tn924, a chromosome-borne transposon encoding high-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 38, n. 5, p. 1152-1156, 1994.

THOMPSON, R. L.; LAVIN B., TALBOT G. H. Endocarditis due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in an immunocompromised patient: cure by administering combination therapy with quinupristin/dalfopristin and high-dose ampicillin. *South Med J*, v. 96, n. 8, p. 818-821, 2003.

THURLOW, L. R. et al. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*, v. 78, n. 11, p. 4936-4943, 2010.

- TIAN, Y. et al. Mechanisms of linezolid resistance in staphylococci and enterococci isolated from two teaching hospitals in Shanghai, China. *BMC Microbiol*, v. 14, n. 1, p. 292, 2014.
- TING-TING, QU. et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci in Hangzhou, China. *J Antimicrob Chemother*, v. 60, n. 6, p. 1403-1405, 2007.
- TOGNERI, A; LOPARDO, H; CORSO, A. Bacteremia caused by *Enterococcus gallinarum* with a high level of glycopeptide resistance: 1st documented cases in Argentina. *Rev Argent Microbiol*, v. 35, n. 2, p. 96-99, 2002.
- TOLEDO-ARANA, A. et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, v. 67, n. 10, p. 4538-4545, 2001.
- TOMAYKO, J. F. et al. Comparison of the beta-lactamase gene cluster in clonally distinct strains of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 40, n. 5, p. 1170-1174, 1996.
- TOMAYKO, J. F.; MURRAY, B. E. Analysis of *Enterococcus faecalis* isolates from intercontinental sources by multilocus enzyme electrophoresis and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, v. 33, n. 11, p. 2903-2907, 1995.
- TOP, J. et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates. *J Clin Microbiol*, v. 42, n. 10, p. 4503-4511, 2004.
- TOP, J.; WILLEMS, R.; BONTEN, M: Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 52, n. 3, p. 297-308, 2008.
- TRAN, J. H; JACOBY, G. A. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*; v. 99, n. 8, p. 5638-5642, 2002
- TRAN, T. T. Efficacy of telavancin alone and in combination with ampicillin in a rat model of *Enterococcus faecalis* endocarditis.. *Antimicrob Agents Chemother*; p. AAC. 02489-16, 2017.
- TRAN, T. T. et al. Daptomycin-resistant *Enterococcus faecalis* diverts the antibiotic molecule from the division septum and remodels cell membrane phospholipids. *Mbio*, v. 4, n. 4, p. e00281-13, 2013.
- TRAN, T. T.; MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of drug resistance: daptomycin resistance. *Ann NY Acad Sci*. v. 1354, n. 1, p. 32-53, 2015.
- TSAI, J. C. et al. Identification of clinically relevant *Enterococcus* species by direct sequencing of *groES* and spacer region. *J Clin Microbiol*, v. 43, n. 1, p. 235-241, 2005.
- TSAI, S. F. et al. A New High-Level Gentamicin Resistance Gene, *aph(2'')-Id*. in *Enterococcus* spp." *Antimicrob Agents Chemother*, v. 42, n. 5, p. 1229-1232, 1998.

- TURABELIDZE, D. et al. Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol*, v. 38, n. 11, p. 4242-4245, 2000.
- TURNIDGE, J. Pharmacodynamics and dosing of aminoglycosides. *Infect Dis Clin North Am*, v. 17, n. 3, p. 503-528, 2003.
- TYSON, GH. et al. Using whole-genome sequencing to determine appropriate streptomycin epidemiological cutoffs for *Salmonella* and *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, v. 363, n. 4, p. fnw009, 2016.
- UDO, E. E. et al. Characterization of high-level aminoglycoside-resistant enterococci in Kuwait hospitals. *Microb Drug Resist*, v. 10, n. 2, p. 139-145, 2004.
- UTTLEY, A. H. et al. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*, v. 1, n. 8575-6, p. 57-58, 1988.
- VAKULENKO, S. B. et al. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47, n. 4, p. 1423-1426, 2003.
- 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 BELKUM, A. et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect*, v. 13, n. 3, p. 1-46, 2007.
- VAN DER AUWERA, P. et al. Influence of oral glycopeptides on the fecal flora of human volunteers: selection of highly glycopeptide-resistant enterococci. *J Infect Dis*, v. 173, n. 5, p. 1129-1136, 1996.
- VAN DER STARRE, W. E. et al. Risk factors for fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in adults with community-onset febrile urinary tract infection. *J Antimicrob Chemother*, v. 66, n. 3, p. 650-656, 2011.
- VAN HAL, S. J. et al. Evolutionary dynamics of *Enterococcus faecium* reveals complex genomic relationships between isolates with independent emergence of vancomycin resistance. *Microb Genom*, v. 2, n. 1, p. e000048, 2016.
- VAN NIEUWKOOP, C. et al. Chronic bacterial prostatitis and relapsing *Enterococcus faecalis* bacteraemia successfully treated with moxifloxacin. *J Infect*, v. 56, n. 2, p. 155-156, 2008.
- VAN SCHAİK, W. et al. Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. *BMC Genomics*, v. 11, n. 1, p. 239, 2010.
- VAN SCHAİK, W.; WILLEMS, R. J. Genome-based insights into the evolution of enterococci. *Clin Microbiol Infect*; v. 16, n. 6, p. 527-532, 2010.

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

VAN, TYNE D.; GILMORE, M. S. Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. *Annu. Rev. Microbiol*, v. 68, p. 337-356, 2014.

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.

VARAHAN, S. et al. Eep confers lysozyme resistance to *Enterococcus faecalis* via the activation of the extracytoplasmic function sigma factor SigV. *J Bacteriol*, v. 195, n. 14, p. 3125-3134, 2013.

VERGIS, E. N. et al. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clin Infect Dis*, v. 35, n. 5, p. 570-575, 2002.

VILELA, M. A. et al. Identification and molecular de characterization of *vanA*-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Northeast of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 7, p. 715-719, 2006.

WALKER, T. M. et al. Whole-genome sequencing to delineate Mycobacterium tuberculosis outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis*, v. 13, n. 2, p. 137-146, 2013.

WALTERS, M. S. et al. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* - Delaware, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, v. 64, n. 37, p. 1056, 2015.

WANG, G. et al. Identification of a novel clone, ST736, among *Enterococcus faecium* clinical isolates and its association with daptomycin nonsusceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*; v. 58, n. 8, p. 4848-4854, 2014.

WANG, J. S. et al. Central nervous system infections due to vancomycin-resistant enterococci: case series and review of the literature. *Int J Infect Dis*, v. 25, p. 26-31, 2014.

WANG, L. et al. Isolation of antimicrobial resistant bacteria in upper respiratory tract infections of patients. *3 Biotech*, v. 6, n. 2, p. 166, 2016.

WANG, Q. Y.; LI R. H.; SHANG, X. H. Urinary tract infection caused by *Enterococcus* isolates: aetiology and antimicrobial resistance patterns. *J Chemother*, v. 27, n. 2, p. 117-119, 2015.

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.

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

- WANG, Z. et al. Two novel functions of hyaluronidase from *Streptococcus agalactiae* are enhanced intracellular survival and inhibition of proinflammatory cytokine expression. *Infect Immun*, v. 82, n. 6, p. 2615-2625, 2014.
- WARDAL, E. et al. Abundance and diversity of plasmid-associated genes among clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. *Plasmid*, v. 70, n. 3, p. 329-342, 2013.
- WARDAL, E.; SADOWY, E.; HRYNIEWICZ, W. Complex nature of enterococcal pheromone-responsive plasmids. *Pol J Microbiol*, v. 59, n. 2, p. 79-87, 2010.
- WATANABE, S. et al. Genetic diversity of enterococci harboring the high-level gentamicin resistance gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* or *aph(2'')-Ie* in a Japanese hospital. *Microb Drug Resist*, v. 15, n. 3, p. 185-194, 2009.
- WATERS, C. M. et al. Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J Bacteriol*, v. 185, n. 12, p. 3613-3623, 2003.
- WAYNE, P. A. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. Pennsylvania: CLSI, 2011. p. 84-87.
- WEBER, P. et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a D-Ala:D-Ser ligase associated with VanG-type vancomycin resistance. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, v. 65, n. 10, p. 1024-1026, 2009.
- WELLS, C. L. et al. Inducible expression of *Enterococcus faecalis* aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes. *Infect Immun*, v. 68, n. 12, p. 7190-7194, 2000.
- WERNER, G. et al. High-level ciprofloxacin resistance among hospital-adapted *Enterococcus faecium* (CC17). *Int J Antimicrob Agents*, v. 35, n. 2, p. 119-125, 2010.
- WERNER, G. et al. Antibiotic resistant enterococci-tales of a drug resistance gene trafficker. *Int J Med Microbiol*, v. 303, n. 6, p. 360-379, 2013.
- WERNER, G. et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill*, v. 13, n. 47, p. pii: 19046, 2008.
- 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.
- WERNER, G.; KLARE, I.; WITT, W. The current MLVA typing scheme for *Enterococcus faecium* is less discriminatory than MLST and PFGE for epidemic-virulent, hospital-adapted clonal types. *BMC Microbiol*, v. 7, n. 1, p. 28, 2007.
- WIKLER, M. A. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. Pennsylvania: CLSI, 2009. p. 27-29.
- WILLEMS, R. J. et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg Infect Dis*, v. 11, n. 6, p. 821-828, 2005.

- WILLEMS, R. J. et al. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*, v. 35, n. 5, p. 872-900, 2011.
- WILLEMS, R. J. et al. Restricted gene flow among hospital subpopulations of *Enterococcus faecium*. *Mbio*, v. 3, n. 4, p. e00151-12, 2012.
- WILLEMS, R. J. L.; BONTEN, M. J. Glycopeptide-resistant Enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Curr Opin Infect Dis*, v. 20, n. 4, p. 384-390, 2007.
- WILLEMS, R. J. Molecular diversity and evolutionary relationships of Tn1546-like elements in enterococci from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 43, n. 3, p. 483-491, 1999.
- WILLIAMSON, R. et al. One or two low affinity penicillin-binding proteins may be responsible for the range of susceptibility of *Enterococcus faecium* to benzylpenicillin. *J Gen Microbiol*, v. 131, n. 8, p. 1933-1940, 1985.
- WOODFORD, N.; SOLTANI, M.; HARDY, K. J. Frequency of *esp* in *Enterococcus faecium* isolates. *Lancet*, v. 358, n. 9281, p. 584, 2001.
- WOODS, S. E. et al. Characterization of Multi-Drug Resistant *Enterococcus faecalis* Isolated from Cephalic Recording Chambers in Research Macaques (*Macaca spp.*). *PLoS ONE*, v. 12, n. 1, p. e0169293, 2017.
- XU, X. et al. *vanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 54, n. 11, p. 4643-4647, 2010.
- YANG, J. X. et al. Molecular characterization of resistance, virulence and clonality in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*: A hospital-based study in Beijing, China. *Infect Genet Evol*, v. 33, p. 253-260, 2015.
- YASMIN, A. et al. Comparative genomics and transduction potential of *Enterococcus faecalis* temperate bacteriophages. *J Bacteriol*, v. 192, n. 4, p. 1122-1130, 2010.
- 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.
- YEAN, C. Y. A nanoplex PCR assay for the rapid detection of vancomycin and bifunctional aminoglycoside resistance genes in *Enterococcus* species. *BMC Microbiol*, v. 7, n. 1, p. 112, 2007.
- YILMAZ, Y. et al. Bacterial Uropathogens Causing Urinary Tract Infection and Their Resistance Patterns Among Children in Turkey. *Iran Red Crescent Med J*, v. 18, n. 6, p. e26610, 2016.
- ZANELLA, R. C. et al. First confirmed case of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with VanA phenotype from Brazil: isolation from a meningitis case in São Paulo. *Microb Drug Resist*, v. 5, n. 2, p. 159-162, 1999.

ZAPUN, A.; CONTRERAS-MARTEL, C., vERNET, T. Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev*; . 32, n. 2, p. 361-385, 2008.

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, n. 5, p. 827-835, 2005.

ZERVOS, M. J, et al. High-level aminoglycoside-resistant enterococci. Colonization of nursing home and acute care hospital patients. *Arch Intern Med*, v. 147, n. 9, p. 1591-1594, 1987.

ZERVOS, M. J, et al. Single-concentration broth microdilution test for detection of high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *J Clin Microbiol*, v. 25, n. 12, p. 2443-2444, 1987.

ZERVOS, M. J. et al. High-level resistance to gentamicin in *Streptococcus faecalis*: risk factors and evidence for exogenous acquisition of infection. *J Infect Dis*, v. 153, n. 6, p. 1075-1083, 1986.

ZERVOS, M. J. et al. Nosocomial infection by gentamicin-resistant *Streptococcus faecalis*. An epidemiologic study. *Ann Intern Med*, v. 106, n. 5, p. 687-691, 1987.

ZHANEL, G. G.; SCHWEIZER, F.; KARLOWSKY, J. A. Oritavancin: mechanism of action. *Clin Infect Dis*; v. 54, suppl 3, p. S214-S219, 2012.

ZIRAKZADEH, A.; PATEL, R. Vancomycin-resistant enterococci: colonization, infection, detection, and treatment. *Mayo Clin Proc* , v. 81, p. 529-536, 2006.

ZISCHKA, M. et al. Comprehensive molecular, genomic and phenotypic analysis of a major clone of *Enterococcus faecalis* MLST ST40. *BMC Genomics*; v. 16, n. 1, p. 175, 2015.

ZOU, J.; SHANKAR, N. Surface protein Esp enhances pro-inflammatory cytokine expression through NF- κ B activation during enterococcal infection. *Innate Immun*, v. 22, n. 1, p. 31-39, 2016.