



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Clarissa Martins Christiano Melo

**Resistência aos antimicrobianos e análises genômicas comparativas de amostras de *Enterococcus* isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro**

Rio de Janeiro

2022

Clarissa Martins Christiano Melo

**Resistência aos antimicrobianos e análises genômicas comparativas de amostras de *Enterococcus* isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro**

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.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Vânia Lúcia Carreira Merquior

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Lúcia Martins Teixeira

Rio de Janeiro

2022

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

M528 Melo, Clarissa Martins Christiano.  
Resistência aos antimicrobianos e análises genômicas comparativas de amostras de *Enterococcus* isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro / Clarissa Martins Christiano Melo – 2022.  
112 f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Vânia Lúcia Carreira Merquior  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Lúcia Martins Teixeira

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

1. Enterococcus - Teses. 2. Água para Recreação - Microbiologia. 3. Água do Mar - Microbiologia. 4. Resistência microbiana a medicamentos. 5. Sequenciamento Completo do Genoma. I. Merquior, Vânia Lúcia Carreira. II. Teixeira, Lúcia Martins. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 576.8.06

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

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

---

Assinatura

---

Data

Clarissa Martins Christiano Melo

**Resistência aos antimicrobianos e análises genômicas comparativas de amostras de *Enterococcus* isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro**

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 17 de janeiro de 2022.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Lúcia Martins Teixeira

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Vânia Lúcia Carreira Merquior (Orientadora)

Faculdade de Ciências Médicas- UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ângela Correa de Freitas-Almeida

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Claudia de Paula Rosa Ignácio

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof. Dr. Felipe Piedade Gonçalves Neves

Universidade Federal Fluminense

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Adriana Rocha Faria

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2022

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta tese ao meu marido Arthur e a meus filhos Lucas, Julieta, Antonio e Clara, em agradecimento a todo apoio e compreensão e exemplo de que nada é em vão.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, pela saúde e disposição em todas as etapas deste projeto, mas sobretudo em sua etapa final de conclusão.

Aos meus pais Alfredo e Elisa que sempre me incentivaram por este caminho, desde o início.

Ao meu marido Arthur Melo por toda parceria, apoio, confiança, incentivo incansável e irrestrito. Aos meus filhos, cada qual ao seu modo, pelo entendimento de meus momentos de ausência, mas por ver seus olhinhos orgulhosos, no entendimento da importância de dedicação ao trabalho e estudo.

A todo carinho, compreensão, e muitos ensinamentos, acadêmicos e circunstanciais que levarei pra minha vida, proferidos por minhas queridas orientadoras, Prof<sup>a</sup> Vania Merquior e Prof<sup>a</sup> Lucia Teixeira. Resiliência deveria ser disciplina ministrada na pós-graduação, mas de todo modo, nosso caráter é forjado a medida que aprendemos a suplantar as dificuldades que se apresentam e quantas vezes isso nos é ensinado pelo exemplo, e quase sempre com um sorriso nos lábios. Palavras me faltam para ilustrar tamanha admiração e gratidão que nutro por ambas.

A todos os meus colegas da equipe do Laboratório de Apoio Biotecnológico (027), da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sem exceção contribuíram de alguma forma mais ou menos intensa, direta ou indiretamente, seja na ajuda com os experimentos que não saiam a contento, dicas para a melhor execução de uma determinada técnica, estudo juntos, palavras de incentivos, e até mesmo orações nos momentos de esgotamento físico e mental, que faz parte do crescimento profissional e moral que é o processo de doutoramento.

Seriam muitos os nomes a serem citados, que tiveram suma importância ao longo de minha trajetória acadêmica, os quais o exemplo me arrebatou. Incorreria no erro de esquecer de algum. De maneira mais próxima e direta gostaria de agradecer a minha “companheira de *Enterococcus*”, Suellen Ruvenal, pela perseverança nos momentos em que dividimos estudos em comum com amostras marinhas. Não é fácil romper padrões e repetir a técnica até que validemos um resultado. Bem como agradecer também as amigas Adriana Faria e Andrea Freitas pelos conselhos de quem já é mais experiente no estudo com amostras ambientais. A Stephanie Rodrigues por compartilhar comigo e toda a equipe seu amor e domínio das últimas técnicas de bioinformática genômica.

As queridas “patricias”, e por tantos anos companheiras de bairro e de transporte, fosse no ônibus, van, BRT, ou mais recentemente nas caronas da Carol Botelho, sempre

acompanhadas pela Jaqueline Moraes, que tornavam o trânsito mais suave e os engarrafamentos imperceptíveis. Mas o nome Jaqueline Moraes tem de aparecer aqui mais uma vez, porque além de grande amiga e quase irmã, foi ela minha primeira mentora, ainda na iniciação, me ensinou todo o básico, assim como até hoje a todos os que chegam, e mais além, que fazer ciência de ponta, exige que o básico seja bom, e para isto, recheiar os protocolos, reconferir todos os passos. Boas práticas de laboratório e garantia da qualidade ela ministra a todos os colegas, na maior modéstia, e sem dar conta do quão importante é seu trabalho. Gratidão imensa tenho por ela, e admiração.

Do momento presente chegando ao passado, agradeço a amiga Aline Rosa, incentivadora desde o pré-projeto do mestrado, a Tatiana Pinto a quem sempre admirei como concilia tamanho foco no que faz, mas mesmo com todas as vicissitudes, sem jamais perder o bom humor, e por fim ao amigo Felipe Piedade, de quem ainda guardo o primeiro desenho num rascunho, da explicação do que seria um PCR, e lá se vão 15 anos, e sigo aprendendo com ele na vida e na arte que é este ofício da pesquisa.

Agradeço a Universidade do Estado do Rio de Janeiro, por me receber como aluna, a todas as disciplinas estudadas, professores que tive a honra de conhecer o trabalho, e foram muitos. E como não poderia deixar de ser, ao laboratório de Apoio Biotecnológico (027), que durante os últimos 15 anos foi também meu lar, de muito aprendizado e crescimento não só tecnicista, mas moral. A Universidade é um local fecundo no aprendizado sobre tolerância e diversidade, pois ali, no objetivo de um assunto de estudo em comum, nos encontramos com outras realidades, caminhos se cruzam, e é preciso que estejamos atentos em tirar proveito desta experiência, que é a convivência com colegas por vezes tão distintos de nós, mas que sempre terão algo a nos ensinar. Sou profundamente grata, por tanto ter aprendido sobre Microbiologia, quanto em relacionamento interpessoal.

E por fim, e talvez o agradecimento mais importante, sem a qual eu não estaria aqui escrevendo esta tese, nem tampouco estes agradecimentos. Eu agradeço a minha tia Lúcia Teixeira que, na qualidade de tia, inspirou uma criança por volta de seus cinco anos em ser cientista como ela. Fez parecer ser a coisa mais legal do mundo, porque este era o seu mundo. Obrigada por me deixar fazer parte deste mundo, que será sempre seu, mas também meu, nosso. A menina de cinco anos agradece. A mulher de 36, também.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro para a execução do projeto.

Só uma mente educada pode compreender  
um pensamento diferente do seu,  
sem necessidade de aceitá-lo.

*Aristóteles*

## RESUMO

MELO, Clarissa Martins Christiano. **Resistência aos antimicrobianos e análises genômicas comparativas de amostras de *Enterococcus* isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro**. 2022. 112 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Diferentes fontes de poluição impactam os ambientes de águas praianas (AP), sendo a contaminação fecal extremamente relevante, considerando o risco à saúde humana. Nesses ambientes, os membros do gênero *Enterococcus* se destacam por apresentar grande capacidade de sobrevivência, aliada a um extenso arsenal de mecanismos intrínsecos e adquiridos de resistência aos antimicrobianos. Este estudo teve por objetivo caracterizar fenótipos e genótipos em 264 amostras de *Enterococcus* isoladas de águas de praias localizadas na zona sul da cidade do Rio de Janeiro (Botafogo, Copacabana, Flamengo, Ipanema e Leblon), com o propósito de avaliar atributos de multirresistência aos antimicrobianos (MRA). Além disso, a estrutura populacional e filogenia de amostras pertencentes às espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, obtidas de AP e de pacientes hospitalizados (PH) foram determinadas, para comparar aspectos relativos à biologia desses microrganismos em ambos os cenários. Pelo emprego de MALDI-TOF MS foram identificadas as seguintes espécies: *E. faecium* (N=126), *E. hirae* (N=93), *E. faecalis* (N=37), *E. gallinarum*, (N=3), *E. casseliflavus* (N=2), *E. asini*, *E. canistestini* e *E. villorum* (uma amostra cada). A taxa de MRA, segundo testes de disco-difusão, foi de 50,4%, e foram identificados 70 perfis distintos que incluíram amostras não susceptíveis a três ou mais classes de antimicrobianos. A presença de determinantes de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos, macrolídeos e tetraciclina foi investigada em amostras de *E. faecalis* e de *E. faecium* por metodologia de PCR. O perfil genotípico prevalente em *E. faecalis* correspondeu à presença concomitante de *ant(6)-Ia*, *erm(A)*, *erm(B)* e *tet(M)*, enquanto o perfil predominante entre *E. faecium* foi composto apenas por *mef(A)*. Foram selecionadas 22 amostras isoladas de AP (7 de *E. faecalis* e 15 de *E. faecium*), para análises por sequenciamento do genoma completo (WGS), além de 20 amostras obtidas de PH (10 de cada espécie), incluídas para fins comparativos. O tamanho médio do genoma em *E. faecalis* foi significativamente maior do que em *E. faecium*. As diferenças observadas entre amostras de mesma espécie, porém de origens distintas, não foram significativas. A estrutura populacional foi determinada por MLST deduzida a partir da análise do WGS. Foram identificados sete STs entre as amostras *E. faecalis* e 14 STs entre as de *E. faecium*. Em *E. faecalis*, o ST21 foi o prevalente e o único compartilhado tanto por amostras oriundas de AP, quanto de PH. Em *E. faecium* não foram observados STs compartilhados entre os dois cenários, sendo ST963 o prevalente em amostras isoladas de PH, enquanto os ST94 e ST361 se destacaram entre as obtidas de AP. Análises filogenéticas de ambas as espécies foram realizadas através da construção de matrizes de SNPs. As amostras de *E. faecalis* foram agrupadas em dois clados bem distintos. Já *E. faecium* mostrou um arranjo em dois clados, porém heterogêneo. O resistoma das amostras de *E. faecalis* isoladas de AP foi significativamente mais amplo do que o observado para *E. faecium*. Entretanto, entre amostras obtidas de PH ocorreu o inverso. Nos genomas de *E. faecalis* e *E. faecium* foram identificados 10 e 12 profagos, respectivamente. Não foram identificadas regiões associadas ao sistema CRISPR nas amostras de *E. faecium*. Por outro lado, para a espécie *E. faecalis*, sete amostras (cinco de AP; duas de PH) apresentaram CRISPR1, relacionado a proteína cas; enquanto 12 amostras, (sete de AP; cinco de PH), apresentaram CRISPR2. Os dados reforçam a necessidade do enfrentamento do problema da dispersão de amostras de enterococos multirresistentes aos antimicrobianos em nosso meio, chamando a atenção para urgência de uma abordagem multidisciplinar com a devida valorização da gestão adequada do ambiente aquático, sobretudo as regiões praianas.

Palavras chaves: *Enterococcus*. Águas praianas. Multirresistência. Antimicrobianos. Resistoma.

MLST. WGS.

## ABSTRACT

MELO, Clarissa Martins Christiano. **Antimicrobial resistance and comparative genomic analyses of *Enterococcus* isolates obtained from recreational beach waters in the city of Rio de Janeiro.** 2022. 112 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Different sources of pollution may impact marine environments (ME), being fecal contamination one of the most relevant, considering the risk to human health. In these environments, members of the genus *Enterococcus* are prominent due to their remarkable ability to survive, combined with an extensive arsenal of intrinsic and acquired mechanisms of resistance to antimicrobials. This study aimed to characterize phenotypes and genotypes among 264 *Enterococcus* strains isolated from water samples obtained in beaches located in the city of Rio de Janeiro (Botafogo, Copacabana, Flamengo, Ipanema and Leblon), to evaluate their antimicrobial multiresistance (AMR) traits. The population structure and phylogeny of isolates belonging to *E. faecalis* and *E. faecium* species were investigated and compared to those of isolates recovered from hospitalized patients (HP). The following species were identified by the use of MALDI-TOF MS: *E. faecium* (N=126), *E. hirae* (N=93), *E. faecalis* (N=37), *E. gallinarum*, (N=3), *E. casseliflavus* (N=2), *E. asini*, *E. canistestini* and *E. villorum* (one isolate each). The rate of AMR, as determined by disc-diffusion tests, was 50.4%, and 70 profiles were identified. The presence of determinants of resistance to high-level of aminoglycosides, macrolides and tetracycline was detected by PCR in *E. faecalis* and *E. faecium* isolates. The prevalent genotypic profile in *E. faecalis* corresponded to the concomitant presence of *ant(6')-Ia*, *erm(A)*, *erm(B)* and *tet(M)*, while a profile composed by only *mef(A)* was the most common in *E. faecium*. Twenty-two ME isolates (7 *E. faecalis* and 15 *E. faecium*) were analyzed by whole-genome sequencing (WGS), in addition to 20 HP isolates (10 of each species) that were included for comparative purposes. The average genome size among *E. faecalis* was significantly larger than among *E. faecium*. The differences observed among isolates belonging to the same species, but from different sources, were not significant. The population structure was determined by MLST, as deduced from WGS analyses. Seven STs were identified among *E. faecalis* and 14 STs among *E. faecium* isolates. ST21 was prevalent among *E. faecalis*, and it was identified in both scenarios (ME and HP isolates). Whereas no ST was shared by *E. faecium* isolates from distinct sources, ST963 was prevalent among HP isolates, and ST94 and ST361 predominated among ME isolates. Phylogenetic analysis of both species was performed through the construction of SNP matrices. *E. faecalis* isolates were grouped into two distinct clades. On the other hand, *E. faecium* showed a more heterogeneous arrangement in two clades. Resistomes were significantly more abundant among *E. faecalis* ME isolates than among *E. faecium*. However, the opposite occurred among HP isolates. Ten and 12 prophages were identified in the genomes of *E. faecalis* and *E. faecium*, respectively. No CRISPR system regions were identified in *E. faecium* genomes. On the other hand, seven *E. faecalis* isolates (five from ME; two from HP) showed CRISPR1, related to the cas protein; while 12 (seven ME; five HP) presented CRISPR2. The data reinforce the need to address the problem related to the dissemination of multidrug-resistant enterococci in natural environments, drawing the attention to the urgency of a multidisciplinary approach dealing with a proper management of the aquatic environment, especially in recreational coastal areas.

Keywords: *Enterococcus*. Marine environment. Multidrug resistance. Antimicrobials Resistome. MLST. WGS.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Frequência de diferentes espécies em 264 amostras de *Enterococcus* obtidas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro, em relação ao local de isolamento ..... 45
- Figura 2 – Árvores filogenéticas baseadas em SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) construídas através de máxima verossimilhança e enraizamento pelo ponto médio (*midpoint rooting*) de amostras de *Enterococcus faecalis* (A) e *Enterococcus faecium* (B) isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro ..... 69
- Figura 3 – Árvore filogenética baseada na presença/ausência de genes no genoma acessório de amostras de *Enterococcus* isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro ..... 70
- Figura 4 – Árvore de filogenia construída através de máxima verossimilhança, utilizando matriz de SNPs e enraizamento pelo ponto médio (*midpoint rooting*), demonstrando o resistoma, viruloma, profagos e sistema CRISPR associados ao genoma de amostras de *Enterococcus faecalis* isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro e de pacientes hospitalizados ..... 76
- Figura 5 – Árvore de filogenia construída através de máxima verossimilhança, utilizando matriz de SNPs e enraizamento pelo ponto médio (*midpoint rooting*), demonstrando o resistoma, viruloma, profagos e sistema CRISPR associados ao genoma de amostras de *Enterococcus faecium* isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro e de pacientes hospitalizados ..... 78
- Figura 6 – Distribuição dos genes de resistência (A) e de virulência (B), em amostras de *Enterococcus faecalis* isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro e de pacientes hospitalizados, em relação aos clados A<sub>fc</sub> e B<sub>fc</sub> identificados por construção da filogenia através de máxima verossimilhança ..... 80
- Figura 7 – Distribuição dos genes de resistência (A) e de virulência (B), em amostras de *Enterococcus faecium* isoladas de águas recreacionais praianas da

|  |    |
|--|----|
| cidade do Rio de Janeiro e de pacientes hospitalizados, em relação aos clados $A_{fm}$ e $B_{fm}$ identificados por construção da filogenia através de máxima verossimilhança..... | 82 |
|--|----|

## LISTA DE GRÁFICOS

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Gráfico 1 – | Distribuição por espécie de 264 amostras do gênero <i>Enterococcus</i> isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro, nos anos de 2013 a 2014, e caracterizadas por metodologia de espectrometria de massas (MALDI-TOF) .....  | 43 |
| Gráfico 2 – | Percentuais de amostras não susceptíveis a 16 antimicrobianos, pertencentes às espécies <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Enterococcus hirae</i> e isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro .....   | 48 |
| Gráfico 3 – | Taxas de multirresistência entre 264 amostras de <i>Enterococcus</i> isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro .   |    |
| Gráfico 4 – | Distribuição das espécies de <i>Enterococcus</i> exibindo perfis de multirresistência e isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro, de acordo com o número de classes de antimicrobianos aos quais foram não suscetíveis .....  | 53 |
| Gráfico 5 – | Frequência de genes associados a resistência aos antimicrobianos em amostras das espécies <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Enterococcus faecium</i> isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro .   | 56 |
| Gráfico 6 – | Distribuição dos tamanhos do genoma (em Mb) das amostras de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Enterococcus faecium</i> isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro e de pacientes hospitalizados .....   | 63 |
| Gráfico 7 – | Distribuição das amostras de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Enterococcus faecium</i> isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro e de pacientes hospitalizados em relação ao número de genes de resistência aos antimicrobianos (A) e de virulência (B) identificados por sequenciamento do genoma completo ..... | 73 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 – Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de PCR para a caracterização genotípica de resistência a antimicrobianos em amostras de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Enterococcus faecium</i> isoladas de águas recreacionais praianas localizadas na cidade do Rio de Janeiro, RJ ..... | 36 |
| Tabela 2 – Distribuição das espécies em 264 amostras de <i>Enterococcus</i> por origem de isolamento – águas recreacionais praianas (praias da Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro, RJ) .....   | 44 |
| Tabela 3 – Distribuição de 264 amostras de <i>Enterococcus</i> , isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro, por categoria de susceptibilidade <sup>1</sup> baseada nos testes de difusão em ágar (disco-difusão) ....   | 46 |
| Tabela 4 – Perfis de não susceptibilidade <sup>1</sup> de amostras de <i>Enterococcus</i> isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro e pertencentes a espécies menos frequentes neste estudo .....   | 49 |
| Tabela 5 – Taxas (%) de multirresistência em 264 amostras de diferentes espécies de <i>Enterococcus</i> em relação as respectivas origens de isolamento (águas praianas da cidade do Rio de Janeiro) .....   | 51 |
| Tabela 6 – Perfis de multirresistência de amostras de <i>Enterococcus</i> isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro, que reuniram mais de duas amostras cada .....  | 52 |
| Tabela 7 – Perfis de multirresistência compartilhados por mais de uma espécie de <i>Enterococcus</i> isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro .....  | 54 |
| Tabela 8 – Distribuição dos perfis genéticos de resistência aos antimicrobianos em 37 amostras de <i>Enterococcus faecalis</i> , isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro, em relação ao respectivo fenótipo e origem de isolamento .....                                      | 58 |
| Tabela 9 – Distribuição de perfis genéticos de resistência em 126 amostras de <i>Enterococcus faecium</i> , isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro, em relação ao respectivo fenótipo e origem de isolamento .....   | 61 |

|  |    |
|--|----|
| Tabela 10 – Origem e ano de isolamento das amostras de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Enterococcus faecium</i> avaliadas neste estudo por metodologia de sequenciamento do genoma completo .....  | 62 |
| Tabela 11 – Dados comparativos das análises do sequenciamento do genoma total de amostras pertencentes as espécies <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Enterococcus faecium</i> isoladas de águas recreacionais praianas e de pacientes hospitalizados ..... | 65 |
| Tabela 12 – Diversidade genética, das amostras de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Enterococcus faecium</i> , baseada nos perfis alélicos utilizados para a caracterização dos diferentes STs e determinados por sequenciamento do genoma completo .....  | 67 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|             |  |
|-------------|--|
| AAC         | Acetiltransferases   |
| Acm         | Adesina de colágeno  |
| ANT         | Nucleotidiltransferases  |
| APH         | Fosfotransferases  |
| AS          | Agar sangue  |
| ATCC        | <i>American Type Culture Collection</i>  |
| ATP         | Adenosina trifosfato   |
| BAPS        | <i>Bayesian analysis of the population structure</i>                                     |
| BLAST       | <i>Basic local alignment search tool</i>   |
| BURST       | <i>Based upon related sequence types</i>   |
| CARD        | <i>Comprehensive antibiotic resistance database</i>                                      |
| CC          | Complexo clonal  |
| CDC         | <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>  |
| CDS         | <i>Coding sequence</i>   |
| CIM         | Concentração inibitória mínima   |
| CLSI        | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>                                       |
| CRISPR-Cas  | <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats and associated proteins</i> |
| D-Ala-D-Ala | D-alanil-D-alanina   |
| D-Lac       | D-lactato  |
| DLV         | <i>Double locus variant</i>  |
| dNTP        | Desoxirribonucleotídeo fosfatado   |
| DNA         | Ácido desoxirribonucleico  |
| D-Ser       | D-serina   |
| EDTA        | Ácido etilenodiaminotetracético  |
| EGMs        | Elementos genéticos móveis   |
| EMAs        | Enzimasificadoras de aminoglicosídeos  |
| Esp         | Proteína de superfície de enterococos  |
| EUCAST      | <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>                        |
| gbk         | <i>GenBank</i>   |

|                   |   |
|-------------------|---|
| h                 | Hora  |
| HCCA              | Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico                               |
| HLAR              | <i>High-level aminoglycoside resistance</i>                           |
| HLGR              | <i>High-level gentamicin resistance</i>                               |
| HLSR              | <i>High-level streptomycin resistance</i>                             |
| IRAS              | Infecções relacionadas à assistência à saúde                          |
| IS                | <i>Insertion sequence</i>   |
| LPSN              | <i>List of procaryotic names with standing in nomenclature</i>        |
| MALDI-TOF MS      | <i>Matrix associated laser desorption-ionization – Time of flight</i> |
| MgCl <sub>2</sub> | Cloreto de magnésio   |
| Min               | Minutos   |
| MLST              | <i>Multilocus sequence typing</i>                                     |
| NaCl              | Cloreto de sódio  |
| NCBI              | <i>National Center for Biotechnology Information</i>                  |
| pb                | Pares de bases  |
| PBP               | <i>Penicillin-binding proteins</i>                                    |
| PCR               | <i>Polimerase chain reaction</i>                                      |
| PFGE              | <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>                               |
| PHASTER           | <i>Phage search tool enhanced release</i>                             |
| Q/D               | Quinupristina/Dalfopristina   |
| rRNA              | Ácido ribonucleico ribossomal   |
| rRNA 16S          | Ácido ribonucleico ribossomal 16S                                     |
| Seg               | Segundos  |
| SgrA              | Adesina de superfície de ligação ao colágeno                          |
| SNP               | <i>Single nucleotide polymorphism</i>                                 |
| ST                | <i>Sequence type</i>  |
| TBE               | Tampão composto de Tris, ácido bórico e EDTA                          |
| THG               | Transferência horizontal de genes                                     |
| Tn                | Transposon  |
| tRNA              | Ácido ribonucleico transportador                                      |
| TSB               | <i>Trypticase soy broth</i>   |
| U                 | Unidade   |
| v                 | Versão  |

|      |   |
|------|---|
| VFDB | <i>Virulence factor database</i>        |
| VRE  | <i>Vancomycin-resistant Enterococci</i> |
| WGS  | <i>Whole genome sequencing</i>          |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|     |                     |
|-----|---------------------|
| %   | Porcentagem         |
| ±   | Mais ou menos       |
| +   | Positivo            |
| -   | Negativo            |
| >   | Maior que           |
| <   | Menor que           |
| =   | Igual a             |
| α   | Alfa                |
| β   | Beta                |
| mL  | Mililitro           |
| μl  | Microlitro          |
| μg  | Micrograma          |
| mM  | Milimolar           |
| kb  | Kilobase            |
| Mb  | Megabase            |
| m/z | massa/carga         |
| °C  | grau Celsius        |
| rpm | Rotações por Minuto |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 20 |
| <b>1. OBJETIVOS</b> .....  | 29 |
| 1.1 <b>Objetivo geral</b> .....  | 29 |
| 1.2 <b>Objetivos específicos</b> .....   | 29 |
| <b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 30 |
| 2.1 <b>Amostragem</b> .....  | 30 |
| 2.2 <b>Caracterização das Amostras Bacterianas por Espectrometria de Massa – MALDI TOF MS</b> .....      | 30 |
| 2.3 <b>Determinação da Susceptibilidade aos Antimicrobianos</b> .....                                    | 32 |
| 2.4 <b>Detecção dos Genes Associados à Resistência aos Antimicrobianos</b> .....                         | 32 |
| 2.4.1 <u>Obtenção do DNA</u> .....   | 32 |
| 2.4.2 <u>Detecção de Genes Associados à Resistência a Níveis Elevados de Aminoglicosídeos</u> .....      | 33 |
| 2.4.3 <u>Detecção dos Genes Associados à Resistência aos Macrolídeos</u> .....                           | 34 |
| 2.4.4 <u>Detecção de Genes Associados à Resistência à Tetraciclina</u> .....                             | 35 |
| 2.4.5 <u>Eletroforese em Gel de Agarose e Análise dos Produtos Amplificados</u> .....                    | 37 |
| 2.5 <b>Sequenciamento do Genoma Completo de Amostras de <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i></b> ..... | 37 |
| 2.5.1 <u>Obtenção do DNA Genômico</u> .....  | 38 |
| 2.5.2 <u>Avaliação de Qualidade e “Trimagem” das Reads</u> .....   | 39 |
| 2.5.3 <u>Montagem e Características Gerais dos Genomas</u> .....   | 39 |
| 2.6 <b><i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST)</b> .....  | 40 |
| 2.7 <b>Estudo da Filogenia por Análise de SNPs</b> .....   | 40 |
| 2.7.1 <u>Matrizes de SNPs</u> .....  | 40 |
| 2.7.2 <u>Construção das Árvores de Filogenia</u> .....   | 42 |
| 2.8 <b>Estudo do Conteúdo Genético</b> .....   | 42 |
| 2.9 <b>Análises Estatísticas</b> .....   | 42 |
| <b>3. RESULTADOS</b> .....   | 43 |
| 3.1 <b>Caracterização da Amostragem</b> .....  | 43 |
| 3.2 <b>Susceptibilidade aos Antimicrobianos e Perfis de Multirresistência</b> .....                      | 45 |

|      |   |     |
|------|---|-----|
| 3.3  | <b>Genótipos de Resistência aos Macrolídeos, Tetraciclina e a Níveis Elevados de Aminoglicosídeos nas Amostras das Espécies <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i></b> .....  | 55  |
| 3.4  | <b>Características Genômicas Gerais das Amostras de <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i></b> .....  | 62  |
| 3.5  | <b>Estrutura Populacional e Diversidade Genética – MLST</b> .....   | 65  |
| 3.6  | <b>Análise Filogenética das Amostras de <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> Isoladas de Águas Recreacionais Praianas</b> .....   | 68  |
| 3.7  | <b>Análise do Conteúdo do Genoma Acessório de Amostras de <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> Isoladas de Águas Recreacionais Praianas</b> .....   | 70  |
| 3.8  | <b>Análise Comparativa do Conteúdo do Genético de Amostras de <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> Isoladas de Águas Recreacionais Praianas e de Pacientes Hospitalizados: Resistoma, Viruloma, Mobiloma (Fagos) e Mecanismo de Defesa CRISPR-Cas</b> ..... | 71  |
| 3.9  | <b>Análises Filogenética e do Conteúdo Genético de Amostras Isoladas de Águas Recreacionais Praianas em Comparação as de Pacientes Hospitalizados</b> .....   | 75  |
| 3.10 | <b>Correlação dos Testes de Disco-Difusão, PCR e Sequenciamento do Genoma para a Detecção da Resistência a Eritromicina, Tetraciclina e Níveis Elevados de Aminoglicosídeos</b> .....   | 83  |
| 4    | <b>DISCUSSÃO</b> .....  | 84  |
|      | <b>CONCLUSÕES</b> .....   | 98  |
|      | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 100 |

## INTRODUÇÃO

Os membros do gênero *Enterococcus* se destacam entre as bactérias Gram positivas de maior versatilidade no panorama atual da resistência bacteriana aos antimicrobianos, devido à extensão de atributos de resistência intrínseca, bem como à sua notável capacidade de adquirir e disseminar novos mecanismos de resistência. Estas características colaboram também para a sua expressão entre os principais agentes de infecções relacionadas a assistência à saúde – IRAS (MILLER et al., 2020; PFALLER et al., 2019).

Esses microrganismos são também capazes de crescer em uma ampla faixa de temperatura (compreendida entre 10°C e 45°C), na presença de salinidade elevada (NaCl a 6,5%), em faixa variada de pH e sobrevivem a temperaturas elevadas, como 60°C por 30 minutos (TEIXEIRA et al., 2019). Certamente, tais características fisiológicas contribuem para que os enterococos sejam amplamente distribuídos na natureza e possam ser encontrados nos mais diferentes ambientes, seja como um dos componentes mais comuns e numerosos da microbiota do trato intestinal de animais homeotérmicos, como mamíferos e aves, mas também em ambientes hídricos, solo, plantas e alimentos (BYAPPANAHALLI et al., 2012; ELGHAIEB et al., 2020; TORRES et al., 2018).

Segundo o sítio eletrônico LPSN - *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* (disponível em <http://www.bacterio.net/>, último acesso em setembro de 2021), o gênero *Enterococcus* é composto por cerca de 60 espécies, além de duas subespécies. Porém, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* são responsáveis pela quase totalidade das infecções enterocócicas nos seres humanos (GILMORE et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2019).

As infecções enterocócicas mais comuns são as do trato urinário, de feridas e da corrente sanguínea. A participação de enterococos na etiologia de infecções graves, como septicemias e endocardites, requer a adoção de antibioticoterapia efetiva, cujo sucesso é comumente prejudicado pelo extenso arsenal de resistência aos antimicrobianos, presente nesses microrganismos. Assim sendo, a emergência de amostras apresentando mecanismos de resistência adquirida aos antimicrobianos, tem sido associada a elevados índices de morbidade e de mortalidade em pacientes hospitalizados, por limitar drasticamente as opções terapêuticas (BEGANOVIC et al., 2018; GIANNELLA et al., 2020).

Os enterococos chamam a atenção no cenário mundial por se tratar de um gênero que exhibe resistência intrínseca à diferentes classes de antimicrobianos, incluindo os recomendados para o tratamento de infecções causadas por microrganismos Gram positivos,

tais como: cefalosporinas, lincosaminas, beta-lactâmicos e aminoglicosídeos. Além disso, membros das espécies *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* são intrinsecamente resistentes à vancomicina, bem como *E. faecalis* exibe essa característica para as estreptograminas (MURRAY, 1990; HOLLENBECK; RICE, 2012, GIANNELLA et al., 2020).

Mecanismos adquiridos, decorrentes de mutações ou aquisição de DNA extracromossômico, como plasmídeos e transposons, quando expressos, induzem resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (tais como, gentamicina, estreptomicina e canamicina – fenótipo HLAR, do inglês *high-level aminoglycoside resistance*),  $\beta$ -lactâmicos (ampicilina e penicilina), quinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina) e glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina). Soma-se ainda, a emergência da resistência a antimicrobianos de uso mais recente, como linezolida, quinupristina/dalfopristina e tigeciclina (BENDER et al., 2018; GAGETTI et al., 2019; GARCÍA-SOLACHE, RICE, 2019; LEE et al., 2020).

A resistência intrínseca a níveis baixos de penicilina nos enterococos está associada à produção de PBPs apresentando baixa afinidade para esses antimicrobianos, especialmente para a PBP5. Enquanto a resistência a níveis elevados é associada às mutações pontuais e cumulativas nos sítios ativos das PBPs ou na sua hiperprodução. Já a resistência intrínseca aos aminoglicosídeos se dá pela redução do transporte ativo da droga para o interior da célula bacteriana, enquanto a resistência em níveis elevados ocorre pela alteração do sítio alvo na subunidade 30S do ribossomo, devido a mutações no cromossomo bacteriano, ou ainda a expressão de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) (MILLER et al., 2016; VAN TYNE; GILMORE, 2014; RAMIREZ; TOLMASKY, 2010).

Dentre os genótipos associados à resistência a níveis elevados de diferentes aminoglicosídeos (HLAR), o gene *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia*, que codifica uma enzima bifuncional, com propriedades de acetilação e fosforilação simultâneas, é o mais frequente. Outros genes, já descritos são: *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2')-Id*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*, *ant(6)-Ia*, *ant(3'')-Ia*, *ant(9')-Ia* e *ant(9')-Ib*. Porém, a resistência a níveis elevados de estreptomicina é codificada apenas pelos genes *ant(6)-Ia*, *ant(3'')-Ia*, *ant(9')-Ia* e *ant(9')-Ib*, além de mutações que levam a alterações na subunidade 30S do ribossomo (GILMORE et al., 2014; PADMASINI et al., 2014).

A resistência a níveis elevados de glicopeptídeos, principalmente vancomicina, caracterizam amostras reconhecidas como VRE (*vancomycin-resistant enterococci*). A vancomicina atua ligando-se com alta afinidade à porção C-terminal do dipeptídeo D-alanina-D-alanil (D-Ala-D-Ala) ao pentapeptídeo precursor do peptideoglicano, e impede tanto a etapa de transglicosilação dos demais precursores da cadeia de peptideoglicano, quanto

transpeptidação. O mecanismo de resistência é determinado pela presença de genes que codificam enzimas para a síntese de precursores com baixa afinidade pelo antimicrobiano, nos quais o resíduo C-terminal D-Ala é substituído por D-lactato (D-Lac) ou D-serina (D-Ser), modificando, portanto, o sítio de ligação do antimicrobiano (ZENG et al., 2016). São conhecidos nove fenótipos de resistência à vancomicina (VanA, B, C, D, E, G, L, M e N), sendo VanA e VanB os mais frequentes. O fenótipo VanA deve-se a um eficaz mecanismo que requer um sistema regulador de dois componentes, VanR e VanS, e três enzimas, VanH, VanA e VanX. O sistema de dois componentes percebe a presença do antimicrobiano e, em sequência, ativa a expressão dos genes *vanH*, *vanA* e *vanX*, efetores da resistência. O operon completo – *vanRSHAXY* – é parte integrante do Tn1546 ou transposons relacionados, que são geralmente localizados em plasmídeos transferíveis (GARCÍA-SOLACHE, M.; RICE, L.B., 2019; STOGIOS, P.J.; SAVCHENKO, A., 2020)

Em enterococos, o mecanismo de resistência aos antimicrobianos da classe quinolonas (como, ciprofloxacina, norfloxacina e levofloxacina) é decorrente, principalmente da ocorrência de mutações em regiões específicas conhecidas como QRDR (do inglês, *quinolone resistance-determining regions*) nos genes *gyrA* e *gyrB* para DNA girase e *parC* e *parE* para topoisomerase IV (CORREIA et al., 2017; KIM et al., 2018).

Dentre os antimicrobianos mais recentemente aprovados e utilizados no tratamento das enterococcias graves estão a linezolida e a daptomicina. A primeira, pertencente à classe das oxazolidinonas, atua inibindo a síntese proteica, enquanto a segunda é um lipopeptídeo cíclico de ação bactericida, que atua nos canais de cálcio da membrana celular bacteriana, causando a sua consequente despolarização (CANTÓN et al., 2010; GILMORE et al., 2014). Apesar de ainda ser evidenciada em baixa frequência, já foram detectadas amostras albergando características de resistência a esses antimicrobianos. A resistência a linezolida está relacionada a presença de mutações no rRNA 23S e à aquisição de uma metiltransferase codificada pelos genes *cfp* (ARIAS et al., 2008). Enquanto, para daptomicina, mutações nos genes *liaFSR*, responsáveis pela regulação da resposta ao estresse celular, foram apontadas como determinantes do fenótipo de resistência (EDELSBERG et al., 2014; MUNITA et al., 2012).

O aumento progressivo do isolamento de amostras de enterococos apresentando resistência a uma ampla variedade de antimicrobianos, é preocupante sob o ponto de vista terapêutico, impactando a epidemiologia das doenças enterocócicas. Assim, o tratamento de escolha para as enterococcias graves (como bacteremias e endocardites), que consiste basicamente na ação sinérgica entre um aminoglicosídeo (geralmente gentamicina) e um

agente ativo para parede celular (como ampicilina ou vancomicina), tem se mostrado ineficaz, frente ao surgimento e propagação de amostras resistentes a níveis elevados de  $\beta$ -lactâmicos, glicopeptídeos e aminoglicosídeos, inviabilizando o efeito terapêutico esperado (MILLER et al., 2020). Também já foi relatado que, ao menos em algumas situações, a aquisição da resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos parece ser uma etapa que precede e facilita a aquisição de resistência a outros antimicrobianos, sobretudo aos glicopeptídeos, favorecendo também o surgimento de amostras multirresistentes (JABBARI et al., 2019; MILLER et al., 2020; YIM et al., 2017).

A resistência antimicrobiana é reconhecida como um dos principais desafios de saúde global do século 21. Assim, apesar de novas alternativas terapêuticas, amostras de *Enterococcus* multirresistentes permanecem como um grave problema de saúde pública. A importância destes microrganismos, foi referendada em um documento da Organização Mundial de Saúde, em 2017 (WHO, 2017), que diante da atual urgência de ações de controle de microrganismos multirresistentes e com a intenção de orientar e promover políticas que incentivem a pesquisa em ciência básica e o desenvolvimento de novos antimicrobianos, elaborou uma lista contendo 12 patógenos a serem considerados como alvos prioritários para tais investimentos. Nessa lista, estão incluídos *E. faecium* resistentes à vancomicina na categoria de prioridade alta quanto a necessidade de esforços imediatos para pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos e seu efetivo controle. Adicionalmente, os enterococos resistentes à vancomicina, tanto a espécie *E. faecium* quanto *E. faecalis*, também estão incluídos em uma lista de patógenos que configuram preocupante ameaça à saúde humana, pelo *Centers for Disease Control and Prevention*, dos EUA (CDC, 2019).

A importância da emergência e dispersão da resistência aos antimicrobianos têm sido historicamente reportadas sob perspectivas médicas. No entanto, mais recentemente, os ecossistemas naturais, também, têm sido apontados como importantes reservatórios de amostras multirresistentes e de determinantes genéticos de resistência. Neste contexto, ambientes aquáticos, particularmente aqueles sujeitos a impactos antropogênicos, como as águas costeiras, têm sido incluídos na elaboração de estratégias de controle da resistência antimicrobiana. Deve-se a isto o fato de que estes ambientes, quando gerenciados de maneira equivocada, são considerados uma via convergente para os resíduos gerados por atividades humanas e saneamento (D'COSTA et al., 2011; HERNANDO-AMADO et al., 2019; KNAPP et al., 2010).

De acordo com HATOSY & MARTINY (2015), existem três principais vias que explicam a manutenção de genes de resistência aos antimicrobianos no ambiente marinho, que

são: (i) o escoamento de amostras terrestres advindas de outros ambientes; (ii) a presença de amostras selecionadas por impacto antropogênico (como por exemplo rejeito sanitário sem tratamento); (iii) a presença de amostras selecionadas frente a resposta a agentes antimicrobianos previamente existentes no próprio ambiente marinho, haja visto que a existência dos genes que codificam a resistência aos antibióticos são anteriores a descoberta dos mesmos.

Sabendo-se que sistemas aquáticos podem conter uma diversidade de microrganismos, incluindo os patogênicos, são estabelecidos critérios que definem parâmetros de qualidade microbiológica da água. Considerando que a maioria dos agentes patogênicos de veiculação hídrica tem origem nas fezes humanas, uma condição para a avaliação da qualidade microbiológica da água é o exame de bioindicadores de contaminação fecal. (APHA, 1995; CONAMA, 2000). Dentre eles, destacam-se *Escherichia coli* e *Enterococcus*, que são reconhecidos como indicadores biológicos de contaminação, particularmente por serem representantes da microbiota intestinal de animais homeotérmicos (APHA, 1995; EPA, 2000; NICHOLS, 2006; ARAGONÉS et al., 2016).

Estima-se que globalmente ocorram mais de 120 milhões de casos de doenças gastrointestinais e 50 milhões de doenças do trato respiratório por ano, causadas por contato com águas costeiras potencialmente contaminadas por microrganismos patogênicos provenientes de despejos domésticos e industriais. Nas análises para a determinação da qualidade microbiológica da água, o gênero *Enterococcus* é quantificado de maneira isolada, devido sua importância como marcador de balneabilidade, sendo um dos parâmetros utilizados pelo Instituto Estadual do Ambiente (INEA), órgão responsável por análises ambientais no Estado do Rio de Janeiro (SOALHEIRO-ROMANO et al., 2021).

Os riscos para Saúde Pública se agravam considerando que espécies de *Enterococcus* podem permanecer viáveis em águas praianas, estando presentes também na areia ou associados as algas e animais marinhos. Esses microrganismos, além de serem prováveis carreadores de uma variedade de determinantes de resistência, incluindo aos antimicrobianos, biocidas e metais, podem também portar fatores específicos de virulência.

Assim, ecossistemas marinhos configuram-se como potenciais reservatórios tanto de genes de resistência, quanto de virulência bacteriana, além de possibilitar a disseminação dessas propriedades entre microrganismos diversos (DADA et al., 2013; HERNANDO-AMADO et al., 2019; TURBOW et al., 2003; VIGNAROLI et al., 2013). Estudos demonstrando a diversidade de elementos genéticos móveis, como plasmídeos, integrons e profagos portadores de genes de resistência aos antimicrobianos e de virulência, além da

provável transmissão desses determinantes entre espécies e gêneros distintos já foram relatados (ALM et al., 2014; EDIRSANA et al., 2014; NAPPIER et al., 2020; ZAHEER et al., 2020).

Os principais fatores de virulência mais frequentemente associados as amostras pertencentes a espécie *E. faecalis* correspondem a proteína de superfície – Esp – codificada pelo gene *esp*; a metaloprotease (GelE) e a serinoprotease (Spr), pelos genes *gelE* e *sprE*, respectivamente; a substância de agregação, relacionada ao gene *agg*, que além atuar na adesão bacteriana, também facilita a troca de plasmídeos, como integrante de um sistema de conjugação feromônio-dependente; outras adesinas como EfaA, ou antígeno A (gene *efaA*) (também descrito como antígeno A) e ACE que liga colágeno (gene *ace*); e uma citolisina, codificada pelo conjunto gênico *cyl*. Esta última parece ser o único fator relacionado a um curso infeccioso mais grave (LINDENSTRAUSS et al., 2011; MADSEN et al., 2017; VAN TYNE et al., 2013).

Em relação à espécie *E. faecium*, destacam-se adesinas de superfície como, Acm (codificada por *acm*), que se liga ao colágeno, e a expressão de pili, principalmente, PilA (codificado por genes *fms*) e a proteína SagA, (codificada pelo gene *sagA*), considerada específica desta espécie e que tem a função de se ligar amplamente às proteínas da matriz extracelular. Além destes, uma glicosil hidrolase, proteína Hyl (codificada pelo gene *hylefm*), tem sido frequentemente encontrada em amostras associadas ao ambiente hospitalar. Mesmo em frequência menor que para *E. faecalis*, amostras de *E. faecium*, podem também apresentar uma citolisina (codificada pelo conjunto gênico *cyl*) e (gelatinase (codificada pelo gene *gelE*) (FREITAS et al., 2018b; GAO et al., 2018; PANESSO et al., 2011).

A diversidade crescente de enterococos, ilustrada pelos variados determinantes genéticos envolvidos e fenótipos expressos, e, em algumas situações, a especificidade dos seus padrões emergentes de resistência aos antimicrobianos ressaltam a necessidade de seu contínuo rastreamento e da utilização de métodos precisos para o seu reconhecimento e caracterização. A aplicação de métodos moleculares tem se mostrado fundamental ao esclarecimento de diversos aspectos da epidemiologia desses microrganismos. Dentre os métodos moleculares utilizados, a técnica de PFGE (do inglês, *pulsed-field gel electrophoresis*) foi inicialmente considerada como padrão-ouro para tipificação molecular de *Enterococcus*. Porém, desvantagens inerentes a essa metodologia, particularmente quanto a dificuldade de comparação entre os resultados obtidos por diferentes laboratórios, limita o seu emprego em análises interinstitucionais (MALATHUM et al., 1998; PEGUES et al., 1997; RANGBERG et al., 2019; WERNER et al., 2007).

Por outro lado, a metodologia de tipagem de sequências em múltiplos loci (MLST, *Multilocus Sequence Typing*) mostrou agregar um maior número de vantagens para as análises de diversidade de microrganismos, particularmente por permitir o compartilhamento de dados, o que veio a facilitar os estudos epidemiológicos globais e análises da estrutura populacional de várias espécies bacterianas. Além disso, também pode ser utilizada com maior eficácia em avaliações que contemplem períodos longos de análise em estudos retrospectivos (IBARZ-PAVÓN; MAIDEN, 2009; MAIDEN, 2006; PÉREZ-LOSADA et al., 2013).

A metodologia de MLST baseia-se na caracterização da sequência de um conjunto de genes de manutenção celular (no inglês, *housekeeping genes*), para caracterização de tipos (ou clones) e complexos clonais (CCs), que podem ser comparados em bancos de dados internacionais. Cada lócus gênico analisado apresenta uma determinada sequência (sequência alélica) e recebe um número, que identifica o respectivo alelo. Normalmente, são avaliadas sequências internas de sete genes de manutenção celular, em protocolos espécie-específicos. O conjunto de números de todos os genes representa um perfil alélico, que define a sequência tipo – ST (do inglês, *sequence type*) de cada amostra bacteriana avaliada. Assim, cada mudança na sequência nucleotídica é contada como um evento genético único e independe do número de polimorfismos envolvidos, resultando em uma abordagem simplificada, porém bastante informativa para análise da diversidade de microrganismos (MAIDEN et al., 2013).

Particularmente para *E. faecalis* e *E. faecium*, os estudos empregando MLST, foram fundamentais tanto nas análises epidemiológicas, quanto na determinação de padrões de descendência evolutiva, identificando subpopulações altamente especializadas e adaptadas ao ambiente hospitalar e de distribuição global (RAVEN et al., 2016; VAN HAL et al., 2016). A partir de estudos empregando MLST foram identificados complexos clonais destacados, como o CC17, para a espécie *E. faecium*, e o CC2, para *E. faecalis*. Ambos agregam amostras que apresentam características de multirresistência além de determinantes de virulência como adesinas, citotoxinas e enzimas hidrolíticas (GUZMÁN-PRIETO et al., 2016; RUIZ-GARBAJOSA et al., 2006; TOP et al., 2008).

Entretanto, tais análises já foram questionadas, considerando que essas subpopulações bem-sucedidas haviam sido agrupadas em complexos clonais a partir do emprego de algoritmos como por exemplo, eBURST (FEIL et al., 2004), que não valorizaram os múltiplos eventos de recombinação genética, tão comuns nessas espécies. Assim sendo, avaliações adicionais alertaram para a necessidade do emprego de análises matemáticas alternativas, que incluíssem a previsão desses eventos genéticos na determinação da estrutura populacional

dessas espécies de *Enterococcus*. Uma das abordagens alternativas mais recentes utiliza a análise Bayesiana de estrutura populacional (BAPS, do inglês *Bayesian Analysis of Population Structure*), que tem como princípio um modelo genético estatístico para particionar a variação molecular com base em padrões de ascendência e recombinações clonais identificadas, em vez de tentar recuperar informações filogenéticas ou implementar um modelo de agrupamento filogenético como os algoritmos anteriormente utilizados (AAMODT et al., 2015; FREITAS et al., 2016; FUJIKURA et al., 2019; WILLEMS et al., 2012).

O sequenciamento do genoma completo (WGS - *Whole-Genome Sequence*), que inclui o core genoma e genes acessórios, tem contribuído sobremaneira para o estudo da dinâmica das infecções humanas. Estratégias empregando WGS para o estudo da dispersão de amostras de enterococos resistentes à vancomicina (VRE, *vancomycin-resistant Enterococcus*), se mostraram fundamentais na definição da complexa rota de transmissão de amostras *E. faecium* inter- e intra-hospitalar, identificando a amplitude do problema e a sua relevância em escala global (RAVEN, 2017). Adicionalmente, análises do sequenciamento do genoma completo, aliado aos estudos de epidemiologia molecular, constituem importantes ferramentas para acessar genomas bacterianos. A possibilidade de análises de genômica comparada permite a avaliação de genes de resistência, monitoramento da abundância do mobiloma (constituído de elementos genéticos exógenos incluindo profagos, plasmídeos e elementos conjugativos integrados), como também a detecção de genes crípticos e precursores, essenciais para a determinação de aspectos relacionados a origem e dispersão da resistência aos antimicrobianos (BAKER et al., 2018). Análises de multigenomas de *E. faecalis* e *E. faecium* demonstraram que ambas as espécies têm um pangenoma aberto, comprovando que podem eficientemente adquirir e integrar DNA externo em seu *pool* genético. A aquisição e troca de elementos móveis têm sido valorizadas como importantes atributos a serem considerados nas análises da diversidade genômica dessas espécies (GARCÍA-SOLACHE, RICE, 2019; TYSON *et al.*, 2018).

Além disso, a utilização de WGS associado a ferramentas de bioinformática vem permitindo, também, a obtenção de informações sobre o caminho evolutivo das espécies de *Enterococcus*, desde seu papel como microrganismos comensais até a atual condição de importantes agentes de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). Assim, a elucidação da estrutura populacional e dos processos evolutivos que levam a emergência de determinadas subpopulações são um pré-requisito para o efetivo controle de amostras multirresistentes adaptadas ao ambiente hospitalar (FREITAS et al., 2021).

Entretanto, pouco ainda se conhece sobre a estrutura das populações e rotas de transmissão de enterococos multirresistentes e circulantes no ambiente natural (como o solo e a água), em alimentos e em diferentes hospedeiros. Análises das sequências genômicas tem oferecido importantes informações sobre os genes envolvidos na resistência dentro e fora do cenário hospitalar, identificando aqueles que são compartilhados por amostras de diferentes origens (ARGUDÍN et al., 2017; TORRES et al., 2018; ZAHEER et al., 2020).

Adicionalmente, as abordagens científicas atuais não restringem o problema da resistência aos antimicrobianos exclusivamente às unidades de saúde, considerando que a maioria dos ecossistemas são colaboradores ativos para o seu surgimento, aquisição e disseminação. Dessa forma, os conceitos altamente integrativos de Saúde Única (*One Health*) e de Saúde Global (*Global Health*), apoiados em uma visão holística e interdisciplinar e baseados na ideia de que a saúde humana, animal e dos ecossistemas são interdependentes, têm sido preconizados, na atualidade, para tratar dos problemas associados a doenças infecciosas em geral, e em particular, a resistência antimicrobiana. Adicionalmente, as abordagens em Saúde Única sustentam investigações e desenvolvimento de novas ferramentas bioquímicas, microbiológicas, ecológicas bioinformáticas e computacionais necessárias ao entendimento e controle do problema da resistência aos antimicrobianos em escala mundial (BAQUERO et al. 2019). Já é reconhecido que sem a aplicação desses conceitos na gestão e implementação de medidas efetivas, a perspectiva é de um relevante agravamento do problema nos próximos anos (COLLIGNON; MC EWEN, 2019; DANNER et al., 2019; MOREHEAD; SCARBROUGH, 2018; RODRIGUEZ-MOZAZ et al., 2020).

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo geral

Caracterizar fenótipos e genótipos de amostras de *Enterococcus* obtidas de águas costeiras recreacionais de praias da cidade do Rio de Janeiro, RJ, visando a elucidação de aspectos relativos a ocorrência de características de multirresistência aos antimicrobianos.

### 1.2 Objetivos específicos

- a) Identificar e caracterizar amostras multirresistentes de *Enterococcus*, sobretudo aquelas que apresentaram marcadores de resistência clássicos, reconhecidos como de risco elevado de disseminação (resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos, glicopeptídeos, beta-lactâmicos, quinolonas, tetraciclinas) ou emergentes (resistência à linezolida, quinupristina/dalfopristina, tigeciclina);
- b) Determinar as espécies mais frequentemente associadas à multirresistência e os perfis de resistência múltipla a antimicrobianos entre amostras de *Enterococcus* isoladas do ambiente avaliado (águas praianas);
- c) Analisar sequências genômicas de amostras selecionadas das espécies *E. faecalis* e *E. faecium* obtidas de águas praianas, assim como genomas de amostras de origem humana (pacientes hospitalizados), aplicando diferentes ferramentas de bioinformática, para a investigação comparativas sobre o conteúdo genético dessas amostras;
- d) Identificar os determinantes genéticos nos genomas selecionados, em relação à aquisição de elementos associados à evolução de linhagens multirresistentes e de virulência destacada;
- e) Caracterizar a estrutura populacional através da análise do polimorfismo genético (sequências de múltiplos genes – MLST) e grupos clonais predominantes;
- f) Reconstruir a filogenia das amostras selecionadas, circulantes em ambos os cenários (águas praianas e infecção ou colonização em pacientes hospitalizados) e no período avaliado.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem

Foram avaliadas 264 amostras bacterianas pertencentes ao gênero *Enterococcus* isoladas de águas recreacionais praianas da região metropolitana do Rio de Janeiro, sendo duas pertencentes a Baía de Guanabara (praias do Flamengo e de Botafogo) e outras três em regiões de mar aberto (praias de Copacabana, Ipanema e Leblon).

As coletas foram realizadas no período de dezembro de 2013 a março de 2014, na zona de arrebentação das referidas praias, a cerca de 15 cm da superfície e em locais com cerca de 1 metro de profundidade, de acordo com as recomendações do INEA (Instituto Estadual do Ambiente, RJ). Para o isolamento dos *Enterococcus*, um volume de 500 mL de água obtida de cada praia foi filtrado em uma membrana de 0,22 µm, estéril, com auxílio de bomba a vácuo. Após a filtragem, a membrana foi imersa em 5 mL no meio STGG (do inglês *Skim milk, tryptone, glucose and glycerin* O'BRIEN et al., 2001) e submetida a ultrassom (Soni-Tech, Bransonic 3510R, MT) em 3 ciclos de 1 minuto. Uma alíquota da suspensão resultante foi semeada em Caldo Enterococcosel (BD Diagnostics, NJ, EUA) que, em sequência, foi incubado a  $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 18h-24h. Dos tubos que apresentaram enegrecimento, sugestivo do crescimento de enterococos, foi retirada uma alíquota que foi, então, semeada em meio ágar Enterococcosel (BD Diagnostics). Após o período de incubação a  $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 18h-24h, colônias sugestivas de *Enterococcus* foram selecionadas e inoculadas em meio de TSA (do inglês, *trypticase soy agar* - Ágar triptona de soja, BD Diagnostics). Cada colônia selecionada foi considerada como uma amostra individual e nomeada de acordo com a origem de isolamento.

Após estas etapas as amostras bacterianas foram estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , sob a forma de suspensões preparadas em solução contendo *Skim Milk* a 10% (p/v) e glicerol a 10% (v/v) e mantidas na coleção de culturas do Laboratório de Apoio Biotecnológico, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os protocolos de coleta do material, com a colaboração do INEA-RJ, e as análises iniciais para caracterização das amostras bacterianas (TEIXEIRA et al., 2019) encontram-se mais detalhados em um estudo anterior de nosso grupo (MELO, 2015).

Para as análises conduzidas neste estudo, foram selecionadas amostras representativas das espécies identificadas no estudo anterior. As amostras, mantidas em coleção de culturas, foram reativadas através de semeadura por esgotamento em meio de ágar sangue (AS), contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro (Plast Labor, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), seguido de incubação a  $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante um período de 18h-24 h. Após este período, as placas foram avaliadas para evidência do crescimento característico de enterococos (morfologia colonial e atividade hemolítica) em culturas puras.

Para análises filogenéticas e filogenômicas comparativas foram incluídas 20 amostras obtidas de material clínico humano, sendo 10 pertencentes à espécie *Enterococcus faecalis* e 10 à *Enterococcus faecium*, que também foram isoladas em estudos anteriores de nosso grupo (FARIA, 2017; SOUZA 2020). Além dessas, amostras de referência ou variantes de interesse, foram incluídas como controles para as diferentes metodologias que compuseram este estudo.

## 2.2 Caracterização das Amostras Bacterianas por Espectrometria de Massa – MALDI TOF MS

A confirmação da caracterização das amostras foi realizada por análise de espectrometria de massas por MALDI-TOF MS (do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass spectrometry*) utilizando-se o espectrômetro de massas Microflex LT (Bruker Daltonics, Alemanha), e o software *Maldi Flex Control Biotyper 3.0* no modo automático, com intervalo de 2.000 a 20.000 m/z, para geração de espectros e escores de confiabilidade.

Para tal, as amostras foram semeadas em placas de AS (Plast Labor) e incubadas por 18h-24h a uma temperatura de  $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ . A partir do crescimento assim obtido, uma colônia foi depositada, com auxílio de uma haste de madeira, em uma das áreas delimitadas na placa de aço inoxidável polida (MSP 96 *target polished steel* BC, Bruker Daltonics®, Billerica, MA, EUA). Sobre o material depositado, foi aplicado 1µl da matriz HCCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, Bruker Daltonics®). Após secagem dos materiais, a placa de aço foi instalada no equipamento para ser submetida a análise.

Para a análise dos resultados obtidos foram considerados os padrões de confiabilidade determinados pelo fabricante: escores de 0,000 a 1,699 são considerados como identificação "não confiável"; de 1,700 a 1,999 como provável identificação de gênero; de 2,000 a 2,299

como identificação segura de gênero e provável identificação de espécie; de 2,300 a 3,000 como identificação segura de gênero e altamente provável para espécie.

### 2.3 Determinação da Susceptibilidade aos Antimicrobianos

A susceptibilidade a 18 antimicrobianos foi avaliada pela metodologia de difusão em ágar, conforme as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020) e do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2020). Foram utilizados discos contendo os seguintes antimicrobianos: ampicilina (10µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg), estreptomicina (300µg), fosfomicina (200µg), gentamicina (120µg), imipenem (10µg), levofloxacina (5µg), linezolida (30µg), nitrofurantoína (300µg), norfloxacina (10µg), penicilina (10µg), rifampicina (5µg), teicoplanina (30µg), tetraciclina (30µg), tigeciclina (15 µg) e vancomicina (30µg). Os discos com concentrações elevadas de gentamicina (120µg e estreptomicina (300µg) foram utilizados com a finalidade de detecção do fenótipo HLAR.

Amostras multirresistentes aos antimicrobianos foram consideradas aquelas que se apresentaram não susceptíveis a pelo menos três classes antimicrobianos. Amostras não susceptíveis incluíram tanto as que se apresentaram na categoria resistente, quanto na intermediária. Taxas de multirresistência foram consideradas a partir do percentual relativo ao somatório das categorias resistente e intermediária em relação ao total das amostras por espécie. As amostras de referência *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 51299 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram incluídas para controle de qualidade.

### 2.4 Detecção dos Genes Associados à Resistência aos Antimicrobianos

A presença de genes associados a resistência adquirida a níveis elevados de aminoglicosídeos, macrolídeos e tetraciclina foi verificada em todas as amostras pertencentes às espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, isoladas de águas recreacionais praianas, independente do fenótipo obtido por testes de difusão em ágar (susceptíveis e não susceptíveis).

#### 2.4.1 Obtenção do DNA

A obtenção do DNA foi realizada utilizando-se a resina Chelex 100 (Bio-Rad

Laboratories, EUA), com base nas recomendações de Pinto *et al.* (2013). A partir de um crescimento recente (18h-24h a 36°C±1°C) em meio AS (Plast Labor), foram preparadas suspensões bacterianas densas em 200 µL de solução resina Chelex a 5%, acrescida de 2µL de Proteinase K (20 mg/mL, Sigma-Aldrich Co., San Louis, MO, EUA). As suspensões foram incubadas a 50 °C por 1 h, seguida de homogeneização em *vortex* por 10 s e, em sequência, as foram aquecidas a 95 °C por 10 min. Após nova homogeneização em *vortex* por 10 s, as suspensões foram centrifugadas a 12.000 g por 3 min. Os sobrenadantes foram utilizados como fontes de DNA molde para todas as reações de amplificação utilizadas no estudo.

#### 2.4.2 Detecção de Genes Associados à Resistência a Níveis Elevados de Aminoglicosídeos

Os seguintes genes de resistência adquirida a níveis elevados de gentamicina e outros aminoglicosídeos foram avaliados através de reações de PCR *multiplex*, seguindo o protocolo de Vakulenko et al. (2003): *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id*, *aph(3')-IIIa* e *ant(4')-Ia*. Adicionalmente, foi também investigada a presença de determinantes associados a resistência a níveis elevados de estreptomicina, genes *ant3'-Ia*, *ant9'-Ia*, *ant9'-Ib* e *ant6'-Ia*, pelo emprego de um protocolo multiplex, padronizado em nosso laboratório (FARIA, 2017) e baseado nas recomendações de Swenson et al. (1995), Mahbub Alam et al. (2005) e Leelaporn et al. (2008).

No protocolo de PCR utilizado para detecção dos genes de resistência a níveis elevados de gentamicina e outros aminoglicosídeos, a mistura de reação, para um volume final de 25 µl, constou de 2,5 µl de DNA molde, 1x PCR Buffer 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de cada desoxiribonucleotídeo (dNTP), 2 U de Platinum<sup>®</sup> *Taq* polimerase (todos os reagentes obtidos da Invitrogen – ThermoFisher Scientific, California, EUA). Os oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1) foram adicionados na reação nas seguintes concentrações: 0,4 µM para *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, 0,48 µM para *aph(2'')-Ib*, 0,07 µM para *aph(2'')-Ic*, 0,1 µM para *aph(2'')-Id*, 0,1 µM para *aph(III')-IIIa* e 0,1 µM para *ant(4')-Ia*.

As reações de amplificação ocorreram em um termociclador (*Veriti 96-Well Thermal Cycler*; Applied Biosystems), obedecendo aos seguintes parâmetros: 1 ciclo inicial de 3 min a 94 °C; 35 ciclos compostos por 94 °C por 40 s para desnaturação; 56 °C por 30 s para anelamento; e a 72 °C por 40 s para extensão. A extensão final ocorreu a 72 °C por 2 min. As

amostras utilizadas como controles foram: *E. faecium* SF11770 [positivo para *aph(2'')*-*Ib*, *aph(3')*-*IIIa* e *ant(4')*-*Ia*], *E. gallinarum* SF9117 [positivo para *aph(2'')*-*Ic*], *E. casseliflavus* SF11300 [positivo para *aph(2'')*-*Id*] e *E. casseliflavus* MB04541E [positivo para *aac(6')*-*Ie-aph(2'')*-*Ia*].

Para a detecção dos genes associados à resistência a níveis elevados de estreptomicina, a mistura de reação, em um volume final de 25 µL, continha PCR buffer 1x, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, e 1,25 U de *Taq* polimerase (Todos os reagentes obtidos da Ludwig Biotecnologia, RS, Brasil). As sequências iniciadoras (Tabela 1) foram adicionadas à reação nas seguintes concentrações: 0,1 µM de *ant(6')*-*Ia*, 0,12 µM de *ant(9')*-*Ia* e 0,16 µM de *ant(9')*-*Ib*. As amplificações foram realizadas em termociclador (*Veriti 96-Well Thermal Cycler*; Applied Biosystems) empregando a seguinte programação: uma etapa de desnaturação inicial de 5 min a 95 °C, 30 ciclos a 94 °C por 1 min para desnaturação; 55 °C por 1 min para anelamento; e 72 °C por 1 min para extensão; e uma etapa de extensão final a 72 °C por 10 min. Como controles positivos foram utilizadas as amostras *E. faecium* CL8287 [para *ant(6')*-*Ia* e *ant(9')*-*Ia*] e *E. faecalis* Fa-23 [para *ant(9')*-*Ib*].

#### 2.4.3 Detecção dos Genes Associados à Resistência aos Macrolídeos

Os genes *erm(A)*, *erm(B)* e *mef(A)*, que codificam para resistência aos macrolídeos foram identificados por metodologia de PCR em reações uniplex, de acordo com Sutcliffe et al. (1996) com modificações.

Para a detecção dos genes *mef(A)* e *erm(A)*, foram realizadas misturas de reações, em um volume final de 30 µL cada, contendo 2 µL do DNA molde, 1x PCR buffer, 10 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada sequência iniciadora (Tabela 1), 1,25 U de *Taq* polimerase e 50 mM de MgCl<sub>2</sub> (todos os reagentes da marca Ludwig Biotecnologia).

Para a amplificação, em termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) do gene *mef(A)*, foi empregado o seguinte protocolo: 1 ciclo de desnaturação inicial por 3 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 93 °C para desnaturação, anelamento a 54 °C por 1 min e 1 min a 72 °C para extensão, seguido de uma extensão final de 5 min a 72 °C. Para o gene *erm(A)*, os parâmetros utilizados foram: 1 ciclo de desnaturação inicial por 3 min a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 1 min a 93 °C para desnaturação, 1 min a 52 °C para anelamento e 1 min a 72 °C e um estágio de extensão final de 5 min a 72 °C.

As condições das reações para a detecção do gene *erm(B)* foram as seguintes: para um volume final de 30 µL foram utilizados 2 µL do DNA molde, 1x PCR Buffer (Invitrogen), 0,5 µM da sequência iniciadora, 1,25 U de Platinum<sup>®</sup> *Taq* polimerase (Invitrogen) e 50 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen). Os parâmetros de amplificação para *erm(B)*, em termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems), foram os seguintes: 3 min a 95 °C para desnaturação inicial, 35 ciclos de 1 min a 93 °C para desnaturação, 1 min a 52 °C para anelamento e 1 min a 72 °C para o ciclo de extensão, além de 5 min a 72 °C para extensão final.

As amostras de *Streptococcus* do grupo C 53157 [*erm(A)*], *Streptococcus* do grupo G 06196 [*mef(A)*] e *Streptococcus* do grupo G 015195 [*erm(B)*] foram utilizadas como controles positivos das reações.

#### 2.4.4 Detecção de Genes Associados à Resistência à Tetraciclina

A presença de quatro dos genes que codificam a resistência à tetraciclina, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)*, foi investigada por PCR multiplex, de acordo com as recomendações de Ng et al. (2001) com algumas modificações.

Cada mistura de reação, com volume final de 30 µL, constou de 2 µL do DNA molde, 1x PCR buffer (Invitrogen), 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 mM de cada dNTP, 1,5 U de Platinum *Taq* polimerase (Invitrogen) e oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1). Os iniciadores foram incluídos nas seguintes concentrações: 1,25 µM de *tet(K)*, 1,25 µM de *tet(O)*, 1 µM de *tet(L)* e 0,5 µM de *tet(M)*.

Os protocolos de amplificação em termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) constaram de: 94 °C por 5 min para desnaturação inicial, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 55 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min 30 s, e uma extensão final a 72 °C por 5 min.

As amostras *E. faecalis* AV11-07C2 [positivo para *tet(L)* e *tet(M)*], *Streptococcus agalactiae* CL5592 [positivo para *tet(O)*] e *Escherichia coli* CL5437 [positivo para *tet(K)*] foram utilizadas como controles dos testes.

Tabela 1 - Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de PCR para a caracterização genotípica de resistência a antimicrobianos em amostras de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isoladas de águas recreacionais praianas localizadas na cidade do Rio de Janeiro, RJ

| Gene                          | Sequências<br>(direção 5 – 3') <sup>1</sup>                     | Produto<br>em pb <sup>2</sup> |
|-------------------------------|---|-------------------------------|
| <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> | F: CAGGAATTTATCGAAAATGGTAGAAAAG<br>R: CACAATCGACTAAAGAGTACCAATC | 369                           |
| <i>aph(2'')-Ib</i>            | F: CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC<br>R: GTTTGTAGCAATTCAGAAACACCCTT   | 867                           |
| <i>aph(2'')-Ic</i>            | F: CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC<br>R: CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG       | 444                           |
| <i>aph(2'')-Id</i>            | F: GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC<br>R: CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC     | 641                           |
| <i>aph(3')-IIIa</i>           | F: GGCTAAAATGAGAATATCACCGG<br>R: CTTTAAAAAATCATAACAGCTCGCG      | 523                           |
| <i>ant(4')-Ia</i>             | F: CAAACTGCTAAATCGGTAGAAAGCC<br>R: GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT   | 294                           |
| <i>ant(6')-Ia</i>             | F: ACTGGCTTAATCAATTTGGG<br>R: GCCTTCCGCCACCTCACCG               | 577                           |
| <i>ant(9')-Ia</i>             | F: GGTCAGCAGTAAATGGTGGT<br>R: TGCCACATTCGAGCTAGGGTT             | 476                           |
| <i>ant(9')-Ib</i>             | F: CGTCGTATCTGAACCATTGACA<br>R: TCCATAATGGCTCTTCTCAC            | 351                           |
| <i>erm(A)</i>                 | F: GCATGACATAAACCTTCA<br>R: AGCTTATAATGAAACAGA                  | 206                           |
| <i>erm(B)</i>                 | F: GAAAGGGTACTCAACCAAATA<br>R: AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC         | 640                           |
| <i>mef(A)</i>                 | F: AGTATCATTAATCACTAGTGC<br>R: TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG            | 348                           |
| <i>tet(K)</i>                 | F: CAGCAGATCCTACTCCTT<br>R: TCGATAGGAACAGCAGTA                  | 169                           |
| <i>tet(L)</i>                 | F: TCGTAAGCGTGCTGTCATTC<br>R: GTATCCCACCAATGTCAGCGC             | 267                           |
| <i>tet(M)</i>                 | F: GTGGACAAAGGTACAACGAG<br>R: CGGTAAAGTTCGTCACACAC              | 496                           |
| <i>tet(O)</i>                 | F: AACTTAGGCATTCTGGCTCAC<br>R: TCCCACTGTTCCATATCGTCA            | 515                           |

<sup>1</sup>Sequências F – em ordem direta (do inglês, *forward*); R – em ordem reversa (do inglês, *reverse*);

<sup>2</sup>Tamanho dos produtos amplificados em pares de bases (pb).

Fonte: A autora, 2021, baseado em Swenson et al. (1995), Sutcliffe et al. (1996), Ng et al. (2001), Mahbub Alam et al. (2005) e Leelaporn et al. (2008).

#### 2.4.5 Eletroforese em Gel de Agarose e Análise dos Produtos Amplificados

Os produtos de amplificação dos testes de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (UltraPure Agarose, Invitrogen) a 1,2%, que foi preparada em solução tampão TBE 0,5X constituído de Tris base 0,2 M, ácido bórico 0,2 M e EDTA 0,5 M, pH 8,0 (reagentes obtidos da Bio-Rad Labs). Os parâmetros utilizados para a corrida eletroforética foram de 100 V por 1 h.

Após o tempo de corrida, os géis foram tratados com uma solução contendo brometo de etídio a 0,5 µg/mL por um período de 30 min, seguido de mais de 30 min em água. Em sequência, foram visualizados, sob luz UV, com auxílio do sistema de captura de imagens MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalém, Israel) e armazenados digitalmente com o auxílio do aplicativo GelCapture (DNR Bio-Imaging Systems). As corridas eletroforéticas foram acompanhadas de um padrão de pares de base (100bp *Ladder*, Invitrogen Co.) utilizado para estimar o tamanho dos produtos amplificados (Tabela 1).

#### 2.5 **Sequenciamento do Genoma Completo de Amostras de *E. faecalis* e *E. faecium***

Foram selecionadas 22 amostras isoladas de águas recreacionais praianas, para o sequenciamento do genoma completo, sendo sete pertencentes a espécie *E. faecalis* e 15 a *E. faecium*. A seleção das amostras foi baseada nos resultados obtidos nos testes fenotípicos de susceptibilidade aos antimicrobianos e locais de isolamento, considerando-se contemplar perfis de não susceptibilidade relevantes para o gênero, associados as diferentes praias de origem. Para fins comparativos foram incluídas, também, as sequências genômicas de 20 amostras pertencentes as mesmas espécies (10 genomas de cada espécie), que foram isoladas de pacientes hospitalizados em instituições do estado do Rio de Janeiro e oriundas de casos de colonização e de infecção. As amostras de origem humana foram isoladas e caracterizadas em estudos anteriores do nosso grupo.

### 2.5.1 Obtenção do DNA Genômico

O DNA foi obtido com auxílio do kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, WI, USA). Para tal, as amostras bacterianas foram cultivadas em meio TSB (do inglês, *trypticase soy broth* - Caldo triptona de soja, BD Diagnostics) e incubadas a  $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , por 18h-24h. Após esse período, uma alíquota de 1 mL do crescimento foi centrifugado (4.000 rpm / 2 min), o sobrenadante foi dispensado e as células foram suspensas em 480  $\mu\text{L}$  de EDTA a 50 mM acrescido de 120  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de lisozima a 10 mg/mL. A suspensão celular foi incubada por 1 h à  $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  e em seguida centrifugadas por 10 min a 4.000 rpm.

Os sobrenadantes foram então descartados e as células foram suspensas em 600  $\mu\text{L}$  da Solução de Lise, que compõe o kit utilizado (Promega). Após incubação a  $80^{\circ}\text{C}$  por 5 min, as suspensões foram acrescidas de 3  $\mu\text{L}$  de solução de RNase, homogeneizadas e adicionadas de 200  $\mu\text{L}$  da Solução para Precipitação de Proteínas (também presente no kit Promega). As suspensões foram reincubadas por 5 min em banho de gelo, centrifugadas uma vez a 4.000 rpm por 3 min e os sobrenadantes resultantes foram transferidos para um novo tubo. Nesta etapa, foram adicionados 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol, os tubos foram centrifugados por 2 min a 4.000 rpm, o mesmo volume de etanol 70% foi adicionado e foi realizada uma nova centrifugação nos mesmos parâmetros. Em sequência, os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos contendo o DNA foram reidratados com 100  $\mu\text{L}$  de Solução de Reidratação 9 (presente no kit Promega). Os tubos foram incubados por 1 h a  $65^{\circ}\text{C}$  e estocados a  $4^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso.

O DNA genômico extraído foi quantificado com auxílio do *Qubit 2.0 Fluorometer* (Invitrogen). Foram depositados 5  $\mu\text{g}$  de DNA genômico em placas de 96 poços (*MicroAmp Optical 96-Well Reaction plate*; Applied Biosystems), que foram enviadas para o serviço de sequenciamento do PennCHOP – *Microbiome Program*, pertencente a *University of Pennsylvania* e o *Children's Hospital of Philadelphia*, PA, EUA. O sequenciamento do genoma completo foi realizado com a colaboração com o Dr. Paul Joseph Planet, coordenador do laboratório em questão.

As bibliotecas genômicas foram construídas utilizando-se Illumina Nextera XT DNA (150- bp *paired-end reads*) e sequenciadas na plataforma de alto desempenho Illumina HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, EUA).

### 2.5.2 Avaliação de Qualidade e “Trimagem” das Reads

A sequências foram inicialmente investigadas quanto a sua qualidade e submetidas ao processo de “trimagem”.

Para tal, os arquivos brutos gerados do sequenciamento foram analisados pelo FastQC versão 0.11.8 (WINGETT; ANDREWS, 2018), para determinação do total de sequências geradas, tamanho, qualidade dos fragmentos e conteúdo de adaptadores.

O software Trim Galore! versão 0.6.2 (MARTIN, 2011) foi utilizado para a “trimagem” das sequências brutas, utilizando argumentos padrão. Esses procedimentos são fundamentais para remoção das *reads* e dos adaptadores, assim como as extremidades de baixa qualidade.

### 2.5.3 Montagem e Características Gerais dos Genomas

Após o processo de “trimagem” das *reads*, estas foram montadas pelo processo “*De novo*” na plataforma online PATRIC 3.6.9 (DAVIS et al., 2020), utilizando-se a estratégia “*auto*”. Esta estratégia seleciona o melhor programa de montagem de acordo com o tamanho dos fragmentos submetidos. Neste caso, por se tratar de um sequenciamento que gera fragmentos curtos (150 pb), a montagem através da estratégia “*auto*” foi realizada utilizando-se o programa Unicycler (WICK et al., 2017). O arquivo de contigs gerado foi utilizado nas análises posteriores. As métricas do sequenciamento e montagem, tais como: tamanho do genoma, percentual de conteúdo G+C, cobertura do sequenciamento e número de contigs – foram obtidas através do arquivo de métricas gerado automaticamente pelo PATRIC após o processo de montagem.

Em sequência, os genomas sequenciados das amostras de *E. faecalis* e de *E. faecium*, foram avaliados por diversas ferramentas computacionais e todos os programas utilizados foram executados no modo padrão.

## 2.6 *Multilocus Sequence Typing (MLST)*

As amostras sequenciadas tiveram a identificação dos respectivos STs através da tipificação de sequências em múltiplos loci, considerando-se o painel proposto por Ruiz-Garbajosa et al. (2006), para a espécie *E. faecalis*, e Homan et al. (2002), para *E. faecium*.

Os genes e respectivos produtos que constituem os painéis propostos são: (i) para *E. faecalis* – *aroE*, chiquimato desidrogenase; *gdh* glicose 6-fosfato desidrogenase; *gki*, glicose quinase, *gyd*, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; *pstS*, proteína transportadora de cassete de ligação de ATP fosfato; *xpt* xantina fosforribosil transferase; e *yqil*, acetil-coenzima A acetil transferase; (ii) para *E. faecium* – *adk*, adenilato quinase, *atpA*, subunidade  $\alpha$  da ATP sintetase, *ddl*, D-alanina-D-alanina ligase, *gdh*, *gyd*, *pstS*, e *purK*, fosforribosil-aminoimidazol carboxilase.

As análises foram realizadas através da plataforma online MLST finder versão 2.0 (LARSEN et al., 2012), pertencente ao servidor do CGE (*Center for Genomic Epidemiology*), com posterior confirmação utilizando-se o software mlst (SEEMANN, 2015).

## 2.7 *Estudo da Filogenia por Análise de SNPs*

Árvores de filogenia foram obtidas a partir do número de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) de cada uma das amostras estudadas em relação à respectiva referência da espécie, resultando no arranjo de matrizes de SNPs. Para *E. faecalis*, foi utilizado como referência o genoma da amostra V583 (AE016830.1), uma das primeiras desta espécie com a sequência publicada, e para *E. faecium* o da amostra AUS0004 (CP003351.1), que é pertencente ao ST17 e foi o primeiro genoma completo desta espécie descrito (BRODRICK et al., 2016; LAM et al., 2012; PINHOLT et al., 2015; VAN HAL et al., 2018).

### 2.7.1 Matrizes de SNPs

A etapa de alinhamento foi realizada utilizando-se as *reads* “trimadas” em relação à amostra de referência através do software BWA (do inglês, *burrows-wheeler aligner*) versão 0.7.17 (LI; DURBIN, 2009). Posteriormente, foi utilizado o software SAMtools versão 1.4,

para a chamada de variantes (LI et al., 2009). Adicionalmente, foi empregado um filtro (BCFFILTER) para sítios que obtiveram uma baixa qualidade durante o alinhamento e a detecção de variantes utilizando o comando: -g 12.

Em seguida, utilizando-se um script interno, gentilmente cedido pelo Dr. Paul Planet, denominado de *snp\_matrixBuilder.pl*, os arquivos VCF (do inglês, *variant calling format*) gerados na análise anterior foram utilizados para criar uma matriz de SNPs em relação a amostra de referência de cada espécie. Variantes que possuíam um valor de qualidade menor que 20 foram excluídas da matriz através da utilização do comando -q 20.

### 2.7.2 Construção das Árvores de Filogenia

A reconstrução das relações filogenéticas foi realizada através de máxima verossimilhança. Para tal, utilizando as matrizes de SNPs, foi utilizado um script interno, gentilmente fornecido pelo Dr. Paul Planet, denominado de *snp\_invariant\_screen.pl*, para corrigir os problemas com sítios invariantes. As análises foram então realizadas com o programa RAxML versão 8.2.4 (STAMATAKIS, 2014), com valor de *bootstrap* estipulado em 100 replicações e modelo evolutivo GTR+G. As árvores foram construídas pelo método clássico de enraizamento pelo ponto médio (do inglês, *midpoint rooting*) e visualizadas na plataforma online iTOL versão 5 (LETUNIC; BORK, 2019).

Para construção das árvores baseadas no genoma acessório, as sequências montadas pelo PATRIC, foram submetidas à anotação através do programa PROKKA versão 1.13.17 (SEEMANN, 2014). A partir dos arquivos \*.gff gerados na anotação, o software Roary versão 3.11.2 (ANDREW et al., 2015) foi utilizado para estimar o genoma acessório das amostras - estudadas. As árvores de filogenia foram construídas automaticamente durante as análises pelo realizadas pelo software Roary.

## 2.8 **Estudo do Conteúdo Genético**

A avaliação do conteúdo genético teve como objetivo identificar genes presentes no genoma das amostras bacterianas das duas espécies avaliadas (*E. faecalis* e *E. faecium*),

destacando-se aqueles que compõem o resistoma (associados à resistência aos antimicrobianos), o viruloma (que codificam para fatores de virulência) e profagos como representantes do mobiloma, além do sistema CRISPR-Cas associado à imunidade bacteriana contra aquisição de material genético externo. As análises foram realizadas comparando-se o conteúdo genético das amostras bacterianas por espécie e entre os dois cenários estudados (águas praianas e pacientes hospitalizados).

Para a anotação do resistoma, foram utilizadas as plataformas online Resfinder versão 3.2 (ZANKARI et al., 2012) e CARD (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) versão 3.0.8 (ALCOCK et al., 2020) e os determinantes de virulência foram anotados pelas plataformas VirulenceFinder versão 2.0 (JOENSEN et al., 2014) e VFDB (*Virulence Factor Database*) versão 2019 (LIU et al., 2019).

A identificação de profagos, foi realizada na plataforma online PHASTER (*phage search tool enhanced release*) (ARNDT et al., 2016), sendo anotados apenas aqueles que obtiveram uma pontuação superior a 90, que são considerados pelo programa como intactos.

A presença do sistema CRISPR-cas (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats and associated proteins*) foi avaliada a partir da plataforma online CRISPRCasFinder versão 1.1.2 (COUVIN et al., 2018). Foram consideradas regiões associadas à CRISPR apenas aquelas apresentaram nível de evidência 4, conforme descrito nas recomendações do programa. Esse valor atesta a confiabilidade dos resultados e se baseia no número de espaçadores, na conservação das sequências repetitivas e em uma maior similaridade entre as matrizes CRISPR existentes.

## 2.9 Análises Estatísticas

A comparação entre diferentes grupos para os diversos parâmetros obtidos com as análises do sequenciamento do genoma completo foi realizada através do emprego do teste-t não pareado com posteriores comparações pelo teste de Welch, uma vez que foi assumido que os desvios-padrão para cada grupo não eram semelhantes. As análises foram realizadas com o aplicativo *GraphPad Prism* versão 9.0 (GraphPad Software Inc.). Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

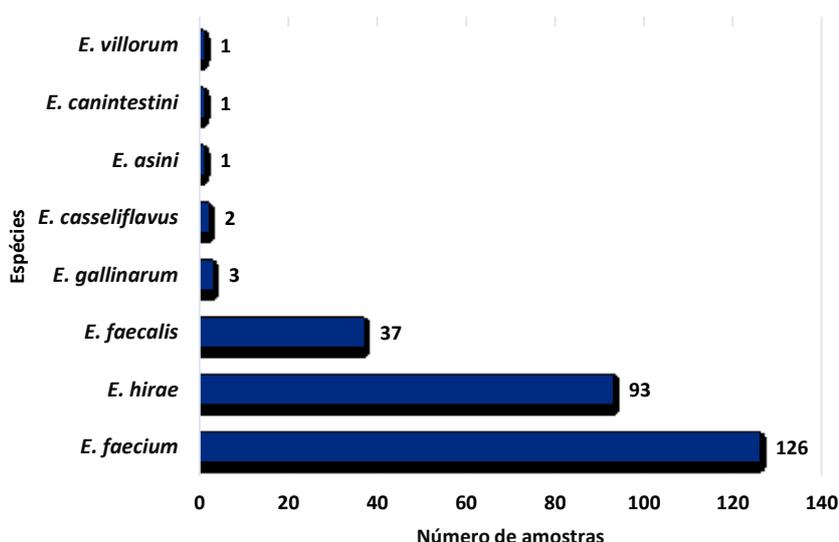
### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Caracterização da Amostragem

Foram avaliadas 264 amostras selecionadas de *Enterococcus* isoladas de águas recreacionais praianas, localizadas na cidade do Rio de Janeiro, RJ (praias de Botafogo, Copacabana, Flamengo, Ipanema e Leblon), no período de 2013 a 2015. A confirmação da caracterização das amostras bacterianas em gênero e espécies foi realizada por metodologia de espectrometria de massas MALDI-TOF MS.

Os resultados obtidos demonstraram que a espécie com maior número de amostras foi *E. faecium* (126 amostras). Também, foram identificadas espécies pouco comuns como *E. asini*, *E. canintestini* e *E. villorum* (uma amostra cada). O Gráfico 1 apresenta a distribuição por espécie das 264 amostras avaliadas.

Gráfico 1 - Distribuição por espécie de 264 amostras do gênero *Enterococcus* isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro, nos anos de 2013 a 2014, e caracterizadas por metodologia de espectrometria de massas (MALDI-TOF)



Fonte: A autora, 2021.

Para todas as 264 amostras, os escores obtidos por MALDI-TOF garantiram uma identificação segura para gênero e altamente provável para espécie (escores  $\geq 2,300$ ) ou, em alguns poucos casos, segura para o gênero e provável para espécie (escores de 2,000 a 2,299).

Considerando-se a distribuição das amostras bacterianas em relação a origem de isolamento (praias), 29,2% (77/264) foram isoladas da praia de Botafogo, 20,1% (53/264) do Flamengo, 17,8% (47/264) do Leblon, 17,4% de Ipanema (46/264) e 15,5% de Copacabana (41/264) (Tabela 2).

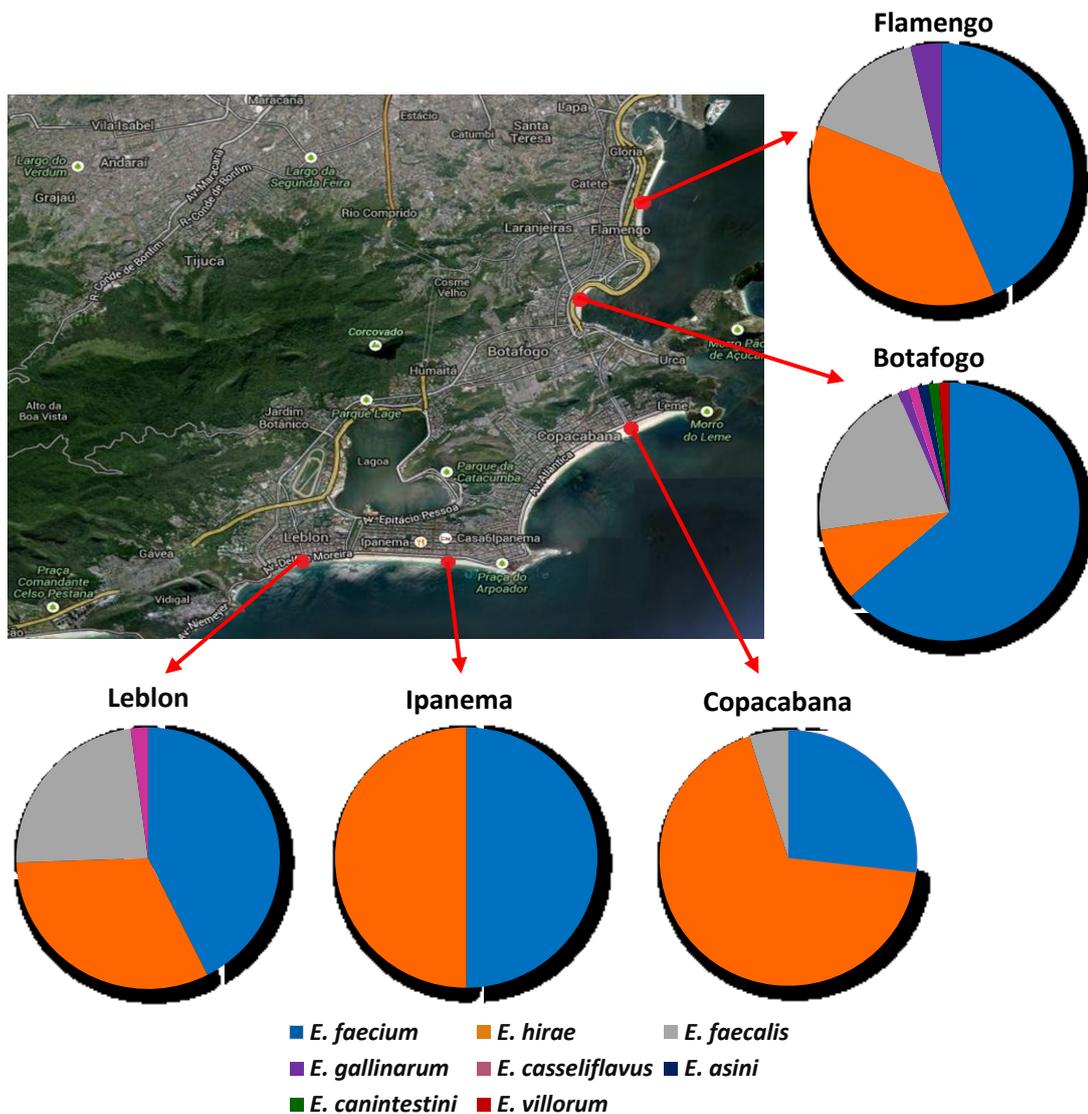
Pelo menos duas espécies diferentes foram identificadas em todas as praias avaliadas. Os resultados apontaram uma maior variedade de espécies na praia Botafogo, seguida das praias Flamengo (ambas pertencentes a Baía de Guanabara) e do Leblon. Um total de oito espécies distintas de *Enterococcus* foram identificadas dentre as 77 amostras bacterianas isoladas na praia de Botafogo. Enquanto apenas duas espécies distintas foram identificadas dentre as 46 amostras de *Enterococcus* isoladas da praia de Ipanema (Tabela 2). Já a distribuição de cada uma das espécies pelo total de amostras isoladas de uma única praia de origem está representada na Figura 1.

Tabela 2 - Distribuição das espécies em 264 amostras de *Enterococcus* por origem de isolamento – águas recreacionais praianas (praias da Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro, RJ)

| Praias     | Número de amostras / espécie |                 |                    |                      |                         |                 |                        |                    | Total (N°) |
|------------|------------------------------|-----------------|--------------------|----------------------|-------------------------|-----------------|------------------------|--------------------|------------|
|            | <i>E. faecium</i>            | <i>E. hirae</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>E. gallinarum</i> | <i>E. casseliflavus</i> | <i>E. asini</i> | <i>E. canintestini</i> | <i>E. villorum</i> |            |
| Botafogo   | 49                           | 7               | 16                 | 1                    | 1                       | 1               | 1                      | 1                  | 77         |
| Copacabana | 11                           | 28              | 2                  | -                    | -                       | -               | -                      | -                  | 41         |
| Flamengo   | 23                           | 20              | 8                  | 2                    | -                       | -               | -                      | -                  | 53         |
| Ipanema    | 23                           | 23              | -                  | -                    | -                       | -               | -                      | -                  | 46         |
| Leblon     | 20                           | 15              | 11                 | -                    | 1                       | -               | -                      | -                  | 47         |
| Total (N°) | 126                          | 93              | 37                 | 3                    | 2                       | 1               | 1                      | 1                  | 264        |

-, nenhuma amostra. Fonte: A autora, 2021.

Figura 1 - Frequência de diferentes espécies em 264 amostras de *Enterococcus* obtidas de águas recreacionais praianas<sup>1</sup> da cidade do Rio de Janeiro, em relação ao local de isolamento



Fonte: A autora, 2021.

### 3.2 Susceptibilidade aos Antimicrobianos e Perfis de Multirresistência

Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, baseados nos critérios de interpretação do CLSI (2020) e EUCAST (2020), estão demonstrados na Tabela 3. Considerando-se as 264 amostras estudadas, foram observadas taxas elevadas de

susceptibilidade para 16 dos 18 antimicrobianos testados (excetuando-se eritromicina e rifampicina). Todas as amostras foram sensíveis à teicoplanina e apenas cinco amostras foram classificadas na categoria intermediária para vancomicina.

Tabela 3 - Distribuição de 264 amostras de *Enterococcus*, isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro, por categoria de susceptibilidade<sup>1</sup> baseada nos testes de difusão em ágar (disco-difusão)

| Antimicrobianos             | % de amostras por categoria de susceptibilidade (nº/total) |                  |                   |
|-----------------------------|--|------------------|-------------------|
|                             | Sensível   | Intermediário    | Resistente        |
| Ampicilina                  | 98,9<br>(261/264)  | NA <sup>2</sup>  | 1,1<br>(3/264)    |
| Ciprofloxacina              | 76,5<br>(202/264)  | 17,8<br>(47/264) | 5,7<br>(15/264)   |
| Cloranfenicol               | 91,3<br>(241/264)  | 6,8<br>(18/264)  | 1,9<br>(5/264)    |
| Eritromicina                | 25,8<br>(68/264)   | 31,4<br>(83/264) | 42,8<br>(113/264) |
| Estreptomicina <sup>3</sup> | 91,3<br>(241/264)  | -<br>(0/264)     | 8,7<br>(23/264)   |
| Fosfomicina                 | 90,5<br>(239/264)  | 3,4<br>(9/264)   | 6,1<br>(16/264)   |
| Gentamicina <sup>3</sup>    | 97,7<br>(258/264)  | -<br>(0/264)     | 2,3<br>(6/264)    |
| Levofloxacina               | 94,3<br>(249/264)  | 5,3<br>(14/264)  | 0,4<br>(1/264)    |
| Linezolida                  | 98,5<br>(260/264)  | 1,1<br>(3/264)   | 0,4<br>(1/264)    |
| Nitrofurantoína             | 62,5<br>(165/264)  | 22,3<br>(59/264) | 15,2<br>(40/264)  |
| Norfloxacina                | 90,9<br>(240/264)  | 6,4<br>(17/264)  | 2,7<br>(7/264)    |
| Penicilina                  | 97,3<br>(257/264)  | NA               | 2,7<br>(7/264)    |
| Quinupristina/Dalfopristina | 85,3<br>(225/264)  | 3,0<br>(8/264)   | 11,7<br>(31/264)  |
| Rifampicina                 | 46,6<br>(123/264)  | 7,2<br>(19/264)  | 46,2<br>(122/264) |
| Teicoplanina                | 100<br>(264/264)   | -<br>(0/264)     | -<br>(0/264)      |
| Tetraciclina                | 76,5<br>(202/264)  | 1,9<br>(5/264)   | 21,6<br>(57/264)  |
| Tigeciclina                 | 98,5<br>(260/264)  | 0,8<br>(2/264)   | 0,8<br>(2/264)    |
| Vancomicina                 | 98,1<br>(259/264)  | 1,9<br>(5/264)   | -<br>(0/264)      |

<sup>1</sup>Segundo as recomendações do CLSI (2020) e EUCAST (2020); <sup>2</sup>Não se aplica; <sup>3</sup>Níveis elevados de resistência.  
Fonte: A autora, 2021.

Para a determinação das taxas de não susceptibilidade aos antimicrobianos, nas diferentes espécies de enterococos, foi considerado o somatório das categorias intermediária e resistente, de acordo com os critérios de interpretação mencionados anteriormente, para cada antimicrobiano testado.

Em relação as amostras pertencentes à espécie *E. faecalis* (N=37), foram observados percentuais elevados de amostras não susceptíveis para eritromicina (100%; 37/37), rifampicina (70,3%; 26/37) e tetraciclina (81,1%; 30/37). Além disso, também foi observado um percentual elevado de amostras de *E. faecalis* não susceptível a quinupristina-dalfopristina (94,6%; 35/37). Entretanto, ressalta-se que apesar de ser uma característica intrínseca desta espécie, não foi identificada em todas as amostras (duas amostras foram caracterizadas na categoria sensível).

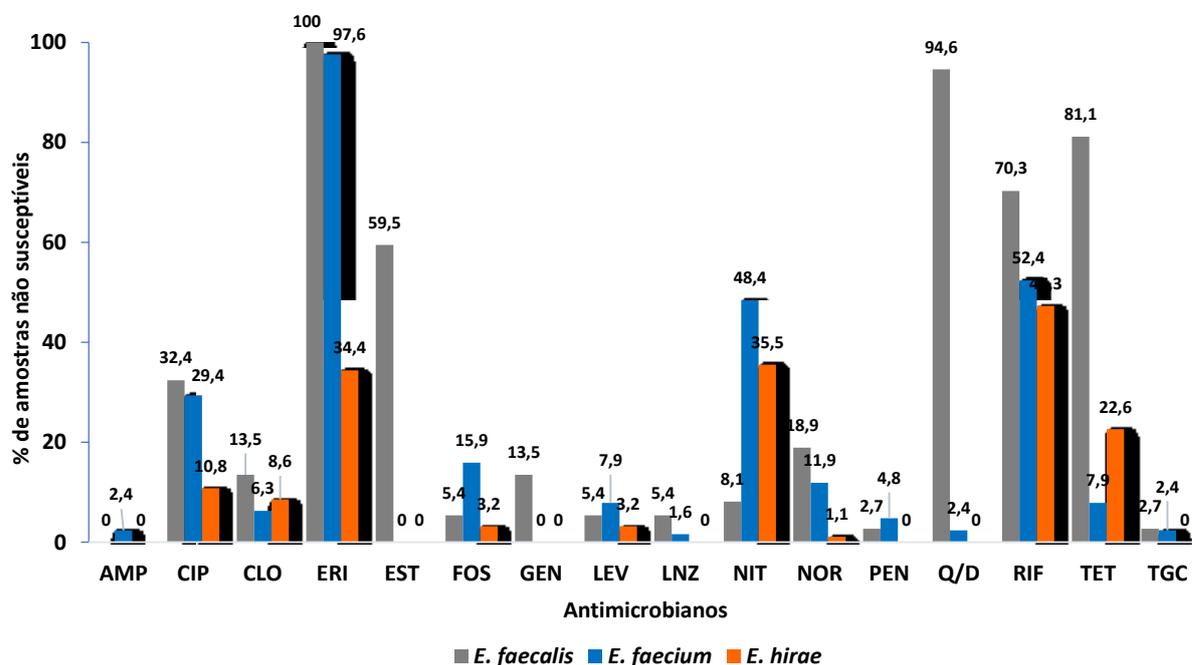
Quanto as amostras pertencentes à espécie *E. faecium* (N=126), destacaram-se os percentuais não susceptibilidade aos seguintes antimicrobianos: eritromicina (97,6%; 123/126), nitrofurantoína (48,4; 61/126) e rifampicina (52,4%; 66/126).

No geral, as amostras pertencentes a espécie *E. hirae* apresentaram taxas de não susceptibilidade menores que as identificadas para *E. faecalis* e *E. faecium*. Apesar disso, cabe ressaltar que taxas de não susceptibilidade superiores a 30% foram identificadas para eritromicina, nitrofurantoína e rifampicina.

Adicionalmente, foi observada a presença no ambiente estudado (água de praias) de amostras de enterococos não susceptíveis às fluoroquinolonas, como ciprofloxacina, com taxas de 32,4% (12/37), 29,4% (37/126) e 10,8% (10/93); e levofloxacina, 5,4% (2/37), 7,9% (10/126) e 3,2% (3/93), para *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. hirae*, respectivamente. Também, foram identificados percentuais de não susceptibilidade de 5,4% (2/37) e 1,6% (2/126) para linezolida e de 2,7% (1/37) e de 2,4% (3/126) para tigeciclina nas amostras de *E. faecalis* e *E. faecium*, respectivamente.

O Gráfico 2 representa a distribuição das amostras não susceptíveis e pertencentes às espécies *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. hirae*, considerando-se que foram as espécies prevalentes na amostragem avaliada. Todas as amostras pertencentes a essas três espécies foram sensíveis à teicoplanina e vancomicina e esses antimicrobianos não foram, portanto, incluídos nessa representação gráfica.

Gráfico 2 - Percentuais de amostras não susceptíveis<sup>1</sup> a 16 antimicrobianos, pertencentes às espécies *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus hirae* e isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro



Legenda: <sup>1</sup>Não susceptível, corresponde ao somatório das amostras classificadas nas categorias intermediária e resistente; AMP, ampicilina; CIP, ciprofloxacina; CLO, cloranfenicol; ERI, eritromicina; EST, estreptomicina em níveis elevados; FOS, fosfomicina; GEN, gentamicina em níveis elevados; LEV, levofloxacina; LNZ, linezolida; NIT, nitrofurantoína; NOR, norfloxacina; PEN, penicilina; Q/D, quinupristina/dalfopristina; RIF, rifampicina; TET, tetraciclina, TGC, tigeciclina. Todas as amostras pertencentes as espécies *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. hirae* foram sensíveis à vancomicina e a teicoplanina.

Fonte: A autora, 2021.

Por outro lado, todas as amostras pertencentes as demais espécies de enterococos, que compuseram a amostragem deste estudo, foram sensíveis aos seguintes antimicrobianos: ampicilina, fosfomicina, levofloxacina, linezolida, penicilina, teicoplanina e tigeciclina. Destaca-se, entretanto que a amostra pertencente a espécie *E. asini* não foi susceptível a oito dos 18 antimicrobianos testados. A Tabela 4 apresenta o perfil de susceptibilidade das amostras dessas espécies.

O fenótipo HLAR, característica importante entre amostras do gênero *Enterococcus*, foi identificado em amostras pertencentes as espécies *E. faecalis* e *E. asini*. Para a espécie *E. faecalis* foi identificado que 59,5% (22/37) exibiram níveis elevados de resistência a estreptomicina, enquanto 13,5% (5/37) foram resistentes à níveis elevados de gentamicina, como demonstrado no Gráfico 2. A única amostra de *E. asini* apresentou fenótipo HLAR para ambos os aminoglicosídeos concomitantemente (Tabela 4).

Tabela 4 - Perfis de não susceptibilidade<sup>1</sup> de amostras de *Enterococcus* isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro e pertencentes a espécies menos frequentes neste estudo

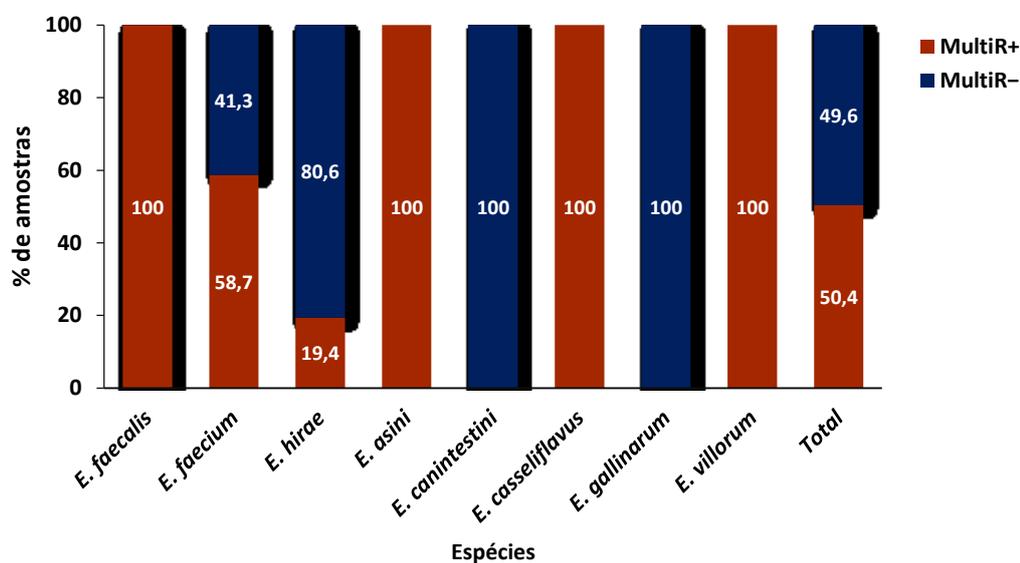
| Antimicrobianos             | Espécies de <i>Enterococcus</i> (Número de amostras não susceptíveis) |                                 |                                  |                               |                             |
|-----------------------------|---|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
|                             | <i>E. asini</i><br>(N=1)  | <i>E. canintestini</i><br>(N=1) | <i>E. casseliflavus</i><br>(N=2) | <i>E. gallinarum</i><br>(N=3) | <i>E. villorum</i><br>(N=1) |
| Ciprofloxacina              | -   | -                               | 2                                | 1                             | -                           |
| Cloranfenicol               | 1   | -                               | -                                | -                             | 1                           |
| Eritromicina                | 1   | 1                               | 2                                | -                             | -                           |
| Estreptomicina <sup>2</sup> | 1   | -                               | -                                | -                             | -                           |
| Gentamicina <sup>2</sup>    | 1   | -                               | -                                | -                             | -                           |
| Nitrofurantoína             | 1   | -                               | -                                | -                             | 1                           |
| Norfloxacina                | -   | -                               | -                                | 1                             | -                           |
| Q/D <sup>3</sup>            | 1   | -                               | -                                | -                             | -                           |
| Rifampicina                 | 1   | 1                               | -                                | 2                             | 1                           |
| Tetraciclina                | 1   | -                               | -                                | -                             | -                           |
| Vancomicina                 | -   | -                               | 2 <sup>4</sup>                   | 3 <sup>4</sup>                | -                           |

<sup>1</sup>Não susceptível, corresponde ao somatório das amostras classificadas nas categorias intermediária e resistente; <sup>2</sup>Níveis elevados de resistência; <sup>3</sup>Quinupristina/Dalfopristina; <sup>4</sup>Corresponde a resistência intrínseca aos glicopeptídeos que é característica da espécie. Todas as amostras foram sensíveis a ampicilina, fosfomicina, levofloxacina, linezolida, penicilina, teicoplanina e tigeciclina. Os resultados foram computados segundo as recomendações do CLSI (2020) e EUCAST (2020).

Fonte: A autora, 2021.

Foram identificadas amostras bacterianas portadoras de fenótipo de multirresistência (Gráfico 3). A taxa geral de multirresistência foi de 50,4% (133/264). Todas as amostras pertencentes a espécie *E. faecalis* (100%; 37/37) foram não susceptíveis a pelo menos três classes distintas dentre os antimicrobianos testados. Também, as únicas amostras pertencentes a *E. asini* e *E. villorum*, além das duas amostras de *E. casseliflavus* foram multirresistentes pelos critérios utilizados (não susceptibilidade a três ou mais classes de antimicrobianos).

Gráfico 3 - Taxas de multirresistência<sup>1</sup> entre 264 amostras de *Enterococcus* isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro



Legenda: Amostras não susceptíveis (somatório das categorias intermediária e resistente) a pelo menos três classes distintas de antimicrobianos (incluindo fenótipos de resistência intrínseca); MultiR<sup>+</sup>, multirresistentes; MultiR<sup>-</sup>, não multirresistentes.

Fonte: A autora, 2021.

Considerando-se o total de amostras para cada origem de isolamento, águas praianas, foi observado que a praia de Botafogo apresentou a maior taxa de isolamento de amostras multirresistentes (66,2; 51/77), seguida das praias do Leblon (59,6%; 28/47) e Flamengo (50,9%; 27/53). Em relação as espécies e respectiva origem de isolamento, a maior taxa de multirresistência para *E. faecium* foi identificada para as amostras obtidas da praia do Leblon (65%; 13/20). Já para *E. hirae* esse valor foi mais elevado para as amostras isoladas da praia de Botafogo (42,9%; 3/7). Amostras provenientes da praia de Ipanema, apresentaram as menores taxas de multirresistência, independente da espécie. A Tabela 5 apresenta a distribuição das amostras multirresistentes em relação a respectiva espécie e origem de isolamento.

Tabela 5 - Taxas (%) de multirresistência<sup>1</sup> em 264 amostras de diferentes espécies de *Enterococcus* em relação as respectivas origens de isolamento (águas praianas da cidade do Rio de Janeiro)

| Praias               | Taxa (%) de multirresistência por espécie<br>(nº de amostras/total de amostras por local de origem) |                              |                           |                          |                                 |                                  |                               |                             | Total             |
|----------------------|---|------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------|
|                      | <i>E. faecalis</i><br>(N=37)  | <i>E. faecium</i><br>(N=126) | <i>E. hirae</i><br>(N=93) | <i>E. asini</i><br>(N=1) | <i>E. canintestini</i><br>(N=1) | <i>E. casseliflavus</i><br>(N=2) | <i>E. gallinarum</i><br>(N=3) | <i>E. villorum</i><br>(N=1) |                   |
| Botafogo<br>(N=77)   | 100<br>(16/16)  | 59,2<br>(29/49)              | 42,9<br>(3/7)             | 100<br>(1/1)             | 0<br>(0/1)                      | 100<br>(1/1)                     | 0<br>(0/1)                    | 100<br>(1/1)                | 66,2<br>(51/77)   |
| Copacabana<br>(N=41) | 100<br>(2/2)  | 63,6<br>(7/11)               | 14,3<br>(4/28)            | -                        | -                               | -                                | -                             | -                           | 31,7<br>(13/41)   |
| Flamengo<br>(N=53)   | 100<br>(8/8)  | 56,5<br>(13/23)              | 30,0<br>(6/20)            | -                        | -                               | -                                | 0<br>(0/2)                    | -                           | 50,9<br>(27/53)   |
| Ipanema<br>(N=46)    | 2   | 52,2<br>(12/23)              | 8,7<br>(2/23)             | -                        | -                               | -                                | -                             | -                           | 30,4<br>(14/46)   |
| Leblon<br>(N=47)     | 100<br>(11/11)  | 65,0<br>(13/20)              | 20,0<br>(3/15)            | -                        | -                               | 100<br>(1/1)                     | -                             | -                           | 59,6<br>(28/47)   |
| Total<br>(N=264)     | 100<br>(37/37)  | 58,7<br>(74/126)             | 19,4<br>(18/93)           | 100<br>(1/1)             | 0<br>(0/1)                      | 100<br>(2/2)                     | 0<br>(0/3)                    | 100<br>(1/1)                | 50,4<br>(133/264) |

<sup>1</sup>Multirresistência foi admitida como percentuais de amostras não susceptíveis (somatório das categorias intermediária e resistente) a pelo menos três classes distintas de antimicrobianos (incluindo fenótipos de resistência intrínseca); <sup>2</sup>-, nenhuma amostra.

Fonte: A autora, 2021.

Dentre as 133 amostras bacterianas multirresistentes, foi identificado um total de 70 perfis distintos, representados por fenótipos de não susceptibilidade, que variaram de três a oito classes de antimicrobianos. Dentre esses, 20 perfis reuniram duas ou mais amostras cada (Tabela 6), sendo que o perfil prevalente agrupou 24 amostras bacterianas (18,1% das amostras; 24/133) e correspondeu a um fenótipo de não susceptibilidade à eritromicina, nitrofurantoína e rifampicina).

Tabela 6 - Perfis de multirresistência<sup>1</sup> de amostras de *Enterococcus* isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro, que reuniram mais de duas amostras cada

| Número de classes de antimicrobianos | Perfil de multirresistência                        | % de amostras (Nº / total de amostras MR) |
|--------------------------------------|--|---|
| 3                                    | ERI, NIT, RIF                                      | 18,1 (24/133)                             |
|                                      | CIP, ERI, NIT                                      | 4,5 (6/133)                               |
|                                      | ERI, FOS, NIT                                      | 3,8 (5/133)                               |
|                                      | CIP, ERI, FOS                                      | 3,0 (4/133)                               |
|                                      | CLO, NIT, RIF                                      | 2,3 (3/133)                               |
|                                      | CIP, ERI, RIF                                      | 1,5 (2/133)                               |
|                                      | ERI, FOS, TET                                      |   |
|                                      | ERI, Q/D, RIF                                      |   |
|                                      | ERI, RIF, TET                                      |   |
|                                      | CIP, ERI, VAN                                      |   |
| CIP, ERI, LEV, RIF                   | 3,8 (5/133)  |   |
| CIP, ERI, FOS, LEV, NOR              |  |   |
| ERI, EST, Q/D, TET                   |  |   |
| 4                                    | CIP, ERI, NIT, RIF                                 | 2,3 (3/133)                               |
|                                      | ERI, NIT, RIF, TET                                 | 1,5 (2/133)                               |
|                                      | CLO, ERI, NIT, RIF                                 | 6,0 (8/133)                               |
| 5                                    | ERI, EST, Q/D, RIF, TET                            | 1,5 (2/133)                               |
|                                      | CIP, ERI, EST, Q/D, TET<br>ERI, NOR, Q/D, RIF, TET | 1,5 (2/133)                               |
| 6                                    | CIP, ERI, EST, Q/D, RIF, TET                       | 1,5 (2/133)                               |

Legenda: Perfis indicam a não susceptibilidade a: CIP, ciprofloxacina; CLO, cloranfenicol; ERI, eritromicina; EST, estreptomicina em níveis elevados; FOS, fosfomicina; LEV, levofloxacina; NIT, nitrofurantoína; NOR, norfloxacina; Q/D, quinupristina/dalfopristina; RIF, rifampicina; TET, tetraciclina. MR, multirresistente.

Fonte: A autora, 2021.

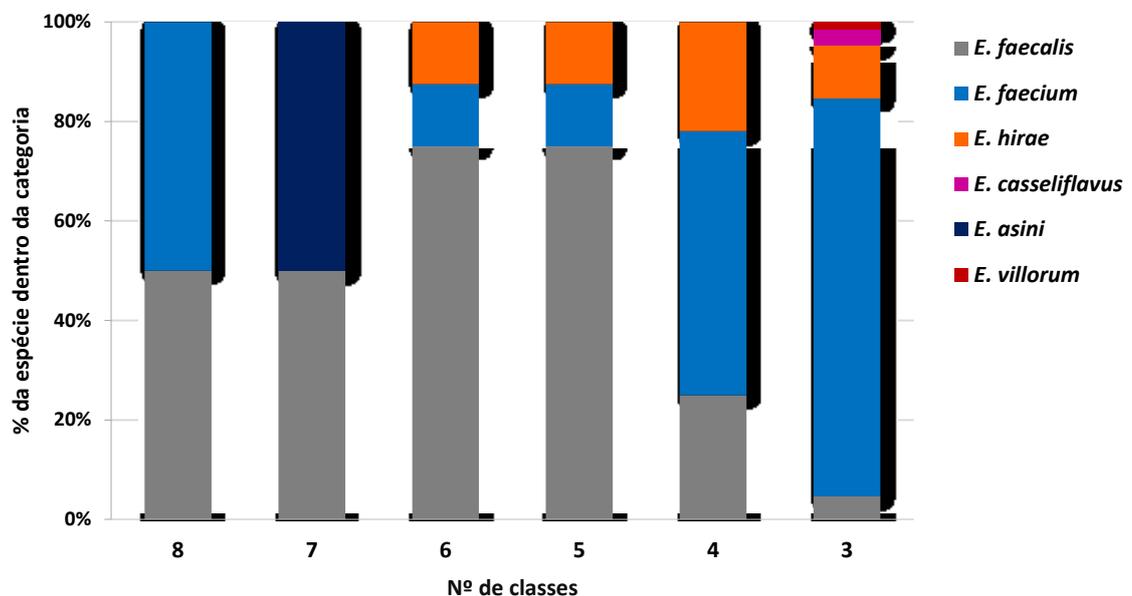
Entretanto, foram identificados 50 perfis únicos (71,4%; 50/70), com apenas uma amostra cada, que apresentaram variados fenótipos de não susceptibilidade. Esses perfis únicos se distribuíram da seguinte forma: dois foram representativos de não susceptibilidade a 8 classes de antimicrobianos; dois a sete classes; seis a seis classes; 12 a cinco classes; 19 a quatro classes; e nove a três classes.

Perfis de multirresistência foram também avaliados em relação ao número de classes de antimicrobianos as quais as amostras foram não susceptíveis *versus* as respectivas espécies. Os resultados demonstraram que apenas as amostras pertencentes as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* não foram susceptíveis a oito classes de antimicrobianos concomitantemente.

Enquanto amostras das espécies *E. faecium* e *E. asini* não foram susceptíveis a sete classes de antimicrobianos.

O Gráfico 4 apresenta a distribuição do número de classes de antimicrobianos que compuseram os perfis de multirresistência para cada uma das espécies identificadas neste estudo.

Gráfico 4 - Distribuição das espécies de *Enterococcus* exibindo perfis de multirresistência e isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro, de acordo com o número de classes de antimicrobianos aos quais foram não suscetíveis



Legenda: os percentuais foram calculados em relação ao número máximo de amostras não susceptíveis por categoria (número de classes). Total de amostras por categoria: 8 classes – duas amostras; 7 classes – duas amostras; 6 classes – oito amostras; 5 classes – 24 amostras; 4 classes – 32 amostras; 3 classes – 65 amostras.

Fonte: A autora, 2021.

A distribuição dos perfis de multirresistência entre as espécies de *Enterococcus*, identificou que as 37 amostras de *E. faecalis* apresentaram 23 perfis distintos. Dentre as 74 amostras de *E. faecium* foram observados 36 perfis de multirresistência e todas as 16 amostras multirresistentes de *E. hirae* apresentaram perfis diferentes. As duas amostras de *E. casseliflavus* pertenceram a um único perfil de multirresistência.

Dos 70 perfis de multirresistência identificados, sete (10,0%; 7/70) foram compartilhados entre espécies distintas (Tabela 7). Adicionalmente, perfis de multirresistência idênticos também foram compartilhados por amostras da mesma espécie, porém de praias distintas.

Tabela 7 - Perfis de multirresistência<sup>1</sup> compartilhados por mais de uma espécie de *Enterococcus* isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro

| Perfil de multirresistência | Nº de classes de antimicrobianos | Número de amostras no perfil | Espécies (Nº de amostras)  |
|-----------------------------|----------------------------------|------------------------------|--|
| ERI, NIT, RIF               | 3                                | 24                           | <i>E. faecium</i> (23)<br><i>E. hirae</i> (1)                          |
| CLO, NIT, RIF               | 3                                | 3                            | <i>E. hirae</i> (2)<br><i>E. villorum</i> (1)                          |
| ERI, Q/D, RIF               | 3                                | 2                            | <i>E. faecalis</i> (1)<br><i>E. faecium</i> (1)                        |
| CIP, ERI, LEV, RIF          | 3                                | 2                            | <i>E. faecium</i> (1)<br><i>E. hirae</i> (1)                           |
| CIP, ERI, NIT, RIF          | 4                                | 3                            | <i>E. faecium</i> (2)<br><i>E. hirae</i> (1)                           |
| CLO, ERI, NIT, RIF          | 4                                | 3                            | <i>E. faecalis</i> (1)<br><i>E. faecium</i> (1)<br><i>E. hirae</i> (1) |
| ERI, NIT, RIF, TET          | 4                                | 2                            | <i>E. faecium</i> (1)<br><i>E. hirae</i> (1)                           |

Legenda: Perfis indicam a não susceptibilidade a: CIP, ciprofloxacina; CLO, cloranfenicol; ERI, eritromicina; LEV, levofloxacina; NIT, nitrofurantoína; NOR, Q/D, quinupristina/dalfopristina; RIF, rifampicina; TET, tetraciclina.

Fonte: A autora, 2021.

### 3.3 Genótipos de Resistência aos Macrolídeos, Tetraciclina e a Níveis Elevados de Aminoglicosídeos nas Amostras das Espécies *E. faecalis* e *E. faecium*

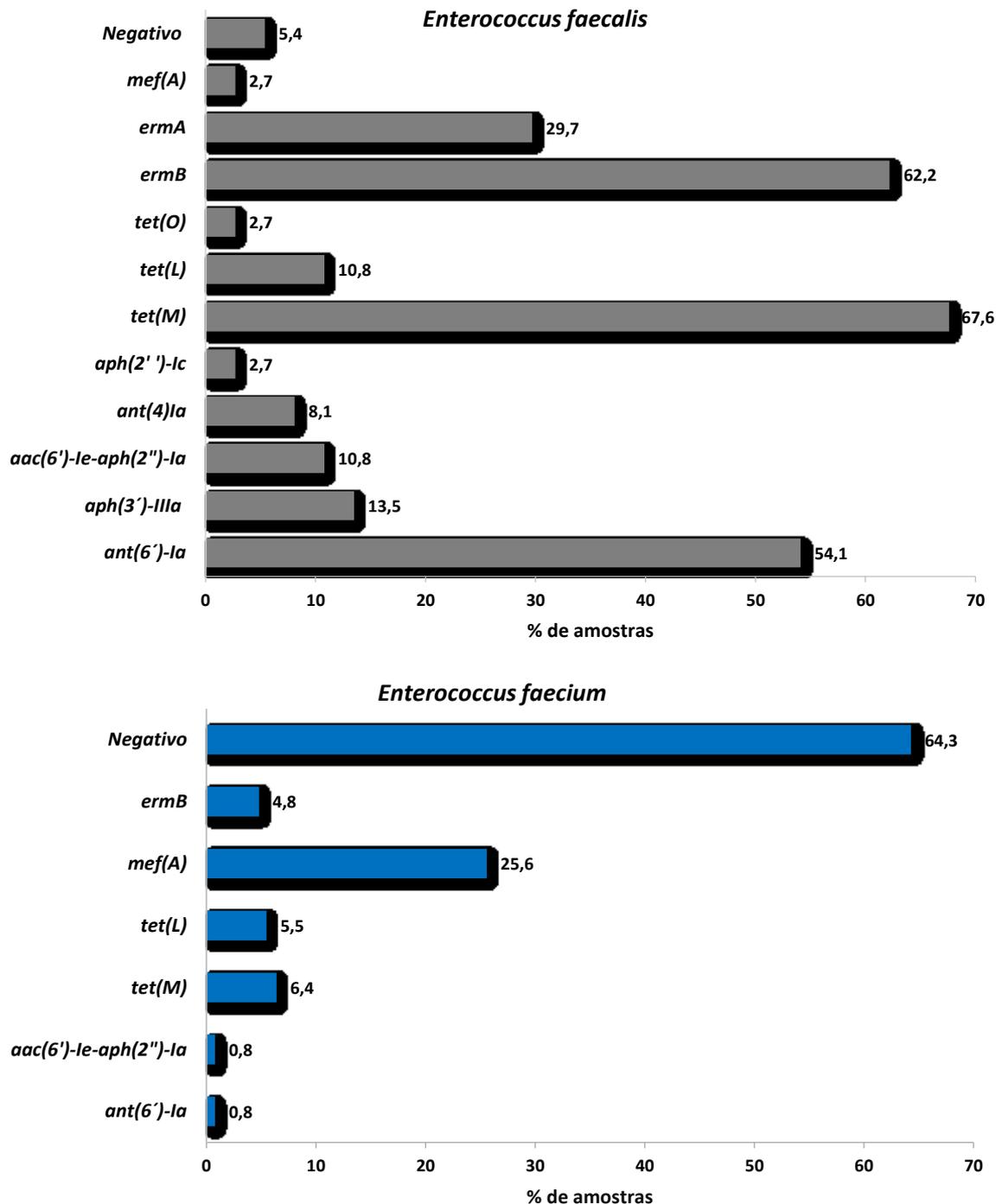
Todas as 37 amostras pertencentes a espécie *E. faecalis* e as 126 da espécie *E. faecium* foram avaliadas, por metodologia de PCR, quanto a presença de genes associados a resistência aos macrolídeos, tetraciclina e a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLAR).

Dentre as amostras pertencentes à espécie *E. faecalis*, 35 (94,6%) apresentaram um ou mais genes associados a resistência aos macrolídeos, tetraciclina ou a níveis elevados de aminoglicosídeos. Duas amostras não apresentaram produtos de amplificação para os genes avaliados pelos protocolos testados. Nesta espécie, foram detectados 11 (64,7%) dos 17 genes incluídos nos painéis testados por metodologia de PCR. O gene *tet(M)* foi o prevalente sendo identificado em 25 amostras (67,6%; 25/37), seguido de *erm(B)* (62,2%; 23/37) e *ant(6')-Ia* (54,1%; 20/37). Entretanto, não foram detectados os genes *aph(2'')-Ib* e *aph(2'')-Id* (resistência a níveis elevados de gentamicina e outros aminoglicosídeos); *ant3'-Ia*; *ant9'-Ia* e *ant9'-Ib* (resistência a níveis elevados de estreptomicina); e *tet(K)* (resistência a tetraciclina).

Por outro lado, na maioria das amostras pertencentes a espécie *E. faecium* (64,3%; 81/126) não foi detectada a presença dos genes incluídos nos painéis testados neste estudo por metodologia de PCR. O gene prevalente nessa espécie foi *mef(A)* (resistência aos macrolídeos), que foi identificado em 25,6% (36/126) das amostras. Além deste, foram também identificados os genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* e *ant6'-Ia* (0,8%; 1 amostra cada), responsáveis pela resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina, respectivamente); *tet(M)* e *tet(L)*, responsáveis pela resistência a tetraciclina (em 8/126 e 7/126 amostras, respectivamente); e *erm(B)*, relacionado a resistência aos macrolídeos (em 6/126 amostras).

O Gráfico 5 apresenta a frequência de cada um dos genes de resistência detectados por metodologia de PCR nas amostras de *E. faecalis* e *E. faecium* isoladas de águas recreacionais praianas e caracterizadas neste estudo.

Gráfico 5 - Frequência de genes associados a resistência aos antimicrobianos em amostras das espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro



Legenda: Os percentuais foram calculados em relação ao total de amostras por espécie (*E. faecalis*, N=37; *E. faecium*, N=126). Genes: *aph(2'')-Ic*, *ant(4')-Ia*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* e *aph(3')-IIIa* – resistência a níveis elevados de gentamicina e outros aminoglicosídeos; *ant6'-Ia* – resistência a níveis elevados de estreptomicina; *erm(A)*, *erm(B)* e *mef(A)* – resistência aos macrolídeos; *tet(M)*, *tet(O)* e *tet(L)* – resistência à tetraciclina.

Fonte: A autora, 2021.

Os perfis gerados pelo arranjo dos genes de resistência, detectados em cada uma das amostras pertencentes as espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, foram também avaliados.

Dentre as 35 amostras de *E. faecalis*, que apresentaram produtos de PCR, foram identificados 17 perfis distintos representados pela detecção de um a quatro genes de resistência concomitantemente. A maioria das amostras (26 amostras) fez parte de perfis que reuniram de três a quatro genes. A distribuição dos perfis genéticos em relação ao número de genes e de amostras foi a seguinte: três perfis que agruparam quatro genes cada (total de 14 amostras); sete perfis com três genes cada (total de 12 amostras); quatro perfis com dois genes (total de quatro amostras); e três perfis com um gene cada (total de seis amostras).

O genótipo de resistência prevalente em *E. faecalis* agrupou 32,4% (12/37) das amostras e correspondeu a detecção concomitante dos genes *ant(6')-Ia*, responsável pela resistência a níveis elevados de estreptomicina (HLSR), *erm(A)* e *erm(B)*, associados a resistência aos macrolídeos e *tet(M)*, relacionado a resistência a tetraciclina. Essas amostras apresentaram perfis fenotípicos compatíveis com a presença dos respectivos genes e foram isoladas das praias do Flamengo e Leblon.

Em 21 das 22 amostras (95,5%) que apresentaram fenótipo de resistência a níveis elevados de estreptomicina, pertencentes a espécie *E. faecalis*, foi detectada a presença do gene *ant(6')-Ia*. A única amostra que não apresentou esse gene e que exibiu fenótipo HLSR pertenceu ao perfil genético *ant(4)Ia; tet(O)* e também apresentou fenótipo de resistência para eritromicina e tetraciclina. Portanto, apresentou incongruências entre fenótipo-genótipo para HLSR e macrolídeos.

O gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* que codifica para uma EMA bifuncional e é determinante da resistência a níveis elevados de gentamicina (HLGR), foi detectado em 80,0% (4/5) das amostras que exibiram esse fenótipo, juntamente com determinantes de resistência aos macrolídeos e tetraciclina, sendo que duas foram isoladas da praia de Botafogo e duas da praia de Copacabana. A única amostra que apresentou fenótipo HLGR, e não foi detectado o gene que codifica para enzima bifuncional, exibiu perfil genético contendo os genes *aph(3')-IIIa* e *erm(B)* e foi isolada da praia do Leblon.

A Tabela 8 apresenta a distribuição dos perfis genéticos determinados por PCR nas amostras de *E. faecalis*.

Tabela 8 - Distribuição\*\* dos perfis genéticos de resistência aos antimicrobianos em 37 amostras de *Enterococcus faecalis*, isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro, em relação ao respectivo fenótipo e origem de isolamento

| Perfis de genes de resistência aos antimicrobianos | Nº de amostras | Fenótipos <sup>1</sup> |     |     |                 | Origem de isolamento |     |     |     |  |
|--|----------------|------------------------|-----|-----|-----------------|----------------------|-----|-----|-----|--|
|  |                | ERI                    | EST | GEN | TET             | BOT                  | COP | FLA | LEB |  |
| <i>ant(6')-Ia; erm(A); erm(B); tet(M)</i>          | 12             | ●                      | ●   | ●   | ●               |                      |     | ●   | ●   |  |
| <i>ant(6')-Ia; erm(B); tet(L); tet(M)</i>          | 1              | ●                      | ●   | ●   | ●               | ●                    |     | ●   |     |  |
| <i>ant(6')-Ia; aph(3')-IIIa; erm(B); tet(M)</i>    | 1              | ●                      | ●   | ●   | ●               | ●                    |     |     |     |  |
| <i>ant(6')-Ia; erm(B); tet(M)</i>                  | 3              | ●                      | ●   | ●   | ●               | ●                    |     |     |     |  |
| <i>ant(6')-Ia; erm(A); tet(M)</i>                  | 2              | ●                      | ●   | ●   | ●               |                      |     |     | ●   |  |
| <i>ant(6')-Ia; aph(3')-IIIa; erm(B)</i>            | 1              | ●                      | ●   | ●   | ●               |                      |     |     | ●   |  |
| <i>ant(6')-Ia; aph(3')-IIIa; tet(M)</i>            | 1              | ●                      | ●   | ●   | ●               |                      |     | ●   |     |  |
| <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia; erm(B); tet(M)</i>      | 2              | ●                      | ●   | ●   | ●● <sup>2</sup> |                      | ●   |     |     |  |
| <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia; erm(A); erm(B)</i>      | 1              | ●                      | ●   | ●   | ●               | ●                    |     |     |     |  |
| <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia; aph(2'')-Ic; tet(L)</i> | 1              | ●                      | ●   | ●   | ●               | ●                    |     |     |     |  |
| <i>aph(3')-IIIa; erm(B)</i>                        | 1              | ●                      | ●   | ●   | ●               |                      |     |     | ●   |  |
| <i>ant(4)Ia; tet(O)</i>                            | 1              | ●                      | ●   | ●   | ●               | ●                    |     |     |     |  |
| <i>erm(B); tet(L)</i>                              | 1              | ●                      | ●   | ●   | ●               | ●                    |     |     |     |  |
| <i>tet(L); tet(M)</i>                              | 1              | ●                      | ●   | ●   | ●               | ●                    |     |     |     |  |
| <i>tet(M)</i>                                      | 3              | ●                      | ●   | ●   | ●               | ●                    |     |     |     |  |
| <i>ant(4)Ia</i>                                    | 2              | ●● <sup>2</sup>        | ●   | ●   | ●               | ●                    |     |     |     |  |
| <i>mef(A)</i>                                      | 1              | ●                      | ●   | ●   | ●               | ●                    |     |     |     |  |
| Negativo para todos os genes testados              | 2              | ●                      | ●   | ●   | ●               | ●                    |     |     |     |  |

Legenda: Genes: *ant6'-Ia* – resistência a níveis elevados de estreptomicina; *aph(2'')-Ic*, *ant(4')-Ia*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* e *aph(3')-IIIa* – resistência a níveis elevados de gentamicina e outros aminoglicosídeos; *erm(A)*, *erm(B)* e *mef(A)* – resistência aos macrolídeos; *tet(M)*, *tet(O)* e *tet(L)* – resistência à tetraciclina. <sup>1</sup>Fenótipos determinados por testes de difusão em ágar (disco-difusão). Antimicrobianos: ERI, eritromicina; EST, níveis elevados de estreptomicina; GEN, níveis elevados de gentamicina; TET, tetraciclina. Categoria de susceptibilidade: vermelho (●), resistente; azul (●), intermediário; verde (●), sensível; (●●<sup>2</sup>), uma amostra em cada categoria; Origens de isolamento (praias): BOT, Botafogo; COP, Copacabana; FLA, Flamengo; LEB, Leblon. Símbolo preto (●), presença. Não foram identificadas amostras de *E. faecalis* na praia de Ipanema.

Fonte: A autora, 2021.

Nas 126 amostras de *E. faecium* foram identificados oito perfis genéticos, também representados pela detecção de um a quatro genes de resistência concomitantemente. A distribuição dos perfis genéticos em relação ao número de genes e de amostras foi a seguinte: um perfil que agrupou quatro genes cada (total de uma amostra; 0,8%); dois perfis com três genes cada (total de quatro amostras; 3,2%); três perfis com dois genes (total de quatro amostras; 3,2%); e dois perfis com um gene cada (total de 35 amostras; 27,8%).

Apesar da maioria das amostras de *E. faecium* (65,1%; 82/126) não ter apresentado produtos de amplificação para os genes incluídos nos painéis de PCR testados, um perfil genético composto apenas pelo gene *mef(A)* foi o prevalente, agrupando 34 amostras (27,0%; 34/126). Todas as amostras pertencentes ao perfil prevalente foram incluídas na categoria intermediária para eritromicina, nos testes fenotípicos de susceptibilidade aos antimicrobianos, por difusão em ágar (disco-difusão), e foram isoladas a partir da água de todas as praias estudadas.

Além do perfil prevalente, o gene *mef(A)* compôs um outro perfil genético, juntamente com genes de resistência a tetraciclina, *tet(M)* e *tet(L)*, em duas amostras de *E. faecium* isoladas da praia de Botafogo. Da mesma forma que o observado para o perfil prevalente, neste caso ambas as amostras também foram categorizadas como intermediárias para eritromicina. Cabe ressaltar que, a única amostra que apresentou o gene *mef(A)* pertencente a espécie *E. faecalis* apresentou, igualmente, fenótipo intermediário para eritromicina. Entretanto, 21 amostras (16,7%; 21/126) pertencentes a categoria intermediária para eritromicina, nos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, não apresentaram produtos de amplificação para os genes testados. Além disso, dentre as amostras que não apresentaram produtos de amplificação para todos os genes testados, 59 (46,8%) foram resistentes a eritromicina por disco-difusão.

Como já mencionado anteriormente, as 126 amostras de *E. faecium* não apresentaram fenótipo HLAR. Entretanto, foi identificado um perfil genético que apresentou o gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, que codifica para o fenótipo HLGR, concomitante a *tet(L)*, em uma amostra isolada da praia de Botafogo e susceptível a ambos antimicrobianos nos testes de disco-difusão. Além disso, um outro perfil apontou a presença do gene *ant(6')-Ia*, responsável pelo fenótipo HLSR, concomitante aos genes *erm(B)*, *tet(L)* e *tet(M)*, em uma única amostra isolada da praia de Botafogo e sensível a níveis elevados de estreptomicina, porém resistente a eritromicina e a tetraciclina, por disco-difusão. Ambos os casos apontam resultados incongruentes para fenótipo-genótipo de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos.

A Tabela 9 apresenta a distribuição dos perfis genéticos determinados por PCR nas amostras de *E. faecium*.

Tabela 9 - Distribuição de perfis genéticos de resistência em 126 amostras de *Enterococcus faecium*, isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro, em relação ao respectivo fenótipo e origem de isolamento

| Perfis genético de resistência aos antimicrobianos | Nº de amostras | Fenótipos <sup>1</sup> |     |     |                   | Origem de isolamento |     |     |     |     |
|--|----------------|------------------------|-----|-----|-------------------|----------------------|-----|-----|-----|-----|
|  |                | ERI                    | EST | GEN | TET               | BOT                  | COP | FLA | IPA | LEB |
| <i>ant(6')-Ia; erm(B); tet(L); tet(M)</i>          | 1              | ●                      | ●   | ●   | ●                 | ●                    |     |     |     |     |
| <i>erm(B); tet(L); tet(M)</i>                      | 2              | ●                      | ●   | ●   | ●● <sup>2</sup>   |                      |     | ●   |     |     |
| <i>mef(A); tet(M); tet(L)</i>                      | 2              | ●                      | ●   | ●   | ●                 | ●                    |     |     |     |     |
| <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia; tet(L)</i>              | 1              | ●                      | ●   | ●   | ●                 | ●                    |     |     |     |     |
| <i>erm(B); tet(M)</i>                              | 2              | ●● <sup>2</sup>        | ●   | ●   | ●                 | ●                    |     |     |     |     |
| <i>tet(L); tet(M)</i>                              | 1              | ●                      | ●   | ●   | ●                 |                      |     |     | ●   |     |
| <i>erm(B)</i>                                      | 1              | ●                      | ●   | ●   | ●                 |                      |     |     |     | ●   |
| <i>mef(A)</i>                                      | 34             | ●                      | ●   | ●   | ●(●) <sup>3</sup> | ●                    | ●   | ●   | ●   | ●   |
| Negativo para todos os genes testados              | 59             | ●                      | ●   | ●   | ●                 | ●                    | ●   | ●   | ●   | ●   |
|  | 21             | ●                      | ●   | ●   | ●                 | ●                    |     | ●   |     | ●   |
|  | 2              | ●                      | ●   | ●   | ●                 | ●                    |     |     |     |     |

Legenda: Genes: *ant6'-Ia* – resistência a níveis elevados de estreptomicina; e *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* – resistência a níveis elevados de gentamicina e outros aminoglicosídeos; *erm(B)* e *mef(A)* – resistência aos macrolídeos; *tet(M)* e *tet(L)* – resistência à tetraciclina. <sup>1</sup>Fenótipos determinados por testes de difusão em ágar (disco-difusão). Antimicrobianos: ERI, eritromicina; EST, níveis elevados de estreptomicina; GEN, níveis elevados de gentamicina; TET, tetraciclina. Categoria de susceptibilidade: vermelho ●, resistente; azul ●, intermediário; verde ●, sensível; ●●<sup>2</sup> ou ●●<sup>2</sup>, uma amostra em cada categoria; ●(●)<sup>3</sup> apenas duas amostras (2/34) pertenceram a categoria intermediária para tetraciclina e foram isoladas da praia de Botafogo; Símbolo preto (●), presença.

Fonte: A autora, 2021.

### 3.4 Características Genômicas Gerais das Amostras de *E. faecalis* e *E. faecium*

Foram selecionadas 22 amostras bacterianas isoladas de águas recreacionais praianas, que fizeram parte deste estudo, sendo sete pertencentes a espécie *E. faecalis* e 15 a *E. faecium*. Foram incluídas nesta etapa do estudo 20 amostras de origem humana (colonização e infecção em pacientes hospitalizados), sendo 10 de cada uma das espécies avaliadas, conforme especificado em Material e Métodos. A Tabela 10 apresenta as amostras cujo genoma foi sequenciado e analisado, de acordo com a espécie e origem de isolamento.

Tabela 10 - Origem e ano de isolamento das amostras de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* avaliadas neste estudo por metodologia de sequenciamento do genoma completo

| Espécies / Características   |                                   |                   |                             |                                   |                   |
|------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| <i>Enterococcus faecalis</i> |                                   |                   | <i>Enterococcus faecium</i> |                                   |                   |
| Amostra                      | Origem de Isolamento <sup>1</sup> | Ano de Isolamento | Amostra                     | Origem de Isolamento <sup>1</sup> | Ano de Isolamento |
| BT00.E.21                    | BOT                               | 2013              | BT00.E.05                   | BOT                               | 2013              |
| BT00.E.69                    | BOT                               | 2014              | BT00.E.25                   | BOT                               | 2013              |
| CP05.E.143                   | COP                               | 2014              | BT00.E.61                   | BOT                               | 2014              |
| CP05.E.146                   | COP                               | 2014              | BT00.E.75                   | BOT                               | 2014              |
| FL04.E.126                   | FLA                               | 2014              | BT00.E.105                  | BOT                               | 2014              |
| LB00.E.121                   | LEB                               | 2014              | BT00.E.110                  | BOT                               | 2014              |
| LB00.E.122                   | LEB                               | 2014              | BT00.E.143                  | BOT                               | 2014              |
| CL8593                       | COL                               | 2009              | FL04.E.07                   | FLA                               | 2013              |
| CL8682                       | COL                               | 2009              | FL04.E.143                  | FLA                               | 2014              |
| CL8714                       | COL                               | 2009              | IP06.E.01                   | IPA                               | 2013              |
| CL9172                       | INF                               | 2011              | IP06.E.124                  | IPA                               | 2014              |
| CL9314                       | INF                               | 2013              | IP06.E.149                  | IPA                               | 2014              |
| CL9727                       | COL                               | 2015              | LB00.E.61                   | LEB                               | 2014              |
| CL9733                       | INF                               | 2015              | LB00.E.142                  | LEB                               | 2014              |
| CL9745                       | COL                               | 2015              | LB00.E.150                  | LEB                               | 2014              |
| CL9752                       | COL                               | 2015              | CL9313                      | COL                               | 2013              |
| CL9761                       | INF                               | 2015              | CL9361                      | COL                               | 2013              |
|                              |                                   |                   | CL9373                      | INF                               | 2013              |
|                              |                                   |                   | CL9386                      | COL                               | 2013              |
|                              |                                   |                   | CL9388                      | COL                               | 2013              |
|                              |                                   |                   | CL9405                      | INF                               | 2013              |
|                              |                                   |                   | CL9406                      | INF                               | 2013              |
|                              |                                   |                   | CL9458                      | INF                               | 2013              |
|                              |                                   |                   | CL9540                      | INF                               | 2014              |
|                              |                                   |                   | CL9583                      | COL                               | 2014              |

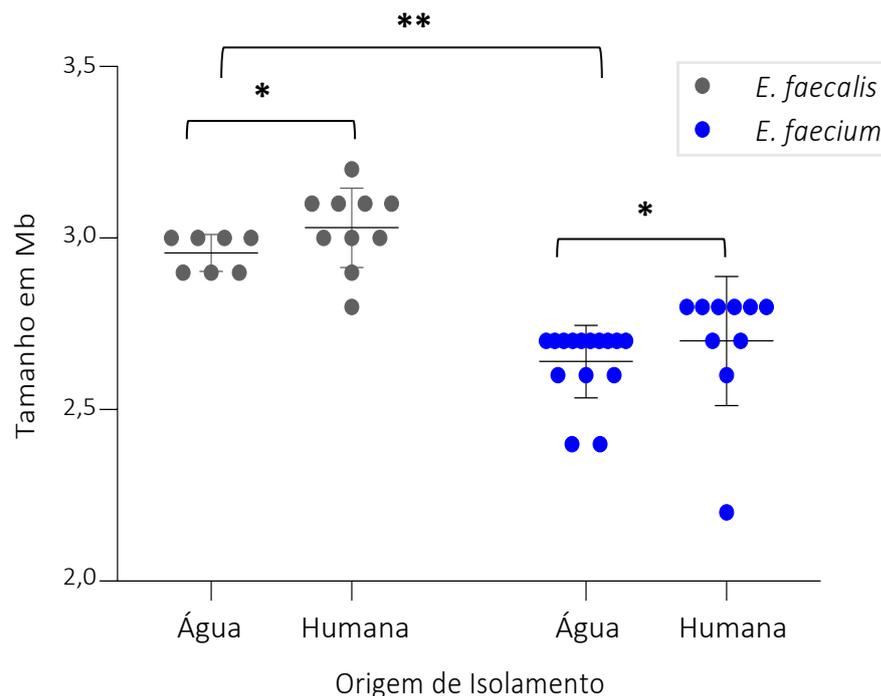
Praias: BOT, Botafogo; COP, Copacabana; FLA, Flamengo; LEB, Leblon; Amostras Humanas (todas com numeração iniciada com CL): COL, colonização; INF, infecção. As amostras humanas foram isoladas de pacientes hospitalizados em instituições de saúde localizadas no estado do Rio de Janeiro.

Fonte: A autora, 2021.

Os resultados obtidos nas análises do sequenciamento do genoma das amostras de *E. faecalis* e *E. faecium* revelaram diferenças tanto intra (em relação as diferentes origens de isolamento), quanto interespecíficas (comparando-se as duas espécies distintas), para os diferentes parâmetros avaliados.

Podem ser observados que o tamanho médio do genoma das amostras de *E. faecalis* (3,00 Mb  $\pm$  0,10) foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que o de *E. faecium* (2,66 Mb  $\pm$  0,14). Entretanto, apesar das médias relativas aos tamanhos dos genomas das amostras humanas terem sido um pouco maior, do que daquelas isoladas de águas praianas, os dados não apresentaram significância estatística ( $p > 0,08$ ) dentro de uma mesma espécie, quando considerada a origem de isolamento (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Distribuição dos tamanhos do genoma (em Mb) das amostras de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro e de pacientes hospitalizados



Legenda: Mb, megabases; Origens de isolamento: água = águas recreacionais de praias da cidade do Rio de Janeiro; humana = colonização ou infecção em pacientes hospitalizados; Barras = média e desvio padrão; dois asteriscos, houve significância estatística; um asterisco, não houve significância estatística.

Fonte: A autora, 2021.

Por outro lado, quanto ao % médio do conteúdo de G+C, pode ser observado que o maior valor obtido foi relacionado as amostras de *E. faecium* isoladas de águas recreacionais praianas, tanto intra, quanto interespecie. As amostras de *E. faecalis* apresentaram médias de % G+C muito semelhantes e, portanto, sem significância estatística ( $p > 0,05$ ), independente da origem de isolamento.

A anotação do genoma identificou médias maiores relativas ao número de CDS (*coding sequences*), sequências codificantes de proteínas, para a espécie *E. faecalis*, particularmente para as amostras de origem humana. Para a espécie *E. faecium*, a média relativa às amostras oriundas de águas praianas foi ligeiramente maior. Porém, neste último caso não houve significância estatística ( $p > 0,05$ ) para as diferenças observadas.

A determinação do número de genes que codificam para rRNA revelou que o maior valor médio obtido correspondeu às sequências provenientes de amostras de origem humana, pertencentes a *E. faecium*. Enquanto o menor valor foi observado para as amostras oriundas de águas praianas dessa mesma espécie. O número médio de rRNA foi um pouco menor nas amostras da espécie *E. faecalis*. Entretanto, cabe ressaltar que considerando-se apenas as amostras ambientais (águas praianas), o valor médio de rRNA para *E. faecalis* foi significativamente maior que *E. faecium* ( $p < 0,05$ ).

Da mesma forma, o número médio de tRNA também foi mais elevado para a espécie *E. faecium* em relação a *E. faecalis* ( $51,32 \pm 4,40$  e  $48,44 \pm 8,44$ , respectivamente). Além disso, em ambas as espécies, os maiores valores relacionados ao número médio de tRNA foram associados às amostras de origem humana. Porém, não foi identificada significância estatística nas comparações relativas a esta característica.

Para as demais métricas relativas ao sequenciamento dos genomas das amostras avaliadas, foi identificado que as coberturas de sequenciamento obtidas foram de  $88,44x \pm 27,26$  e  $77,48x \pm 28,42$ ; e os genomas foram montados em média com  $84,25 \pm 43,98$  *contigs* e  $123,96 \pm 63,12$  *contigs* nas amostras das espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, respectivamente.

A Tabela 11 demonstra comparativamente os dados obtidos com as análises relativas as métricas determinadas para os genomas de *E. faecium* e *E. faecalis*, por espécie e por origem de isolamento.

Tabela 11 - Dados comparativos das análises do sequenciamento do genoma total de amostras pertencentes as espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isoladas de águas recreacionais praianas e de pacientes hospitalizados

| Características             | Espécies / Origem de Isolamento /<br>Valores das médias e desvios padrão das métricas do sequenciamento do genoma |                      |                               |                             |                           |                               |
|-----------------------------|---|----------------------|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------------------|
|                             | <i>Enterococcus faecalis</i>  |                      |                               | <i>Enterococcus faecium</i> |                           |                               |
|                             | Águas praianas <sup>1</sup>   | Humanas <sup>2</sup> | Média geral                   | Águas praianas <sup>1</sup> | Humanas <sup>2</sup>      | Média geral                   |
| Tamanho do genoma (em Mb)   | 2,96 ± 0,05   | 3,03 ± 0,12          | 3,00 ± 0,10 <sup>4</sup>      | 2,64 ± 0,11                 | 2,70 ± 0,19               | 2,66 ± 0,14 <sup>4</sup>      |
| Conteúdo G+C (%)            | 37,27 ± 0,10  | 37,27 ± 0,11         | 37,27 ± 0,10                  | 38,07 ± 0,16 <sup>4</sup>   | 37,81 ± 0,06 <sup>4</sup> | 37,97 ± 0,18                  |
| Número de CDS <sup>3</sup>  | 2966,29 ± 92,94   | 3163,3 ± 249,65      | 3082,18 ± 219,74 <sup>4</sup> | 2701,40 ± 103,74            | 2638,60 ± 173,93          | 2676,28 ± 136,41 <sup>4</sup> |
| rRNA                        | 3,14 ± 0,38 <sup>4</sup>  | 3,00 ± 0,00          | 3,06 ± 0,25                   | 2,60 ± 0,51 <sup>4</sup>    | 4,00 ± 2,11               | 3,16 ± 1,52                   |
| tRNA                        | 45,71 ± 11,46   | 50,56 ± 4,85         | 48,44 ± 8,44                  | 50,67 ± 4,70                | 52,30 ± 3,95              | 51,32 ± 4,40                  |
| Cobertura de sequenciamento | 97,00x ± 22,10  | 81,78x ± 30,22       | 88,44x ± 27,26                | 90,73x ± 19,86              | 57,60x ± 28,43            | 77,48x ± 28,42                |
| Número de contigs           | 81,43 ± 59,64   | 86,44 ± 30,77        | 84,25 ± 43,98                 | 84,13 ± 27,78               | 183,70 ± 53,06            | 123,96 ± 63,12                |

Legenda: <sup>1</sup>Amostras oriundas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro; <sup>2</sup>Amostras oriundas de colonização ou de infecção em pacientes hospitalizados; <sup>3</sup>CDS, do inglês *coding sequences* ou regiões codificantes que determinam a sequência de aminoácidos de proteínas; <sup>4</sup> Comparações dentro de uma mesma característica que apresentaram significância estatística ( $p < 0,05$ ). Destaques em cinza apontam os maiores valores intraespecíficos e em relação a origem de isolamento; Destaques em rosa apontam os maiores valores entre as espécies, considerando-se a média geral obtida por espécie; Não foi considerado relevante destacar as maiores médias para “cobertura de sequenciamento” e “número de contigs”.

Fonte: A autora, 2021.

### 3.5 Estrutura Populacional e Diversidade Genética - MLST

A análise da diversidade genética, através da determinação dos perfis alélicos que compõem os diferentes STs, classificados por metodologia de MLST, foi realizada para todas as amostras de *E. faecalis* (N=17) e *E. faecium* (N=25) que tiveram o genoma sequenciado.

Foi possível identificar sete STs distintos entre as amostras de *E. faecalis*, são eles: ST6, ST21, ST23, ST40, ST62, ST525 e ST769. Destes, o ST21 foi o prevalente (29,4%; 5/17) e o único compartilhado por amostras oriundas de águas praianas e de pacientes hospitalizados. Os ST6 e ST525 (um DLV do ST6) reuniram três amostras cada (17,7%; 3/17, cada), e o ST769 agrupou duas amostras (11,8%; 2/17), sendo todas oriundas de pacientes hospitalizados. Já os ST23 (uma amostra), ST40 (uma amostra) e ST62 (duas amostras)

corresponderam exclusivamente a amostras oriundas de águas praianas. Amostras pertencentes ao ST21 e ao ST62 foram identificadas em praias distintas, como Copacabana e Leblon para o primeiro e Copacabana e Flamengo para o segundo (Tabela 12).

Foram identificados 14 STs distintos entre as 24 amostras de *E. faecium*, são eles: ST22, ST94, ST253, ST361, ST705, ST800, ST844, ST867, ST885, ST963, ST1226, ST1529, ST1630 e um ST NOVO. O ST de uma das amostras de *E. faecium* não pode ser caracterizado, considerando que as sequências referentes aos genes *atpA* e *purK* não apresentaram confiabilidade suficiente para identificação segura dos alelos correspondentes. Todos os STs que compuseram o arranjo populacional desta espécie se mostraram exclusivos para amostras de uma única origem de isolamento (ou águas praianas ou pacientes). Dentre os STs identificados nas amostras de *E. faecium*, o prevalente foi ST963 que agrupou 20,0% (5/25) das amostras, sendo todas de origem humana. Além deste, os ST253 (4,0%; 1/25), ST844 (12,0%; 3/25) e ST885 (4,0%; 1/25) foram os outros que também estiveram relacionados apenas às amostras humanas. Dentre os que se destacaram entre as amostras de águas recreacionais praianas estão os ST94 e ST361 que foram identificados em mais de um local de origem, sendo o primeiro das praias de Copacabana, Ipanema e Leblon, e o segundo de Ipanema e Leblon. Ainda em relação a *E. faecium*, cabe ressaltar o ST22, que foi identificado em uma amostra proveniente de águas praianas, e o ST844, em amostras humanas, anteriormente agrupadas como CC17. Já os ST94, ST361 e ST800, identificados em amostras isoladas de águas praianas, pertencem ao CC94. Interessante notar, também, que perfis alélicos semelhantes foram observados nos ST253 e ST867, que diferem apenas no gene *purK* e que foram relacionados a amostras de origem humana e de águas praianas, respectivamente (Tabela 12).

O ST NOVO, oriundo de águas praianas, ainda não foi nomeado e catalogado no banco de dados do PubMLST, podendo vir a ser reportado pela primeira vez neste estudo. Pode ser observado que o ST NOVO é semelhante ao ST94, apresentando como diferenças os alelos dos genes *gyd* e *purK* (Tabela 12).

Tabela 12 - Diversidade genética, das amostras de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, baseada nos perfis alélicos utilizados para a caracterização dos diferentes STs e determinados por sequenciamento do genoma completo

| Espécies           | ST <sup>1</sup> | Genes / Perfil alélico |            |            |             |            |            |             |            |             |            | Nº de amostras | Origem de isolamento <sup>2</sup> |                           | Ano de isolamento (Nº de amostras) |                    |
|--------------------|-----------------|------------------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|----------------|-----------------------------------|---------------------------|------------------------------------|--------------------|
|                    |                 | <i>aroE</i>            | <i>gki</i> | <i>xpt</i> | <i>yqiL</i> | <i>gdh</i> | <i>gyd</i> | <i>pstS</i> | <i>adk</i> | <i>atpA</i> | <i>ddl</i> |                | <i>purK</i>                       | Águas praianas            |                                    | Humanas            |
| <i>E. faecalis</i> | 6               | 6                      | 7          | 1          | 5           | 12         | 7          | 3           |            |             |            |                | 3                                 | -                         | COL                                | 2009 (1); 2015 (2) |
|                    | 21              | 1                      | 1          | 1          | 1           | 1          | 7          | 9           |            |             |            |                | 5                                 | COP (1); LEB (2)          | INF (2)                            | 2014               |
|                    | 23              | 3                      | 11         | 2          | 2           | 2          | 3          | 13          |            |             |            |                | 1                                 | BOT                       | -                                  | 2013               |
|                    | 40              | 9                      | 12         | 10         | 7           | 3          | 6          | 23          |            |             |            |                | 1                                 | BOT                       | -                                  | 2014               |
|                    | 62              | 3                      | 3          | 4          | 2           | 2          | 7          | 11          |            |             |            |                | 2                                 | COP; FLA                  | -                                  | 2014               |
|                    | 525             | 6                      | 32         | 26         | 5           | 12         | 7          | 3           |            |             |            |                | 3                                 | -                         | COL (1); INF (2)                   | 2015               |
|                    | 769             | 32                     | 32         | 26         | 31          | 15         | 7          | 3           |            |             |            |                | 2                                 | -                         | COL                                | 2009               |
| <i>E. faecium</i>  | 22              |                        |            |            |             | 1          | 1          | 1           | 1          | 2           | 3          | 2              | 1                                 | FLA                       | -                                  | 2014               |
|                    | 94              |                        |            |            |             | 8          | 6          | 10          | 6          | 13          | 8          | 8              | 4                                 | BOT (2); IPA (1); LEB (1) | -                                  | 2013 (1); 2014 (3) |
|                    | 253             |                        |            |            |             | 3          | 1          | 1           | 1          | 3           | 7          | 35             | 1                                 | -                         | INF                                | 2013               |
|                    | 361             |                        |            |            |             | 8          | 6          | 51          | 6          | 13          | 8          | 8              | 2                                 | IPA; LEB                  | -                                  | 2014               |
|                    | 705             |                        |            |            |             | 1          | 1          | 1           | 5          | 2           | 5          | 9              | 1                                 | BOT                       | -                                  | 2014               |
|                    | 800             |                        |            |            |             | 8          | 6          | 88          | 6          | 13          | 8          | 8              | 1                                 | LEB                       | -                                  | 2014               |
|                    | 844             |                        |            |            |             | 1          | 1          | 11          | 1          | 15          | 2          | 1              | 3                                 | -                         | COL (1); INF (2)                   | 2013               |
|                    | 867             |                        |            |            |             | 3          | 1          | 1           | 1          | 3           | 7          | 73             | 1                                 | BOT                       | -                                  | 2013               |
|                    | 885             |                        |            |            |             | 1          | 1          | 20          | 1          | 4           | 3          | 6              | 1                                 | -                         | INF                                | 2013               |
|                    | 963             |                        |            |            |             | 1          | 1          | 11          | 1          | 15          | 2          | 44             | 5                                 | -                         | COL (4); INF (1)                   | 2013 (3); 2014 (2) |
|                    | 1226            |                        |            |            |             | 12         | 2          | 1           | 8          | 5           | 4          | 6              | 1                                 | IPA                       | -                                  | 2014               |
|                    | 1529            |                        |            |            |             | 52         | 8          | 26          | 6          | 5           | 8          | 17             | 1                                 | FLA                       | -                                  | 2013               |
|                    | 1630            |                        |            |            |             | 1          | 1          | 92          | 1          | 4           | 5          | 3              | 1                                 | BOT                       | -                                  | 2014               |
|                    | NOVO            |                        |            |            |             | 8          | 11         | 10          | 6          | 13          | 8          | 96             | 1                                 | BOT                       | -                                  | 2014               |
| NC                 |                 |                        |            |            | 1           | 1          | 1          | 1           | *          | 3           | *          | 1              | BOT                               | -                         | 2013                               |                    |

<sup>1</sup>Sequence types – determinados pelo perfil alélico, conforme o sítio pubmlst.org; <sup>2</sup>Origens: Águas praianas – praias da cidade do Rio de Janeiro (BOT, Botafogo; COP, Copacabana; IPA, Ipanema; FLA, Flamengo; LEB, Leblon), Humanas – pacientes hospitalizados (COL, colonização; INF, infecção); NOVO, ST ainda não nomeado; NC, não conclusivo; \*, sequência não determinada; -, nenhuma amostra.

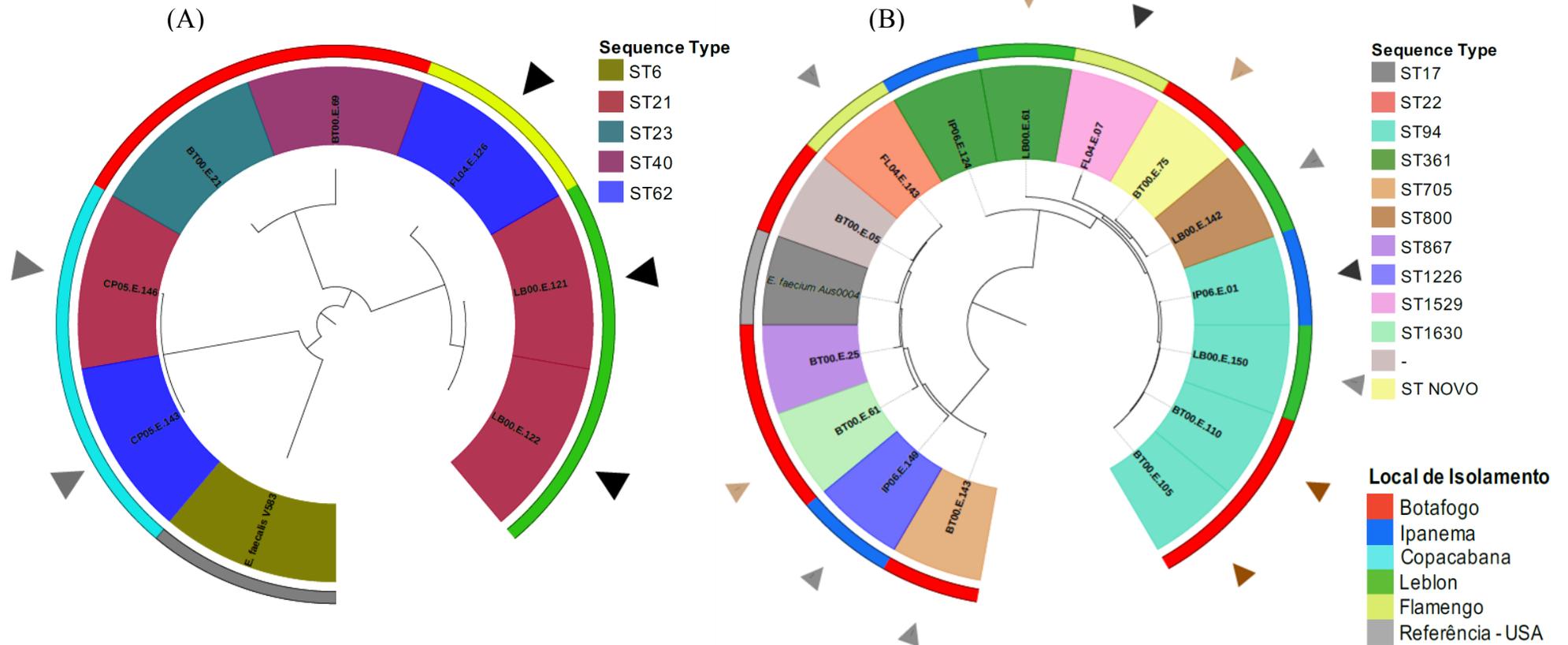
### 3.6 Análise Filogenética das Amostras de *E. faecalis* e *E. faecium* Isoladas de Águas Recreacionais Praianas

A análise das relações filogenéticas utilizando máxima verossimilhança a partir da matriz de SNPs permitiu identificar aspectos peculiares para as amostras isoladas de águas recreacionais praianas. Foi observado um comportamento relativamente diverso, comparando-se as espécies avaliadas.

Com relação as amostras pertencentes a espécie *E. faecalis*, foi observada a presença de dois clados distantes, conectados por braços longos da árvore filogenética e bem individualizados. Um desses clados foi constituído de amostras obtidas de praias distintas, sendo duas isoladas da praia de Botafogo, uma do Leblon e uma do Flamengo. As amostras das praias do Leblon e do Flamengo que foram coletadas no mesmo dia revelaram um maior relacionamento genético dentro do clado. O outro clado de *E. faecalis* reuniu exclusivamente duas amostras obtidas da praia de Copacabana, que também foram coletadas em um mesmo dia. Cabe ressaltar que amostras pertencentes a um mesmo ST (como as do ST21 e do ST62), porém isoladas de praias distintas, foram alocadas em clados diferentes (Figura 2A).

O arranjo obtido com as amostras de *E. faecium* também foi organizado em dois clados, entretanto, se mostrou mais heterogêneo, se considerado que amostras de uma mesma praia foram distribuídas em clados distintos. Além disso, amostras coletadas em um mesmo dia, nem sempre foram agrupadas em um mesmo clado. Porém, pode ser observado que o relacionamento genético entre as amostras de *E. faecium* pertencentes a um mesmo clado é bem mais próximo (braços mais curtos) do que o observado em *E. faecalis*. Foi interessante notar que todas as amostras de *E. faecium* pertencentes ao CC94, que agrupa os ST94, ST361 e ST800 estão distribuídas em um mesmo clado apresentando relacionamento genético estreito, mesmo tendo sido isoladas de praias diferentes. Como principal exemplo, destacam-se as amostras do ST94 que circularam em três praias distintas (Botafogo, Ipanema e Leblon) mas, se distribuíram como um grupo monofilético. Além disso, esse mesmo clado, que reuniu amostras do CC94, também incluiu a amostra do ST NOVO, que compartilha o mesmo alelo com o ST94 em cinco dos sete genes pertencentes ao esquema do MLST (Figura 2B).

Figura 2 - Árvores filogenéticas baseadas em SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) construídas através de máxima verossimilhança e enraizamento pelo ponto médio (*midpoint rooting*) de amostras de *Enterococcus faecalis* (A) e *Enterococcus faecium* (B) isoladas de águas recreacionais praias da cidade do Rio de Janeiro



Legenda: Local de isolamento – a legenda em cores indica as respectivas praias da cidade do Rio de Janeiro, onde foram isoladas as amostras bacterianas – círculo mais externo; as amostras foram coloridas de acordo com o ST (*Sequence Type*) ao qual pertencem; triângulos da mesma cor indicam as amostras que foram coletadas no mesmo dia.

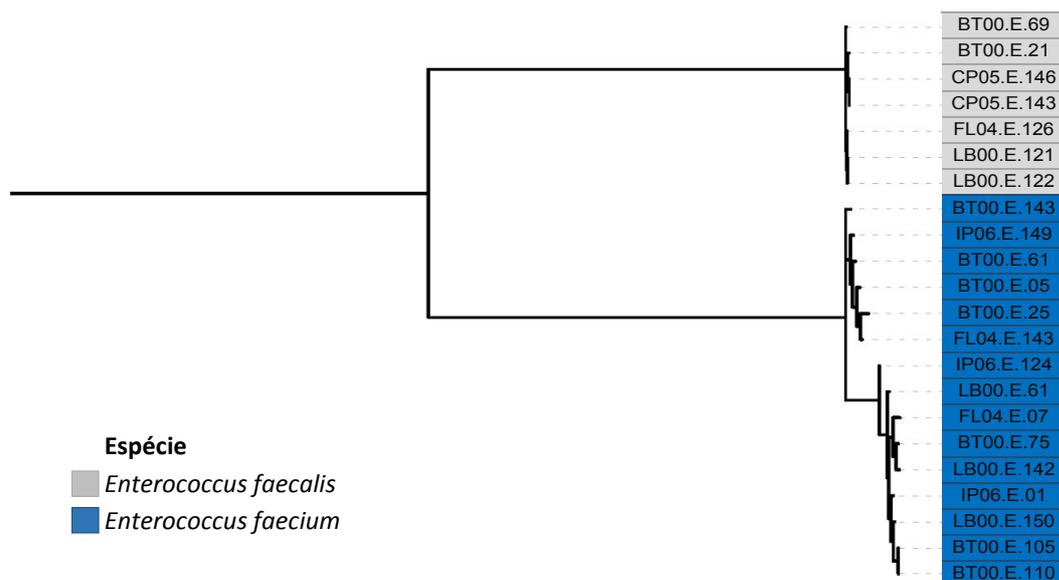
Fonte: A autora, 2021.

### 3.7 Análise do Conteúdo do Genoma Acessório de Amostras de *E. faecalis* e *E. faecium* Isoladas de Águas Recreacionais Praianas

Foram também realizadas análises visando apenas a presença/ausência de genes do genoma acessório, com o objetivo de avaliar a sua contribuição para o arranjo filogenético das amostras estudadas. Os resultados obtidos foram diferentes para as espécies avaliadas, mesmo considerando-se que as amostras isoladas circularam em um único tipo de ambiente (águas praianas).

Diferente dos arranjos filogenéticos apresentados anteriormente (Resultados item 3.6), foi observado que, neste caso, as amostras da espécie *E. faecalis* se apresentaram como um grupo monofilético, compondo arranjos com braços curtos e demonstrando uma grande homogeneidade (Figura 3). Assim, pode-se sugerir que o genoma acessório, aparentemente, não foi decisivo para o distanciamento filogenético das amostras dessa espécie, como observado nas análises anteriores. Por outro lado, a subdivisão em dois clados distintos das amostras de *E. faecium*, se manteve, sugerindo assim a participação do genoma acessório nas relações filogenéticas desta espécie.

Figura 3 - Árvore filogenética baseada na presença/ausência de genes no genoma acessório de amostras de *Enterococcus* isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro



Legenda: As amostras foram coloridas de acordo com a espécie a qual pertencem; Numeração das amostras de acordo com a origem de isolamento: praias de Botafogo – BT; Copacabana – CP; Ipanema – IP; Flamengo – FL; e Leblon – LB.

Fonte: A autora, 2021.

### 3.8 Análise Comparativa do Conteúdo do Genético de Amostras de *E. faecalis* e *E. faecium* Isoladas de Águas Recreacionais Praianas e de Pacientes Hospitalizados: Resistoma, Viruloma, Mobiloma (Fagos) e Mecanismo de Defesa CRISPR-Cas

O estudo da composição do conteúdo genético teve como principal objetivo comparar possíveis diferenças na presença/ausência de genes responsáveis pela expressão características importantes, tais como particularmente resistência a antimicrobianos e a virulência, além da presença de fagos e do sistema CRISPR-Cas, entre as espécies estudadas e os diferentes cenários de origem das amostras (águas praianas e pacientes hospitalizados), bem como a sua influência nas diferentes linhagens (STs) circulantes durante o período avaliado.

O resistoma dos 17 genomas de *E. faecalis*, sendo sete de águas praianas e 10 de pacientes hospitalizados, foi composto de 14 genes de resistência distintos. Destes, quatro foram associados a resistência à níveis elevados de aminoglicosídeos; dois a resistência aos macrolídeos; um a lincosamidas, pleuromutilina e estreptograminas; dois ao trimetoprim; um gene aos glicopeptídeos; um as tetraciclina; um ao cloranfenicol; um às estreptotricinas; e um correspondendo a uma bomba de efluxo relacionada a resistência a múltiplos antimicrobianos. A média geral de genes de resistência para a espécie foi de 7,47; sendo maior para as amostras oriundas de pacientes hospitalizados ( $\bar{x} = 8,10$ ) do que para as obtidas de águas praianas ( $\bar{x} = 6,57$ ). A diferença entre o número de genes das amostras *E. faecalis* de diferentes origens demonstrou significância estatística ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 7A).

O resistoma identificado nos 25 genomas analisados da espécie *E. faecium* (15 de águas praianas e 10 de pacientes hospitalizados) foi constituído de 19 genes de resistência distintos. Destes, quatro foram associados a resistência à níveis elevados de aminoglicosídeos; três a resistência à macrolídeos; três a lincosamidas, pleuromutilina, estreptograminas; dois ao trimetoprim, dois às tetraciclina; um a clindamicina; um ao cloranfenicol; um aos glicopeptídeos; um às estreptotricinas; e um à bomba de efluxo de múltiplos antimicrobianos. A média geral de genes de resistência para a espécie foi de 5,80. Também para esta espécie, o número de genes de resistência nas amostras de origem humana ( $\bar{x} = 9,30$ ) foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ), do que nas obtidas de águas praianas ( $\bar{x} = 3,47$ ) (Gráfico 7A).

A comparação do número de genes de resistência entre amostras de mesma origem de isolamento, porém de espécies distintas revelou que para amostras oriundas de águas praianas, o resistoma foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) nas amostras pertencentes a espécie *E. faecalis*. Entretanto, o inverso foi observado para as amostras de origem humana (pacientes

hospitalizados), onde o número de genes que compuseram o resistoma das amostras de *E. faecium* foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 7A).

Foram identificados um total de 23 genes de virulência compondo o viruloma das amostras pertencentes a espécie *E. faecalis*, sendo oito deles associados à adesão as células hospedeiras; quatro responsáveis pela produção de enzimas/toxinas secretadas; quatro relacionados com a produção de feromônios; três responsáveis pela formação de biofilmes; dois à evasão do sistema imune; e dois envolvidos na proteção aos diversos mecanismos de estresse. A média geral de genes de virulência para a espécie foi de 16,76. A diferença entre as médias obtidas com amostras de diferentes origens foi muito próxima e não apresentou significância estatística (águas praianas,  $\bar{x} = 17,00$ ; pacientes hospitalizados,  $\bar{x} = 16,60$ ;  $p > 0,05$ ) (Gráfico 7B).

O viruloma representativo da espécie *E. faecium* foi composto de 10 genes distintos, sendo cinco deles associados aos processos de adesão à célula hospedeira, dois responsáveis pela produção de enzimas/toxinas secretadas, um associado à formação de biofilmes e dois relacionados à proteção ao estresse. A média de genes de virulência foi de 4,84 por genoma, sendo significativamente menor ( $p < 0,05$ ) nas amostras oriundas de águas praianas ( $\bar{x} = 2,93$ ) do que nas provenientes de pacientes hospitalizados ( $\bar{x} = 7,70$ ).

Comparando-se o número de genes de virulência presentes nos genomas de amostras de mesma origem de isolamento, porém de espécies distintas, foi observado que o viruloma nas amostras de *E. faecalis* se mostrou significativamente maior ( $p < 0,05$ ) tanto naquelas provenientes de águas praianas, quanto de pacientes hospitalizados, quando comparado a *E. faecium* (Gráfico 7B).



A presença de profagos intactos também foi investigada nos genomas das amostras incluídas neste estudo, como representantes do mobiloma de *Enterococcus*.

Os resultados revelaram que a média de fagos por genoma das amostras de *E. faecalis* foi de 2,05, variando de 0 a cinco profagos por genoma. Além disso, as médias relativas ao número de profagos nas amostras dessa espécie, porém de origens distintas, ou seja, isoladas de águas praianas e de pacientes hospitalizados, foram similares ( $\bar{x} = 2,0$  e  $\bar{x} = 2,1$ , respectivamente). Foram identificados 10 profagos intactos diferentes nas amostras de *E. faecalis*. Duas amostras não apresentaram profagos (28,6%; 2/17), sendo uma de cada origem de isolamento; e uma amostra de origem humana (paciente hospitalizado) foi a que apresentou o maior número de profagos (N=5) diferentes associados ao genoma. Dois profagos diferentes foram prevalentes, sendo identificados em seis amostras cada (35,3%; 6/17 cada), são eles: PHAGE\_Enter\_phiFL1A (quatro amostras de águas praianas e duas de pacientes hospitalizados) e PHAGE\_Enter\_phiEf11 (duas de águas praianas e quatro de pacientes hospitalizados).

As amostras da espécie *E. faecium* apresentaram em média 1,0 profago / genoma, variando de 0 a dois. Foram identificados 12 profagos intactos diferentes e o prevalente foi o PHAGE\_Enter\_vB\_IME197, identificado em sete amostras (28,0%; 7/25), sendo cinco (33,3%; 5/15) de águas praianas e duas (20,0%; 2/10) de pacientes hospitalizados. Não foram identificadas sequências de profagos intactos em três amostras dessa espécie oriundas de águas praianas e em duas de pacientes hospitalizados.

Além disso, quatro profagos intactos foram identificados em ambas as espécies, são eles (nº de amostras para *E. faecalis* e *E. faecium*, respectivamente): PHAGE\_Bacill\_BCJA1c (duas e três); PHAGE\_Bacill\_phBC6A52 (três e uma); PHAGE\_Enter\_phiEf11 (seis e uma); PHAGE\_Enter\_vB\_IME197 (seis e sete).

Sete amostras de *E. faecalis*, sendo cinco oriundas de águas praianas e duas de pacientes hospitalizados, apresentaram CRISPR1, que é relacionado a proteína cas. Enquanto, 12 amostras, sendo sete de águas praianas e cinco humanas, apresentaram CRISPR2 que é do tipo órfão da proteína cas e não é funcional. Por outro lado, os resultados obtidos não indicaram a presença de regiões associadas ao sistema CRISPR nas amostras de *E. faecium*.

### 3.9 Análises Filogenética e do Conteúdo Genético de Amostras Isoladas de Águas Recreacionais Praianas em Comparação as de Pacientes Hospitalizados

Foram construídas árvores filogenéticas através da máxima verossimilhança, utilizando matriz de SNPs, para ambas as espécies e origens de isolamento, associando-se os dados obtidos do resistoma, viruloma, profagos e presença de regiões CRISPR.

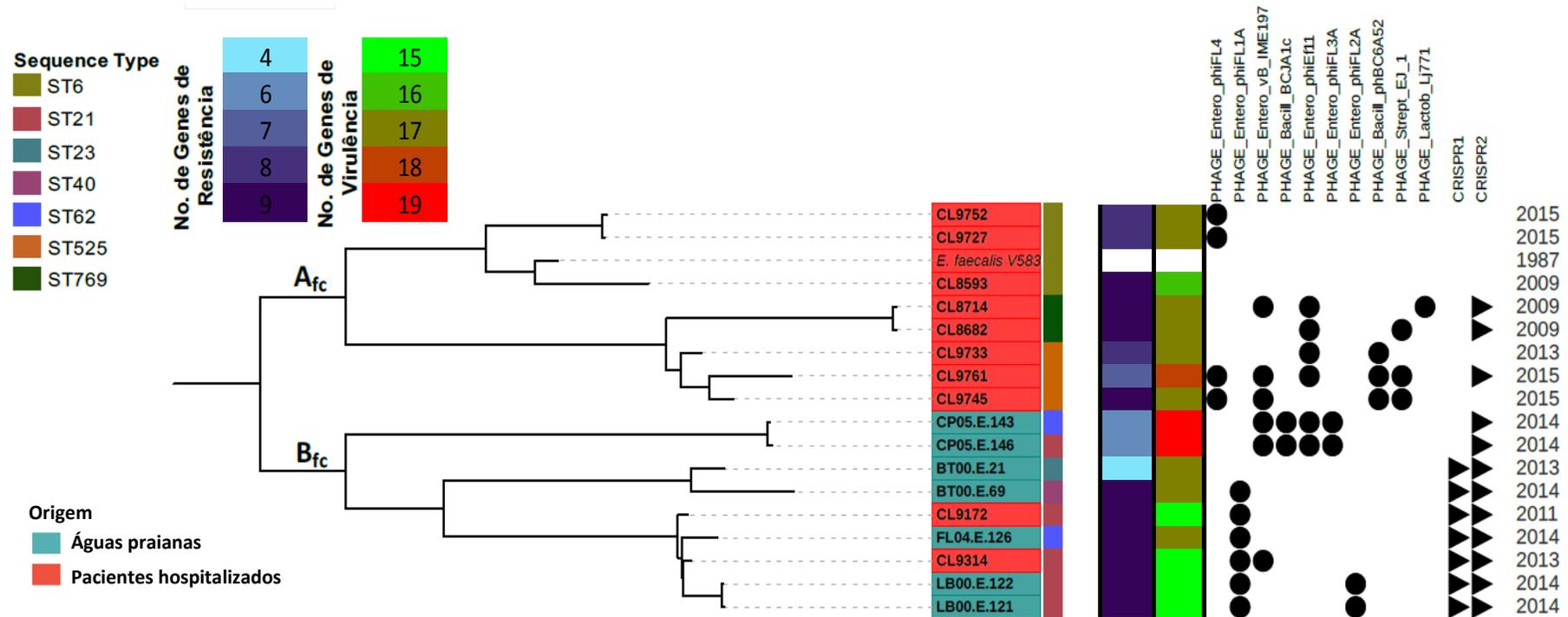
As amostras pertencentes a espécie *E. faecalis* foram distribuídas em dois cladogramas distintos, que foram nomeados de A<sub>fc</sub> (oito amostras) e B<sub>fc</sub> (nove amostras). O clado A<sub>fc</sub> reuniu somente amostras isoladas de pacientes hospitalizados. Enquanto o clado B<sub>fc</sub> agrupou todas as amostras provenientes de águas praianas e duas oriundas de pacientes hospitalizados (FIGURA 4). Considerando-se a distribuição dos STs nos dois cladogramas, foi observada uma maior diversidade no clado B<sub>fc</sub>. Entretanto, as amostras do ST21, de ambas as origens avaliadas, compartilharam desse mesmo clado (B<sub>fc</sub>).

No geral, as amostras de *E. faecalis*, pertencentes ao clado A<sub>fc</sub> (que reuniu exclusivamente amostras de origem humana) apresentaram um maior número de genes de resistência aos antimicrobianos. Entretanto, as duas amostras isoladas de pacientes hospitalizados que compartilharam com amostras de águas praianas o clado B<sub>fc</sub>, não seguiram esse padrão. Por outro lado, as amostras do clado B<sub>fc</sub> exibiram, no geral um maior número de genes de virulência.

Não foram observadas diferenças significativas entre a distribuição de profagos pelos dois cladogramas identificados em *E. faecalis*. Porém, cabe registrar que a amostra que apresentou o maior número de fagos foi de origem humana e pertencente ao clado A<sub>fc</sub>. Um dos profagos prevalentes (PHAGE\_EnterophiE11) foi identificado nas amostras de ambos os cladogramas, enquanto o outro (PHAGE\_EnterophiFL1A) foi exclusivo do clado B<sub>fc</sub>.

Todas as amostras do clado B<sub>fc</sub>, apresentaram CRISPR2 (não funcional), sendo menos frequente nas amostras do clado A<sub>fc</sub>. Já CRISPR1 foi exclusivo das amostras do clado B<sub>fc</sub>, excetuando-se duas amostras isoladas da praia de Copacabana, que foram as portadoras do maior número de genes de virulência. Todas as amostras que apresentaram CRISPR1 tinham a cas do subtipo IIa. As amostras que não apresentaram CRISPR1 exibiram um maior número de profagos. Os dados relativos a *E. faecalis* estão representados na Figura 4.

Figura 4 - Árvore de filogenia construída através de máxima verossimilhança, utilizando matriz de SNPs e enraizamento pelo ponto médio (*midpoint rooting*), demonstrando o resistoma, viruloma, profagos e sistema CRISPR associados ao genoma de amostras de *Enterococcus faecalis* isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro e de pacientes hospitalizados



Legenda: As amostras foram coloridas de acordo com a origem de isolamento; amostras cuja identificação é iniciada por CL, correspondem aquelas isoladas de pacientes hospitalizados; identificação das amostras isoladas de águas praianas indicam o local de origem onde BT, praia de Botafogo, CP, Copacabana, FL, Flamengo e LB, Leblon; a primeira coluna de cor indica os STs correspondentes; primeiro mapa de calor aponta o nº de genes de resistência em cada amostra e o segundo demonstra o nº de genes de virulência por amostra; ●, presença de profagos intactos; ►, presença de regiões CRISPR; na última coluna está demonstrado o ano de isolamento de cada amostra.

Fonte: A autora, 2021.

As amostras pertencentes a espécie *E. faecium* também se distribuíram em dois clados distintos, que foram nomeados neste estudo de A<sub>fm</sub> (nove amostras) e B<sub>fm</sub> (16 amostras) (FIGURA 5).

O clado A<sub>fm</sub> reuniu somente amostras isoladas de águas recreacionais praianas. Enquanto o clado B<sub>fm</sub> agrupou todas as 10 amostras provenientes de pacientes hospitalizados e seis oriundas de águas praianas. Cabe ressaltar que foi observada uma subdivisão no clado B<sub>fm</sub>, formando um grupo monofilético que reuniu apenas amostras humanas e pertencentes a STs reconhecidos como altamente adaptados ao ambiente hospitalar (ST800 e ST963, este último pertencente ao CC17), como demonstrado na Figura 5. Como já mencionado anteriormente, não foi observada a circulação de um mesmo ST entre os dois cenários avaliados e, portanto, isso também não ocorreu entre os clados identificados.

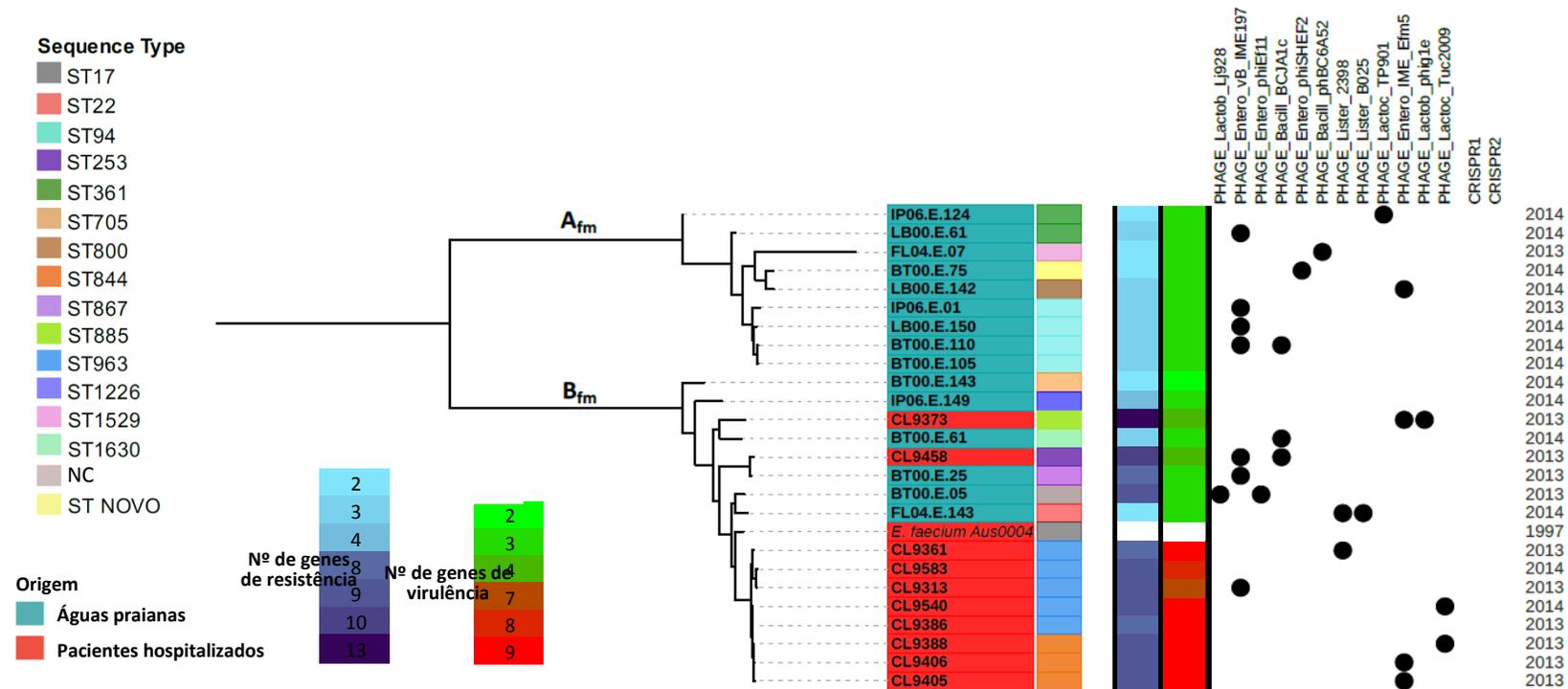
A maior concentração de genes de resistência e de virulência foi claramente associada às amostras isoladas de pacientes hospitalizados, como também já mencionado anteriormente. Entretanto, o arranjo filogenético dessas amostras demonstrou que aquelas oriundas de águas praianas que apresentaram um número maior de determinantes de resistência e virulência foram agrupadas no clado B<sub>fm</sub>, juntamente com as de origem humana.

A presença de fagos foi mais associada às amostras isoladas de águas praianas, independente do arranjo filogenético em clados. O profago prevalente entre amostras de *E. faecium* (PHAGE\_EnterovB\_IME197) foi identificado em amostras de ambos os clados.

Nenhuma região CRISPR foi identificada nos genomas das amostras de *E. faecium* avaliadas e de ambas as origens.

A associação dos dados relativos ao resistoma, viruloma e presença de fagos nas amostras de *E. faecium* está demonstrada na Figura 5.

Figura 5 - Árvore de filogenia construída através de máxima verossimilhança, utilizando matriz de SNPs e enraizamento pelo ponto médio (*midpoint rooting*), demonstrando o resistoma, viruloma, profagos e sistema CRISPR associados ao genoma de amostras de *Enterococcus faecium* isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro e de pacientes hospitalizados



Legenda: As amostras foram coloridas de acordo com a origem de isolamento; amostras cuja identificação é iniciada por CL, correspondem aquelas isoladas de pacientes hospitalizados; identificação das amostras isoladas de águas praianas indicam o local de origem, onde BT, praia de Botafogo, CP, Copacabana, FL, Flamengo, IP, Ipanema e LB, Leblon; a primeira coluna de cor indica os STs correspondentes; NC, ST não conclusivo; ST NOVO, ST ainda não nomeado no pubmlst.org; primeiro mapa de calor aponta o nº de genes de resistência em cada amostra e o segundo demonstra o nº de genes de virulência por amostra; ●, presença de profagos intactos; Nenhuma região CRISPR foi identificada; na última coluna está demonstrado o ano de isolamento de cada amostra.

Fonte: A autora, 2021.

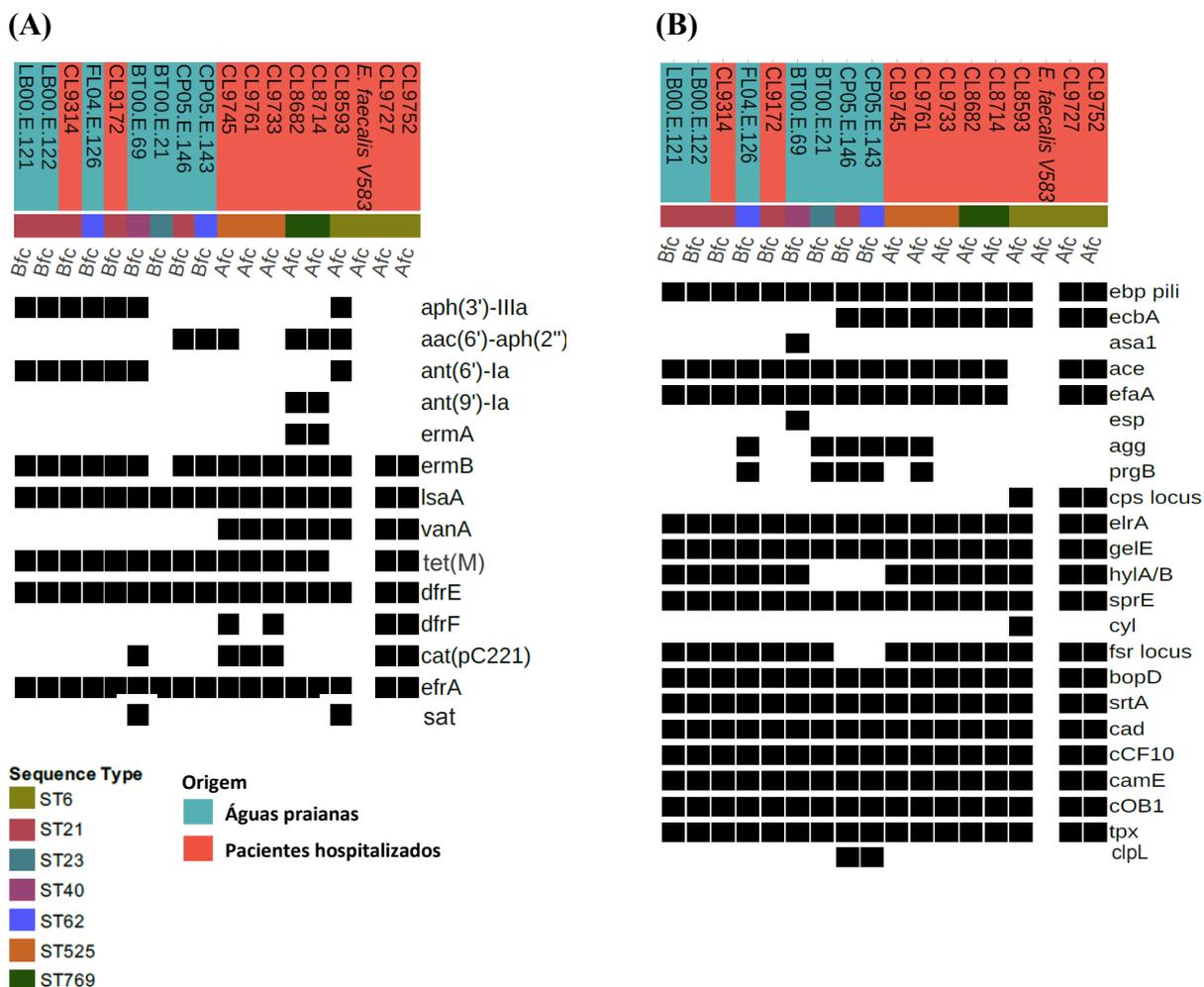
A Figura 6A apresenta a distribuição de todos os genes de resistência aos antimicrobianos identificados nos genomas das amostras de *E. faecalis*. Os genes presentes nessas amostras são responsáveis pela expressão da resistência aos seguintes antimicrobianos: (i) níveis elevados de aminoglicosídeos – *aph(3')-IIIa*, *aac(6')-aph(2'')*, *ant(6')-Ia* e *ant(9')-Ia*; (ii) cloranfenicol – *cat<sub>pC221</sub>*; (iii) estreptotricinas – *sat4*; (iv) glicopeptídeos – *vanA*; (v) lincosamidas, pleuromutilina e estreptograminas – *lsaA*; (vi) macrolídeos – *erm(A)* e *erm(B)*; (vii) tetraciclina – *tet(M)*; (viii) trimetoprim – *dfr(E)* e *dfr(F)*; (ix) bomba de efluxo – *efrA*.

Todas as amostras *E. faecalis* apresentaram os genes *dfrE*, *efrA* e *lsaA* e apenas uma amostra de origem humana (CL8593) e uma isolada de águas praianas (BT00.E.21) não apresentaram os genes *tet(M)* e *erm(B)*, respectivamente. Além disso, os genes *ant(9')-Ia*, *aac(6')-aph(2'')*, *cat(pC221)*, *dfr(F)*, *erm(A)* e *vanA* estiveram preferencialmente associados ao clado A<sub>fc</sub>. Enquanto, os genes *aph(3')-IIIa* e *ant(6')-Ia* estiveram associados majoritariamente as amostras do clado B<sub>fc</sub>.

Os genes de virulência que foram identificados nos genomas (viruloma) das amostras de *E. faecalis* e respectivos fenótipos foram: (i) adesão à célula hospedeira – *ace*, *agg*, *asa1*, *ebp* pili, *ecbA*, *efaA*, *esp* e *prgB*; (ii) enzimas/toxinas secretadas – locus *cyl*, *gelE*, *hlyA/B* e *sprE*; (iii) feromônios – *cad*, *camE*, *cCF10* e *cOB1*; (iv) formação de biofilme – *bopD*, locus *fsr* e *srtA*; (v) evasão do sistema imune – locus *cps* e *elrA*; (vi) proteção ao estresse – *clpL* e *tpx* (FIGURA 6B). Os loci *cps*, *cyl*, *fsr* e *hlyA/B* somente foram considerados como presentes, quando todos os genes envolvidos foram identificados.

A maioria das amostras de *E. faecalis* apresentou diversos determinantes de virulência, independente da origem de isolamento (águas praianas ou pacientes hospitalizados). Entretanto, o gene *ecbA*, que é uma MSCRAMM de ligação ao colágeno, foi mais relacionado às amostras de origem humana alocadas no clado A<sub>fc</sub>. Enquanto, *agg*, e *prgB* foram mais frequentes nas amostras pertencentes ao clado B<sub>fc</sub>. Além disso, as únicas amostras que apresentaram os genes *asa1*, *esp* e *clpL* pertenceram ao clado B<sub>fc</sub>, sendo todas oriundas de águas praianas.

Figura 6 - Distribuição dos genes de resistência (A) e de virulência (B), em amostras de *Enterococcus faecalis* isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro e de pacientes hospitalizados, em relação aos clados A<sub>fc</sub> e B<sub>fc</sub> identificados por construção da filogenia através de máxima verossimilhança



Legenda: As amostras foram coloridas de acordo com a origem de isolamento; amostras cuja identificação é iniciada por CL, correspondem aquelas isoladas de pacientes hospitalizados; identificação das amostras isoladas de águas praianas indicam o local de origem, onde BT, praia de Botafogo, CP, Copacabana, FL, Flamengo e LB, Leblon; primeiro mapa de calor aponta o n° de genes de resistência em cada amostra e o segundo demonstra o n° de genes de virulência por amostra; ■, presença do gene.

Fonte: A autora, 2021.

Foi encontrada uma maior diversidade de genes associados a resistência aos antimicrobianos nos genomas das amostras de *E. faecium*, se comparado a *E. faecalis*. A distribuição dos genes de resistência aos antimicrobianos de *E. faecium* está apresentada na

Figura 7A. Ambas as espécies apresentaram os mesmos genes de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos, estreptotricinas e glicopeptídeos.

Considerando o fenótipo de resistência  $MLS_B$ , pode-se observar um maior número de genes responsáveis por essa característica na espécie *E. faecium*, que incluiu *mrsC*, que é um determinante de resistência aos macrolídeos, e *lnuB* e *eatAv*, associados a resistência a lincosamidas e estreptograminas. Além disso, nas amostras de *E. faecium* foi identificada a presença do gene *tetL*, além de *tetM*, responsável pela resistência a tetraciclínas.

Em ambas as espécies foram detectados dois determinantes de resistência ao trimetoprim. Entretanto, em *E. faecium* foram anotados os genes *drfF* (também presente nas amostras de *E. faecalis*) e *drfG*. Diferenças entre as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* foram também observadas relação a classe do determinante de resistência ao cloranfenicol (*cat<sub>pC221</sub>* e *cat<sub>pC194</sub>*, respectivamente) e ao gene responsável pela expressão de bomba de efluxo (*efrA* e *efmA*, respectivamente).

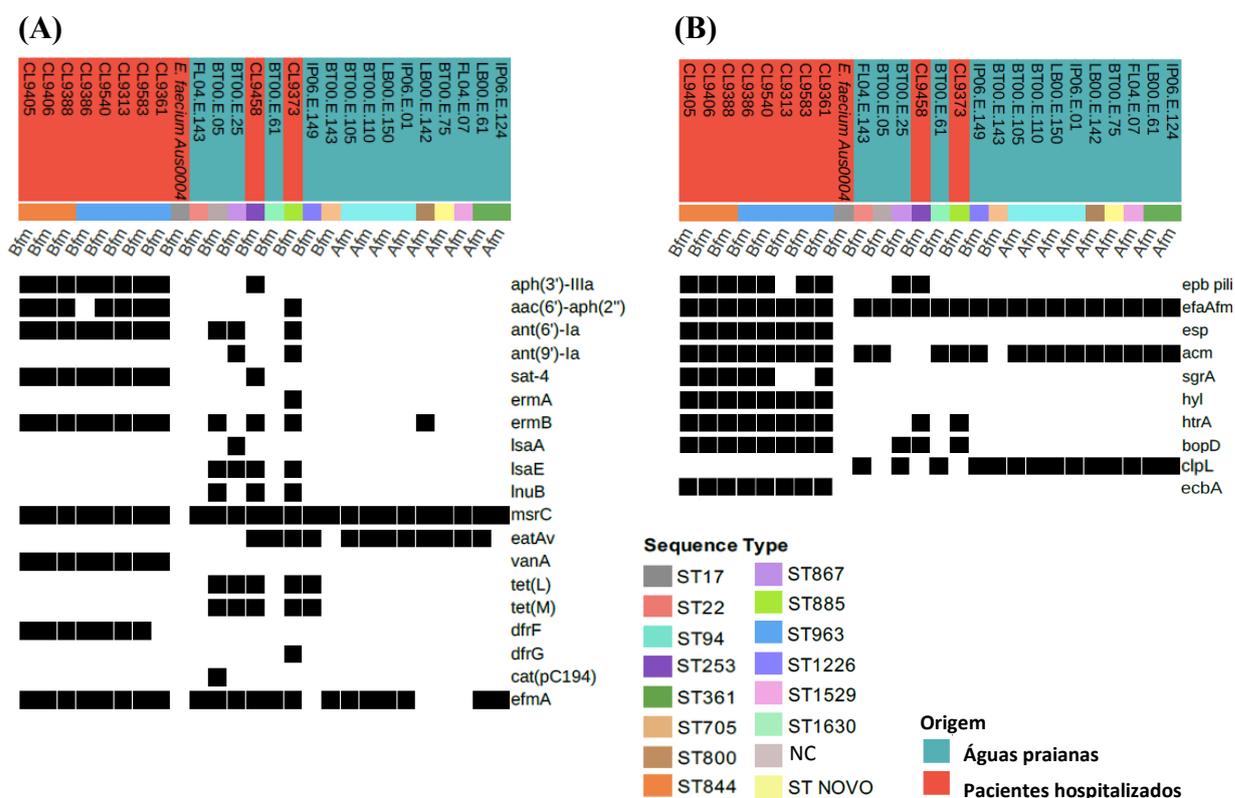
Nas amostras de *E. faecium*, os genes *mrsC* e *efmA* foram os prevalentes, independente da origem de isolamento das amostras. Entretanto, a maioria dos genes relacionados a resistência aos antimicrobianos foi identificada nas amostras pertencentes ao clado  $B_{fm}$  que reúne, principalmente, aquelas oriundas de pacientes hospitalizados. Assim, como já havia sido observado nos testes fenotípicos de susceptibilidade aos antimicrobianos, as amostras provenientes de águas praianas mostraram acumular um número aparentemente bem menor de determinantes de resistência. Porém, foi interessante notar que o gene *eatAv* foi quase que exclusivamente associado a essas amostras no clado  $A_{fm}$  (FIGURA 7A).

Além disso, a comparação entre espécies avaliadas demonstrou que, diferente do que observado em relação aos determinantes de resistência, as amostras de *E. faecium* apresentaram menor número de genes de virulência que *E. faecalis* (como já demonstrado anteriormente). Os genes de virulência comuns a ambas as espécies foram: *ebp pili*, *ecbA*, *esp*, *hyl*, *bopD*, *clpL* e *efA<sub>fm</sub>* (por ser uma variante de *efA* em *E. faecium*). Além desses, foi também identificado em amostras de *E. faecium* os seguintes genes e respectivos fenótipos: adesão a célula hospedeira – *acm* (codifica para uma MSCRAMM de ligação ao colágeno) e *sgrA* (codifica para uma adesina de ligação ao nidogênio); enzima – *htrA* (codifica para uma serina protease de superfície) (FIGURA 7B).

O gene *efA<sub>fm</sub>* foi identificado em todas as amostras, independente da origem de isolamento. Além deste, o *acm* esteve presente na quase totalidade das amostras avaliadas, excetuando-se apenas três amostras do clado  $B_{fc}$  (duas de águas praianas e uma de paciente

hospitalizado). A maioria dos demais genes foi associada ao braço monofilético do clado B<sub>fc</sub>, que reuniu exclusivamente amostras isoladas de pacientes hospitalizados. Por outro lado, o gene *clpL*, que é induzido por condições diversas de estresse, foi exclusivamente relacionado a todas as amostras oriundas de águas praianas (FIGURA 7B).

Figura 7 - Distribuição dos genes de resistência (A) e de virulência (B), em amostras de *Enterococcus faecium* isoladas de águas recreacionais praianas da cidade do Rio de Janeiro e de pacientes hospitalizados, em relação aos clados A<sub>fm</sub> e B<sub>fm</sub> identificados por construção da filogenia através de máxima verossimilhança



Legenda: As amostras foram coloridas de acordo com a origem de isolamento; amostras cuja identificação é iniciada por CL, correspondem aquelas isoladas de pacientes hospitalizados; identificação das amostras isoladas de águas praianas indicam o local de origem, onde BT, praia de Botafogo, CP, Copacabana, FL, Flamengo, IP, Ipanema e LB, Leblon; NC, ST não conclusivo; ST NOVO, ST ainda não nomeado pelo pubmlst.org; primeiro mapa de calor aponta o n° de genes de resistência em cada amostra e o segundo demonstra o n° de genes de virulência por amostra; ■, presença do gene.

Fonte: A autora, 2021.

### 3.10 Correlação dos Testes de Disco-Difusão, PCR e Sequenciamento do Genoma para a Detecção da Resistência a Eritromicina, Tetraciclina e Níveis Elevados de Aminoglicosídeos

Os testes de disco difusão, PCR e sequenciamento do genoma completo foram em maioria compatíveis na detecção de fenótipos e genótipos de resistência para eritromicina, níveis elevados de aminoglicosídeos e tetraciclina nas sete amostras de *E. faecalis* e 15 amostras de *E. faecium* isoladas de águas praianas recreacionais que tiveram o genoma sequenciado.

Com relação a espécie *E. faecium*, os resultados obtidos nas análises por sequenciamento apontaram possíveis respostas para incongruências evidenciadas entre os testes de disco difusão e de detecção de genes por PCR. Um total de sete amostras pertencentes a essa espécie foram caracterizadas na categoria resistente ou intermediária para eritromicina (N=7), por disco-difusão, mas não apresentaram produtos de amplificação para genes compatíveis com esse fenótipo, através do painel utilizado na metodologia de PCR [*erm(A)*, *erm(B)* e *mef(A)*]. Porém, nessas amostras foram encontradas sequências de genes também associados à expressão do fenótipo MLS<sub>B</sub>, *mrsC* e *efmA*, além do gene *eatAv* responsável pela expressão de bomba de efluxo e que não compuseram o painel de PCR utilizado, o que poderia explicar tal incongruência. Cabe ressaltar, também, que *mrsC* e *efmA* foram prevalentes nas amostras de *E. faecium* que tiveram o genoma sequenciado.

Por outro lado, duas amostras pertencentes a espécie *E. faecalis*, foram suscetíveis a níveis elevados de gentamicina e não foram detectados determinantes de resistência compatíveis por PCR. Entretanto, em ambas as amostras foi identificado a presença do gene responsável pela expressão de uma enzima bifuncional que determina a resistência a níveis elevados desse antimicrobiano registrando incongruência entre os métodos utilizados.

Dentre as amostras que tiveram o genoma sequenciado, não foram observadas variações entre os métodos com relação a resistência a tetraciclina.

#### 4. DISCUSSÃO

As regiões praianas representam áreas que comumente demandam, sob o ponto de vista ambiental, ações diversas de gestão e controle, frente ao impacto sobre o ambiente marinho decorrente da poluição gerada pela intensa urbanização e exploração turística em larga escala. Diferentes tipos e fontes de poluição e de contaminação impactam os ambientes de águas praianas, sendo a contaminação fecal extremamente relevante, diante do significativo risco à saúde humana e ao ambiente (MELO, 2015; PRATES et al., 2012).

Estudos eco-epidemiológicos têm revelado que os efeitos adversos mais frequentes à saúde humana, associados à exposição a águas de recreação contaminadas com fezes, são as doenças entéricas, seguidas das doenças respiratórias e de pele. Nesse contexto, diversos patógenos se destacam, incluindo vírus, bactérias e parasitas intestinais, o que dificulta o isolamento rotineiro de um agente específico, a partir de amostras ambientais. Assim, é sugerido que a contaminação seja determinada por indicadores microbiológicos da presença de contaminação fecal no meio ambiente, representados sobretudo pela espécie *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp (ISHII; SADOWSKY, 2008; JUNG et al., 2014; MELO, 2015; NICHOLS, 2006; NOGALES et al., 2011).

Os membros do gênero *Enterococcus* apresentam, em geral, uma grande capacidade de sobrevivência em diferentes situações e ambientes, tendo se firmado nas últimas décadas como uma das principais causas de infecções relacionadas à assistência à saúde (KRAWCZYK et al. 2021; MILLER et al., 2020; SAID et al., 2021).

Esses microrganismos exibem um extenso arsenal de mecanismos de resistência intrínseca, além de uma progressiva aquisição de determinantes de resistência aos antimicrobianos, metais e desinfetantes (GARCÍA-SOLACHE, RICE, 2019; GIANNELLA et al., 2020; LEE et al., 2020).

Tais características são associadas a escalada dos enterococos, particularmente as espécies *E. faecium* e *E. faecalis*, a partir do anônimo comensal para o protagonismo no cenário das infecções humanas (RAMOS et al., 2020). Estudos recentes apontam que a conquista de diferentes ambientes se dá por subpopulações especializadas selecionadas a partir de um processo evolutivo dinâmico, decorrente da grande plasticidade genômica desses microrganismos que, associada a fenômenos de recombinação homóloga e expansão populacional, é determinante para a aquisição de diversos mecanismos de resistência, bem como de virulência (FIORE et al., 2019; SOUZA, 2020).

Este estudo teve por objetivo central caracterizar fenótipos e genótipos de amostras de *Enterococcus* isoladas de águas de praias localizadas na zona sul da cidade do Rio de Janeiro, RJ (praias de Botafogo, Copacabana, Flamengo, Ipanema e Leblon), com o propósito de avaliar atributos de multirresistência aos antimicrobianos. Além disso, também teve o propósito de investigar a estrutura populacional e filogenia de amostras pertencentes às espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, obtidas de águas praianas e de pacientes hospitalizados a fim de comparar diferentes aspectos relativos à biologia desses microrganismos em ambos os cenários.

Para tal, foram avaliadas 264 amostras de *Enterococcus* isoladas e previamente caracterizadas em um estudo anterior de nosso grupo (MELO, 2015). As amostras bacterianas tiveram sua caracterização em gênero e espécies confirmada pelo emprego da metodologia de espectrometria de massas MALDI-TOF MS. Por esta metodologia, foram identificadas as espécies *E. faecium* (N=126), *E. hirae* (N=93), *E. faecalis* (N=37), *E. gallinarum* (N=3), *E. casseliflavus* (N=2), *E. asini* (N=1), *E. canintestini* (N=1) e *E. villorum* (N=1). Os resultados demonstraram um elevado percentual de concordância >98% entre as duas metodologias empregadas: convencional, realizada no estudo anterior e MALDI-TOF-MS, utilizada neste estudo. Entretanto, o conjunto de provas utilizado para a caracterização convencional não apontou a presença de espécies menos usuais, como *E. asini*, *E. canintestini* e *E. villorum*, que foram identificadas neste estudo pela metodologia de espectrometria de massas.

As amostras pertencentes às espécies *E. asini*, *E. canintestini* e *E. villorum* foram obtidas da água coletada da praia de Botafogo, local que apresentou a maior diversidade de espécies isoladas e que reconhecidamente apresenta grande influência do aporte de poluição ambiental. Entretanto, cabe ressaltar que análises moleculares adicionais, como sequenciamento de genes específicos (por exemplo, o gene que codifica para o rRNA16S), ainda são necessárias para confirmação definitiva da classificação dessas amostras.

As espécies *E. asini* (DE VAUX et al., 1998), *E. canintestini* (NASER et al., 2005) e *E. villorum* (VANCANNEYT et al., 2001) foram originalmente descritas a partir das fezes de asininos, cães e suínos, respectivamente. Entretanto, são raros os relatos na literatura sobre o papel dessas espécies nas infecções humanas, bem como seu isolamento a partir do ambiente. Destacamos, porém, que *E. canintestini* já foi apontado como agente responsável por um quadro de bacteremia, em um hospital de Taiwan (TAN et al., 2010).

Considerando as espécies *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. hirae*, nossos dados estão de acordo com a literatura especializada. As espécies *E. faecium* e *E. faecalis*, consideradas

prevalentes nas infecções enterocócicas em humanos, também são frequentemente isoladas de outros animais e do ambiente (CASTILLO-ROJAS et al., 2013; FERGUSON et al., 2016; GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019; SADOWY; LUCZKIEWICZ, 2014). A espécie *E. hirae* é comum no trato gastrointestinal de diversos animais homeotérmicos (FREITAS et al., 2018a; ZAHEER et al., 2020), apesar de também estar associada a quadros infecciosos nesses animais, particularmente endocardites e osteomielites em aves de produção (KOLBJØRNSSEN et al., 2011; VELKERS et al., 2011).

Os resultados dos testes de susceptibilidade, interpretados de acordo com CLSI (2020) e EUCAST (2020), demonstraram taxas elevadas de amostras sensíveis aos antimicrobianos testados, excetuando-se para eritromicina e rifampicina. Dados semelhantes foram apresentados em uma recente revisão de literatura (KORAJKIC et al., 2020), que compilou resultados de diversos estudos realizados em diferentes regiões do mundo, que registraram percentuais de resistência, em amostras de enterococos isoladas de habitats marinhos e estuarinos, que variaram de 2,4% para vancomicina a 24,2% para ampicilina. Entretanto, os autores chamaram atenção para a importância da presença de amostras de enterococos exibindo características de resistência clinicamente relevantes nesses habitats.

Neste estudo, merecem destaque, as elevadas taxas de não susceptibilidade para eritromicina, nitrofurantoína, rifampicina e tetraciclina que foram observadas nas amostras pertencentes as espécies prevalentes neste estudo, *E. faecium*, *E. hirae* e *E. faecalis*. Dados da literatura corroboram esses achados, destacando que tais características de não susceptibilidade são as mais frequentemente encontradas em amostras de enterococos de origem ambiental (DESMARAIS et al., 2020; DI CESARE et al., 2012; CASTILLO-ROJAS et al., 2013).

Dentre os fenótipos de resistência aos antimicrobianos em amostras de *Enterococcus*, que determinam maior importância clínica, estão a resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (fenótipo HLAR) e de glicopeptídeos (representado por amostras reconhecidas como VRE). Neste estudo, o fenótipo HLAR foi identificado em amostras das espécies *E. faecalis* e *E. asini*. Consideramos relevante a identificação desse fenótipo entre amostras ambientais que, mesmo já tendo sido relatado em amostras “não-humanas” pertencentes à espécie *E. faecalis* (DE BRIYNE et al., 2021; TROSCIANCZYK et al., 2021), constitui-se como um dado novo para a espécie *E. asini*. Apesar de ainda ser necessário estudos adicionais para confirmação tanto da característica, quanto da espécie (como mencionado anteriormente). Além disso, os dados obtidos registram, também, o

encontro dessa relevante característica de resistência em amostras isoladas de águas praianas recreacionais em nosso meio. Entretanto, não foram identificadas, por testes convencionais de determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos, amostras apresentando fenótipo de resistência a níveis elevados de vancomicina e/ou teicoplanina.

Da mesma forma, apesar do elevado percentual de amostras sensíveis, a maioria das amostras (50,4%; 133/264) em nosso estudo exibiu fenótipo de multirresistência, ou seja, não susceptíveis a três ou mais classes de antimicrobianos, quando considerado valores de não susceptibilidade como o somatório das categorias intermediária e resistente. Todas as amostras de *E. faecalis* (100%; 37/37), bem como as amostras pertencentes a *E. asini* e *E. villorum*, além das duas amostras de *E. casseliflavus* foram multirresistentes pelos critérios utilizados.

Dentre as amostras de enterococos multirresistentes identificadas neste estudo (N=133), foram caracterizados 70 perfis distintos, que agruparam amostras não susceptíveis a até oito classes de antimicrobianos concomitantemente. O perfil prevalente correspondeu a 18,1% das amostras bacterianas (24/133), sendo representativo de não susceptibilidade à eritromicina, nitrofurantoína e rifampicina.

Um total de sete perfis de multirresistência foram compartilhados entre amostras de espécies distintas. Além disso, perfis de multirresistência idênticos foram observados em amostras de mesma espécie, porém obtidas de praias distintas. Esses achados ressaltam e corroboram dados de literatura quanto ao amplo intercâmbio de elementos genéticos, que comumente carregam características de resistência aos antimicrobianos, observado também entre amostras provenientes do ambiente marinho. Muitos são os fatores já descritos que podem influenciar e contribuir para a ampla dispersão de elementos genéticos móveis (EGM). Vantagens adaptativas a ambientes diversos podem ser adquiridas pela aquisição de transposons e plasmídeos, que comumente também carregam genes de resistência aos antimicrobianos (SANTAGATI et al., 2012; SANTIAGO-RODRIGUEZ et al., 2013). Os bacteriófagos são, também, responsabilizados pela dispersão de determinantes de resistência entre amostras bacterianas e, apesar do seu potencial já ter sido relativamente subestimado, estudos anteriores já demonstraram a importância desses elementos, particularmente no ambiente marinho (COLOMER-LLUCH et al., 2011; DUERKOP et al., 2014; FARD et al., 2011).

A dinâmica da dispersão da resistência a antimicrobianos no ambiente, demonstra uma associação entre fatores genéticos, ecológicos e biológicos. Condições sanitárias precárias, dentre outras ações antropogênicas, podem favorecer mecanismos de

disseminação de determinantes de resistência aos antimicrobianos (BAQUERO et al., 2019; HATOSY; MARTINY et al., 2015). Em nosso estudo, perfis de multirresistência compartilhados foram coincidentemente mais frequentes em amostras isoladas da praia de Botafogo, permitindo sugerir que seu posicionamento geográfico, em área de remanso onde há menor troca de água com o mar aberto (dentro da Baía de Guanabara) e, portanto, menor renovação do ambiente, possa se destacar como um sítio que favoreça o amplo intercâmbio de genes entre os microrganismos ali presentes.

Através da metodologia de PCR foi avaliada a presença de genes de resistência a antimicrobianos de relevância clínica entre as amostras das espécies *E. faecalis* e *E. faecium* isoladas de águas praianas. Foram pesquisados os genótipos de resistência aos macrolídeos, tetraciclina e a níveis elevados de aminoglicosídeos em todas as amostras pertencentes as duas espécies, independente do resultado obtido nos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão, para fins comparativos entre as metodologias.

Neste estudo, diferente do que é comumente observado em amostras clínicas de origem humana, e corroborando com os dados obtidos nos testes fenotípicos, o número de determinantes genéticos de resistência aos antimicrobianos foi mais expressivo entre amostras de *E. faecalis* do que nas de *E. faecium*. Dentre as 37 amostras pertencentes à espécie *E. faecalis* isoladas de águas praianas, o gene *tet(M)* foi o mais frequente (67,6%) identificado por metodologia de PCR, seguido de *erm(B)* (62,2%) e *ant(6')-Ia* (54,1%). Por outro lado, na maioria das 126 amostras pertencentes a espécie *E. faecium* (64,3%) não foram identificados produtos de amplificação para os genes incluídos nos painéis testados por metodologia de PCR neste estudo. Para esta última, o gene prevalente foi *mef(A)*, que confere resistência aos macrolídeos, tendo sido identificado em 25,6% das amostras.

O gene *tet(M)*, um dos responsáveis pela expressão de resistência as tetraciclinas, é um dos determinantes de resistência mais frequentemente encontrados em amostras de enterococos de origem diversa, particularmente devido a sua associação ao Tn916 que é um elemento genético amplamente distribuído nas espécies do gênero (FRAZZON et al., 2010; REHMAN et al., 2018). Da mesma forma, o gene *erm(B)*, que confere resistência aos macrolídeos, e *ant(6')-Ia*, associado a resistência a níveis elevados de estreptomicina, também já foram relatados em frequência elevada (LÓPEZ et al., 2010; WANG et al., 2016; WERNER et al., 2003). O gene *mef(A)* codifica para uma proteína de efluxo responsável por conferir resistência a diversos antimicrobianos da classe dos macrolídeos, e que se mostrou prevalente entre as amostras de *E. faecium* isoladas de águas praianas, já

foi também anteriormente relatado em amostras de diferentes espécies do gênero e oriundas de fontes diversas, inclusive de água (FREITAS et al., 2018a; MOLALE; BEZUIDENHOUT, 2016; PORTILLO et al., 2000; SCHWAIGER et al., 2011).

A comparação dos resultados obtidos entre os fenótipos e genótipos de resistência aos antimicrobianos por metodologias de disco-difusão e de PCR, respectivamente, apontaram alguns resultados incongruentes. Este fato foi mais relevante na espécie *E. faecium*, destacando-se particularmente as seguintes situações: (i) o número elevado de amostras resistentes a eritromicina por disco-difusão, que não apresentaram produtos de amplificação na PCR (59 amostras, 46,8%); (ii) uma amostra que apresentou produtos de amplificação para os genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, que codifica para o fenótipo de resistência a níveis elevados de gentamicina concomitante a *tet(L)*, que codifica resistência a tetraciclina, e se mostrou sensível a ambos antimicrobianos no teste de disco-difusão; (iii) uma amostra que apresentou produtos de amplificação para o gene *ant(6')-Ia*, responsável pelo fenótipo de resistência a níveis elevados de estreptomicina, e foi sensível por disco-difusão.

Os achados mais comuns que explicam a ocorrência dessas incongruências incluem deleções ou inserções dentro do gene (impedindo a expressão de proteínas funcionais), nas regiões de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores (prejudicando a amplificação dos genes alvo), ou ainda mecanismos de resistência cruzada na ausência de determinantes genéticos específicos (JACKSON et al., 2004; LEELAPORN et al., 2008; SOUZA, 2020; WERNER et al., 2003). Situações semelhantes já foram também identificadas em outras espécies bacterianas, quando comparados resultados de testes fenotípicos com métodos de abordagem molecular (MCDERMOTT et al., 2016; TYSON et al., 2015).

A partir dos resultados obtidos nos testes fenotípicos e genotípicos já relatados, foram selecionadas 22 amostras bacterianas isoladas de águas recreacionais praianas, sendo sete pertencentes a espécie *E. faecalis* e 15 a *E. faecium*, que foram então avaliadas pela metodologia de sequenciamento do genoma completo (WGS) e análises de diferentes aspectos genômicos, com o emprego de variadas ferramentas de bioinformática. Para fins comparativos, foram incluídas 20 amostras de origem humana (colonização e infecção em pacientes hospitalizados), isoladas em período semelhante, sendo 10 de cada uma das espécies avaliadas.

Os dados obtidos com as análises iniciais a partir de WGS revelaram que comparativamente o tamanho do genoma das amostras estudadas apresentou diferenças tanto intra quanto interespecies. Tais diferenças destacaram que o tamanho médio do

genoma das amostras de *E. faecalis* foi significativamente maior do que o de *E. faecium*. Entretanto, as diferenças observadas entre amostras de mesma espécie, porém de origens distintas, não mostraram significância estatística. Resultados semelhantes foram observados anteriormente pela comparação do tamanho do genoma das espécies *Enterococcus sulfureus* e *Enterococcus pallens*, que também apontaram tamanhos significativamente distintos (ZHONG et al., 2017). Por outro lado, diferente do que foi encontrado neste estudo Zhong e colaboradores (2019), avaliando amostras de *E. faecium* de origens diversas, identificaram diferenças em relação ao tamanho do genoma e a quantidade de genes se comparadas a amostras humanas. Os autores reportaram que o tamanho médio do genoma das amostras isoladas de humanos foi de 3 Mb; enquanto nas obtidas de suínos, frangos e laticínios foi de 2,70 Mb, 2,77 Mb e 2,69 Mb, respectivamente.

Cabe ressaltar que, o % médio do conteúdo de G+C, uma outra métrica do genoma que foi avaliada, foi maior nas amostras da espécie *E. faecium* isoladas de águas praianas recreacionais. Apesar dos valores serem compatíveis com as espécies, conforme as descrições disponíveis na plataforma NCBI, sabe-se que o percentual de conteúdo G+C bacteriano tem impactos importantes nos eventos de transferência horizontal de genes. Considerando que, elementos genéticos adquiridos por transferência horizontal, como plasmídeos e fagos, apresentam um baixo %G+C e que não deve representar diferenças maiores de 10% em relação ao genoma do hospedeiro (NISHIDA, 2013), os resultados obtidos neste estudo sugerem que as amostras *E. faecium* de origem praiana, dentre o conjunto de amostras avaliadas, seriam as menos suscetíveis a aquisição desses elementos transferíveis. Apesar de ser apenas uma hipótese, somam-se a este fato os dados obtidos nas análises fenotípicas de susceptibilidade aos antimicrobianos e avaliação da presença de determinantes genéticos por PCR, que indicaram *E. faecium* provenientes de águas praianas como o grupo de amostras estudadas onde foram observados os maiores percentuais de susceptibilidade e o menor número de determinantes de resistência, se comparado a *E. faecalis* de mesma origem.

A diversidade clonal e estrutura populacional bacterianas têm sido avaliadas pelo emprego de métodos de tipificação molecular em estudos abrangentes, principalmente aqueles dedicados a avaliação da distribuição de linhagens multirresistentes. Métodos baseados no sequenciamento de genes ou, ainda, do genoma completo, em protocolos relacionados a metodologia de MLST, tem facilitado estudos epidemiológicos globais e análises da estrutura populacional de várias espécies bacterianas, incluindo análises

epidemiológicas que contemplam períodos longos, como em estudos retrospectivos (RAVEN et al., 2016; VAN HAL et al., 2016).

Neste estudo, as análises da estrutura populacional de amostras de *E. faecalis* e *E. faecium* obtidas de águas praianas e de pacientes hospitalizados foram realizadas através da identificação dos STs nas sequências do genoma completo. Os resultados revelaram sete STs dentre as 17 amostras *E. faecalis* (ST6, ST21, ST23, ST40, ST62, ST525 e ST769) e 14 STs para 24 amostras de *E. faecium* (ST22, ST94, ST253, ST361, ST705, ST800, ST844, ST867, ST885, ST963, ST1226, ST1529, ST1630 e um ST NOVO, ainda não nomeado). Uma amostra pertencente a espécie *E. faecium*, isolada da praia de Botafogo, não pode ser caracterizada por essa metodologia, considerando que ainda não foi possível obter as sequências de alguns dos genes pertencentes ao protocolo utilizado (*atpA* e *purK*) com confiabilidade suficiente para a identificação dos respectivos alelos.

Nas amostras de *E. faecalis*, o ST21 foi o prevalente (29,4%) e o único identificado tanto em amostras de águas praianas, quanto de pacientes hospitalizados. Por outro lado, os ST6, ST525 (um DLV do ST6) e ST769 agruparam exclusivamente amostras oriundas de pacientes hospitalizados; enquanto o ST23, ST40 e ST62 corresponderam apenas a amostras oriundas de águas praianas. Os ST6 e ST21 pertencem aos CC6 (anteriormente denominado CC2) e CC21, respectivamente, correspondendo a complexos clonais de destaque no arranjo populacional da espécie *E. faecalis*, quando analisado pelo algoritmo eBURST, que é capaz de inferir padrões de descendência evolutiva entre genótipos bacterianos determinados a partir do MLST (FREITAS et al., 2009; QUIÑONES et al., 2009). Cabe ressaltar que as amostras do ST21, além de serem identificadas em ambos os cenários avaliados, também foram isoladas de praias distintas, como Copacabana e Leblon. No banco de dados que reúne dados referentes a metodologia de MLST (<[pubmlst.org/organisms/enterococcus-faecalis](http://pubmlst.org/organisms/enterococcus-faecalis)>), estão catalogadas pouco mais de 70 amostras pertencentes ao ST21 (último acesso dezembro de 2021) provenientes de diferentes origens, tais como pacientes hospitalizados, alimentos, animais de criação e ambiente, obtidas de diversos países, corroborando sua ampla dispersão.

Nas amostras de *E. faecium* não foram observados STs compartilhados entre os dois cenários avaliados (águas praianas e pacientes hospitalizados). Assim, o ST963 foi o prevalente dentre as amostras de origem humana, enquanto os ST94 e ST361 se destacaram entre as amostras de águas recreacionais praianas, tendo sido identificados em mais de um local de origem. Entretanto, cabe ressaltar que os perfis alélicos dos ST253 e ST867 são muito semelhantes, diferindo apenas no gene *purK*, tendo sido isolados de

pacientes hospitalizados e de águas praianas, respectivamente. Além disso, o ST22, relacionado a uma amostra proveniente de águas praianas, e o ST844, presente em amostras de pacientes hospitalizados, fazem parte de arranjos que já foram considerados como subpopulações multirresistentes bem-sucedidas, como o CC17, considerado um complexo clonal de alto risco (HiRECC, *high-risk enterococcal clonal complex*), nas análises realizadas em estudos anteriores disponíveis na literatura que empregaram o algoritmo eBURST (FEIL et al., 2004; LEE et al., 2019). Confrontando os dados obtidos com os disponíveis na literatura, foi identificado que o ST963 já foi descrito em amostras de origem humana, incluindo a partir de pacientes portadores de doenças de base (ROSIN, 2017; SANTOS et al., 2017). Além disso, os ST94, ST361 e ST800 são associados CC94, outro complexo clonal importante no contexto hospitalar, segundo análises por eBURST (FREITAS et al., 2009). Neste estudo as amostras pertencentes ao ST94 foram identificadas a partir de águas praianas e amplamente distribuídas por três locais distintos (praias de Botafogo, Ipanema e Leblon). Estes dados estão de acordo com estudos anteriores que também observaram o destaque de amostras pertencentes ao ST94 oriundas de águas superficiais e águas residuais urbanas (ZAHEER et al., 2020).

Este estudo descreveu um novo ST associado as amostras pertencentes a espécie *E. faecium* isoladas de águas praianas. Como ainda não foi nomeado, recebeu neste estudo a designação de STNOVO, de maneira provisória. Segundo o banco de dados que reúne informações referentes a metodologia de MLST para esta espécie (<pubmlst.org/organisms/enterococcus-faecium>), o STNOVO é semelhante aos ST60 e ST1284, diferindo apenas em um único alelo em cada (genes *purK* e *ddl*, respectivamente). Estes STs estão descritos no banco de dados, compreendendo apenas uma amostra cada e oriundos de indivíduos não hospitalizados (amostras comensais).

Foi, também, objetivo deste estudo determinar a filogenia de amostras de *E. faecalis* e de *E. faecium* isoladas de águas praianas, através da construção de matrizes de SNPs. Estas análises permitiram identificar um comportamento relativamente diverso, comparando-se as espécies avaliadas. As amostras de *E. faecalis* foram agrupadas em dois clados distantes e bem individualizados. O arranjo obtido com as amostras de *E. faecium* também gerou dois clados. Porém, para esta espécie a distribuição se mostrou mais heterogênea, quando considerado que as amostras oriundas de uma mesma praia foram alocadas em clados distintos. Pode ser observado que o relacionamento genético entre as amostras de *E. faecium* pertencentes a um mesmo clado se mostrou mais próximo (braços mais curtos) do que o observado em *E. faecalis*. As amostras de *E. faecium* pertencentes ao

CC94 (ST94, ST361 e ST800) foram distribuídas em um mesmo clado apresentando relacionamento genético estreito, mesmo tendo sido isoladas de praias diferentes. Entretanto, alguns autores consideram que a metodologia de MLST isoladamente possui baixa resolução para inferir relações filogenéticas, considerando suas inerentes limitações quanto à reduzida proporção do genoma que é analisada e a natureza desses genes, que por serem de manutenção celular, evolutivamente apresentam uma tendência de não acumular muitas variações (DIDELOT; MAIDEN, 2010; VAN HAL et al., 2016).

Considerando os enterococos exibem diferentes mecanismos de resistência e de virulência adquiridos, a contribuição do genoma acessório (presença/ausência de genes) no arranjo filogenético das amostras de *E. faecalis* e de *E. faecium* isoladas de águas praianas, foi também investigado. Em contraponto aos resultados obtidos nas análises apresentadas anteriormente, foi observado que *E. faecalis* se mostrou como um grupo monofilético, homogêneo e composto de arranjos com braços curtos. Os dados obtidos foram fundamentais para sugerir que o genoma acessório, presente nas amostras desta espécie, não teve implicação decisiva no distanciamento filogenético observado nas análises anteriores. Entretanto, a subdivisão em dois clados, já determinada nas análises com as amostras de *E. faecium*, foi mantida, sugerindo que para esta espécie o genoma acessório pode ser importante no arranjo filogenético da espécie.

Considerando esses achados, pode-se inferir, como já reportado por outros autores, que um genoma conservado e com menor influência de genes acessórios, como observado nas amostras de *E. faecalis*, reflete mais fortemente uma evolução vertical da espécie, onde sua divergência está mais associada ao acúmulo lento de polimorfismos. Por outro lado, o maior acúmulo de um genoma acessório reflete uma evolução mais recente, ocorrida lateralmente e de forma mais rápida, por isso tende a ser menos impactado por polimorfismos (AZIZ; NIZET, 2010; CORDERO; POLZ, 2014), semelhante ao observado com o arranjo das amostras de *E. faecium*.

As pressões seletivas exercidas sobre os diferentes ambientes têm contribuído para o arranjo de genes que compõem o resistoma de amostras de diferentes espécies, tanto na sua diversidade, quanto abundância. A importância desse impacto decorre do fato de que a diversidade do resistoma influencia na ocorrência de mecanismos adaptativos, culminando na emergência linhagens mais adaptadas. Dessa forma, o conhecimento do resistoma de uma determinada espécie em um dado ambiente (particularmente o hospitalar) contribui para o combate à emergência de amostras multirresistentes (WRIGHT, 2010).

Sendo assim, este estudo também teve como objetivo avaliar a composição do conteúdo genético de *E. faecalis* e *E. faecium* comparando-se a presença/ausência de genes responsáveis pela resistência a antimicrobianos (resistoma) e virulência (viruloma), além da presença de fagos e do sistema CRISPR-Cas, nas amostras obtidas dos diferentes cenários avaliados (águas praianas e pacientes hospitalizados). Além disso, foi investigado também a influência do conteúdo genético nas diferentes linhagens (STs) circulantes durante o período avaliado.

Os dados relativos ao resistoma das amostras em estudo foram bastante enriquecedores. Dentre os 17 genomas de *E. faecalis* foram anotados 14 genes de resistência distintos, enquanto nos 25 genomas de *E. faecium* foram identificados 19 genes. As características associadas aos genes identificados em ambas as espécies incluem a expressão da resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos, cloranfenicol, estreptograminas, estreptotricinas, glicopeptídeos, lincosamidas, macrolídeos, pleuromutilina, tetraciclina, trimetoprim e um representante da expressão de uma bomba de efluxo relacionada a resistência a múltiplos antimicrobianos. Além destes, um gene responsável pela resistência a clindamicina foi identificado apenas nas amostras de *E. faecium*. A média geral de genes de resistência nos genomas de *E. faecalis* foi maior do que em *E. faecium* (7,47 e 5,80, respectivamente). Apesar da média de genes de resistência em ambas as espécies ter sido significativamente ( $p < 0,05$ ) maior nas amostras oriundas de pacientes hospitalizados do que naquelas obtidas de águas praianas, este dado foi ainda mais expressivo na espécie *E. faecium* (média de 9,30 e 3,47 para amostras obtidas de pacientes hospitalizados e águas praianas, respectivamente). Além disso, foi interessante notar que a comparação do número de genes de resistência entre amostras de mesma origem de isolamento, porém de espécies distintas demonstrou que o resistoma das amostras isoladas de águas praianas pertencentes a espécie *E. faecalis* foi significativamente maior do que para *E. faecium*. Entretanto, nas amostras obtidas de pacientes hospitalizados foi observado o inverso, onde a maior média de genes de resistência foi significativamente associada a espécie *E. faecium*, se comparado a *E. faecalis*.

Na atualidade, o crescente acesso às tecnologias de sequenciamento do genoma completo tem referendado os inúmeros benefícios no emprego desta metodologia para o rastreamento da resistência aos antimicrobianos, em relação a técnicas convencionais (HENDRIKSEN et al., 2019; SU et al., 2019). Particularmente, em amostras oriundas de fontes “não-humanas”, os parâmetros de interpretação da expressão da resistência

rotineiramente utilizados, esbarram em critérios determinados para amostras de origem clínica. Por outro lado, é reconhecido que a predição de um gene, por métodos moleculares, não significa exatamente sua posterior expressão. Diante disso, o comitê EUCAST divulgou, em 2017, recomendações de padrões a serem utilizados quando do uso da metodologia de WGS como preditora de resistência aos antimicrobianos. (ELLINGTON et al., 2017).

Quanto a composição do viruloma das amostras analisadas foram identificados 23 genes na espécie *E. faecalis* e 10 genes em *E. faecium*. As características associadas a expressão dos genes identificados foram: adesão as células hospedeiras; produção de enzimas/toxinas secretadas; formação de biofilmes; evasão do sistema imune; e proteção a mecanismos diversos de estresse. Nas amostras de *E. faecalis* foram identificados também genes responsáveis pela expressão de feromônios. A média de genes que compões o viruloma de *E. faecalis* foi consideravelmente maior do que *E. faecium* (16,76 e 4,84, respectivamente). Comparando-se as amostras de mesma origem de isolamento, em relação a média de genes de virulência, foi observado que o viruloma de *E. faecalis* se mostrou significativamente maior ( $p < 0,05$ ) tanto naquelas provenientes de águas praianas, quanto de pacientes hospitalizados, se comparado a *E. faecium*.

Assim, dados divulgados por outros autores corroboram nossos achados por considerarem que, particularmente, se tratando de amostras oriundas de infecções relacionadas ao ambiente hospitalar, a espécie *E. faecalis* comumente se sobressai pelo acúmulo de determinantes de virulência; enquanto a espécie *E. faecium* exibe um maior número de determinantes de resistência, sugerindo estratégias evolutivas distintas nestas espécies (FIORE et al., 2019; JAHANSEPAS et al., 2018).

Foi avaliada a presença de fagos, nas amostras incluídas neste estudo, como representantes do mobiloma. Nos genomas de *E. faecalis* e *E. faecium* foram identificados 10 e 12 profagos, respectivamente. Dentre eles, quatro profagos intactos foram identificados em ambas as espécies: são eles: PHAGE\_Bacill\_BCJA1c; PHAGE\_Bacill\_phBC6A52; PHAGE\_EnterophiEfl1; PHAGE\_EnterovB\_IME197. Entretanto, esses elementos não foram identificados em duas amostras de *E. faecalis* (uma de cada origem de isolamento) e em cinco de *E. faecium* (sendo três de águas praianas e duas de pacientes hospitalizadas). Dentre os elementos identificados, o profago phage\_Bacill\_phBC6A52 já foi reportado em amostras clínicas da espécie *Enterococcus cecorum* isoladas de aves (SHARMA et al., 2020). Também, já foi observado experimentalmente a participação de fagos na transferência de genes de resistência a

tetraciclina em enterococos (FARD et al., 2011). A presença desses elementos é considerada benéfica em ambientes altamente competitivos, sendo eficazes estratégias na invasão de uma variedade de nichos (BROWN et al., 2006).

Neste estudo, não foram identificadas regiões associadas ao sistema CRISPR nas amostras de *E. faecium*. Já para a espécie *E. faecalis*, cinco amostras de águas praianas e duas de pacientes hospitalizados, apresentaram CRISPR1, relacionado a proteína cas. Além disso, 12 amostras, sendo sete de águas praianas e cinco humanas, apresentaram CRISPR2 que é do tipo órfão da proteína cas e não é funcional. Estudos anteriores também não detectaram a presença do sistema CRISPR em amostras da espécie de *E. faecium*. Por outro lado, esses elementos já foram bem caracterizados em amostras de *E. faecalis*. As hipóteses que relacionam a ausência de CRISPR funcional em amostras de *E. faecium* sugerem que processos evolutivos decorrentes de pressão seletiva negativa, sobre esses mecanismos de defesa, justificariam a seleção de amostras que não carregam esse sistema protetivo (MIKALSEN et al., 2015; PALMER; GILMORE, 2010; RIOS et al., 2020; SOUZA, 2020).

Foram construídas árvores filogenéticas através da máxima verossimilhança, utilizando matriz de SNPs, para ambas as espécies e origens de isolamento, associando-se os dados obtidos do resistoma, viruloma, profagos e presença de regiões CRISPR. Os resultados obtidos revelaram a distribuição de ambas as espécies em dois clados, que neste estudo foram nomeados de A<sub>fc</sub> (oito amostras) e B<sub>fc</sub> (nove amostras), referente a espécie *E. faecalis*; e A<sub>fm</sub> (nove amostras) e B<sub>fm</sub> (16 amostras), para *E. faecium*. A reunião dos dados obtidos com as análises por WGS resultou em arranjos que revelaram aspectos interessantes relacionados a amostragem avaliada. Pode-se notar diferenças na distribuição dos genes de resistência e de virulência inter e intraespecíficos, apontando quais destes genes estão mais frequentemente associados a um ou outro cenário avaliado. Foi interessante notar que, todas as amostras do clado B<sub>fc</sub> (de *E. faecalis*) apresentaram CRISPR2 (não funcional), sendo menos frequente nas amostras do clado A<sub>fc</sub>. Já CRISPR1 foi exclusivo das amostras do clado B<sub>fc</sub>, excetuando-se duas amostras isoladas da praia de Copacabana, que foram as portadoras do maior número de genes de virulência. Todas as amostras que apresentaram CRISPR1 tinham a cas do subtipo IIa. As amostras que não apresentaram CRISPR1 exibiram um maior número de profagos. Por outro lado, entre as amostras de *E. faecium*, que se destacaram quanto a presença de genes de resistência, puderam ser identificados determinantes específicos que se distribuíram pelos diferentes clados. Além disso, foi também interessante notar a presença exclusiva do gene *clpL* nas

amostras obtidas de águas praianas. Este gene codifica para uma chaperona associada a proteção contra diferentes condições de estresse e já foi descrito em outras espécies bacterianas, principalmente *Streptococcus pneumoniae* onde também parece contribuir junto aos mecanismos de resistência à penicilina (KAJFASZ et al., 2009; PÖTINEN et al., 2017; TRAN et al., 2011).

A água pode ser um dos ecossistemas mais importantes no contexto da disseminação da resistência antimicrobiana, albergando uma comunidade microbiana dinâmica e singular, influenciada por diversos fatores inerentes ao ambiente, ou resultantes da ação antropogênica (RESENDE et al., 2020). Portanto, os dados obtidos neste estudo reforçam da importância do rastreamento de microrganismos multirresistentes e genes mobilizáveis em ambientes aquáticos, frequentemente gerenciados de maneira equivocada que os transformam em vias convergentes de diferentes tipos de poluição.

O rastreamento sistemático de amostras multirresistentes aos antimicrobianos nesse ambiente fundamenta a conscientização do valor heurístico do problema, determinando princípios e hipóteses cruciais ao norteamento das atividades humanas. É reconhecido que a disseminação de microrganismos resistentes se traduz como um risco biológico definido e mensurável, que impacta de maneira incisiva a saúde humana e do planeta. Neste contexto, o conceito altamente integrativo de Saúde Única (bem como de Saúde Global) se dedica em apresentar uma imagem holística, chamando a atenção que a emergência e disseminação da resistência aos antimicrobianos transcendem a consideração histórica da sua limitação a um "problema hospitalar". Ao mesmo tempo, a abordagem em Saúde Única traz subsídios à investigação e desenvolvimento das novas ferramentas bioquímicas, microbiológicas, ecológicas, bioinformáticas e computacionais, que em conjunto são fundamentais para entender e controlar o problema da multirresistência em escala global (BAQUERO et al., 2019; HERNANDO-AMADO et al., 2019).

Assim, considera-se fundamental que as discussões sobre o problema da multirresistência aos antimicrobianos se desenvolvam de maneira multidisciplinar, com a devida valorização da correta gestão do ambiente aquático, sobretudo as regiões praianas, no enfrentamento dos desafios nos cuidados à saúde e ao meio ambiente.

## CONCLUSÕES

- a) A partir de 264 amostras de *Enterococcus* isoladas de praias localizadas na zona sul da cidade do Rio de Janeiro, foram identificadas, por metodologia de MALDI-TOF MS, oito espécies distintas de *Enterococcus*, incluindo espécies menos usuais como *E. asini*, *E. canintestini* e *E. villorum*. Entretanto, considera-se que abordagens moleculares adicionais são necessárias para a confirmação dessas espécies menos frequentes;
- b) Os resultados dos testes de susceptibilidade demonstraram taxas elevadas de amostras sensíveis aos antimicrobianos isoladas de águas praianas. Entretanto, foram identificadas características de resistência de destacado interesse clínico, como fenótipo HLAR. Ressalta-se a relevância na identificação desse fenótipo entre amostras ambientais. Além disso, a maioria das amostras (50,4%; 133/264) foi multirresistente, ou seja, não susceptível a três ou mais classes de antimicrobianos;
- c) Os dados obtidos com as análises WGS revelaram que, comparativamente, o tamanho do genoma das amostras estudadas apresentou diferenças tanto intra quanto interespecies. Além disso, análises quanto ao conteúdo de % G+C sugeriram que as amostras *E. faecium* de origem praiana, dentre o conjunto de amostras avaliadas, seriam as menos suscetíveis a aquisição de elementos transferíveis;
- d) Análises da estrutura populacional de amostras de *E. faecalis* e *E. faecium* obtidas de águas praianas e de pacientes hospitalizados, realizadas através da identificação dos STs nas sequências do genoma completo, revelaram que, nas amostras de *E. faecalis*, o ST21 foi o prevalente e o único identificado tanto em amostras de águas praianas, quanto de pacientes hospitalizados. Por outro lado, nas amostras de *E. faecium* não foram observados STs compartilhados entre os dois cenários avaliados (águas praianas e pacientes hospitalizados). Entretanto, STs identificados nas amostras de *E. faecium* fazem parte do CC17, um complexo clonal identificado globalmente;
- e) Um novo ST associado a amostras pertencentes a espécie *E. faecium* isoladas de águas praianas foi identificado no presente estudo;

- f) Através de análises filogenéticas, foi observado que *E. faecalis* se mostrou como um grupo monofilético e homogêneo, cujo distanciamento filogenético não foi influenciado por seu genoma acessório. Entretanto, para *E. faecium*, o genoma acessório parece ter influenciado no arranjo filogenético da espécie. Esses achados sugerem que as amostras de *E. faecalis* de águas praianas passaram por processos evolutivos verticais, com um acúmulo mais lento de polimorfismos. Por outro lado, em *E. faecium*, estima-se que processos evolutivos laterais tenham sido mais recentes e menos impactado por polimorfismos;
- g) A comparação do número de genes de resistência entre amostras de mesma origem de isolamento, porém pertencentes a espécies distintas, demonstrou que o resistoma das amostras isoladas de águas praianas e pertencentes a espécie *E. faecalis* foi significativamente maior que o das amostras de *E. faecium*. Entretanto, nas amostras obtidas de pacientes hospitalizados foi observado o inverso. Além disso, comparando-se as amostras de mesma origem de isolamento, em relação a média de genes de virulência, foi observado que o viruloma de *E. faecalis* se mostrou significativamente maior, tanto naquelas provenientes de águas praianas quanto de pacientes hospitalizados, se comparado a *E. faecium*. Este fato corrobora os dados de literatura que concordam que a espécie *E. faecalis* comumente se sobressai pelo acúmulo de determinantes de virulência; enquanto a espécie *E. faecium* exibe um maior número de determinantes de resistência, sugerindo estratégias evolutivas distintas nestas espécies, particularmente em amostras de origem hospitalar. Entretanto, os dados obtidos com amostras de águas praianas parecem não seguir o mesmo padrão;
- h) Não foram identificadas regiões associadas ao sistema CRISPR nas amostras de *E. faecium*. Por outro lado, para a espécie *E. faecalis*, foram identificadas tanto regiões de CRISPR1, quanto CRISPR2;
- i) Os dados obtidos neste estudo reforçam a importância do rastreamento de microrganismos multirresistentes e genes mobilizáveis em ambientes aquáticos, frequentemente gerenciados de maneira equivocada que os transformam em vias convergentes de diferentes tipos de poluição, contribuindo para a manutenção e dispersão desses microrganismos e/ou determinantes genéticos de resistência.

## 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, p. 107, 2015.
- ALCOCK, B.P. et al. CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.*, v. 48, p. D517-D525, 2020.
- ALM, E.W. et al. Patterns and persistence of antibiotic resistance in faecal indicator bacteria from freshwater recreational beaches. *J. Appl. Microbiol.*, v. 117, p. 273-285, 2014.
- ANDREW, J.P. et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, v. 31, p. 3691-3693, 2015.
- APHA, American Public Health Association. Standard methods for the examination of the water and wastewater analysis. 19 ed. Washington, D. C., 1995.
- ARAGONÉS, L. et al. Evaluation of the quality of coastal bathing waters in Spain through fecal bacteria *Escherichia coli* and *Enterococcus*. *Sci. Total Environ.*, v. 566-567, p. 288-297, 2016.
- ARGUDÍN, M.A. et al. Bacteria from animals as a pool of antimicrobial resistance genes. *Antibiotics (Basel)*, v. 6, p. 12, 2017.
- ARIAS, C.A. et al. Clinical and microbiological aspects of linezolid resistance mediated by the *cfp* gene encoding a 23S rRNA methyltransferase. *J. Clin. Microbiol.*, v. 46, p. 892-896, 2008.
- ARNDT, D. et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.*, v. 44, p. W16-W21, 2016.
- AZIZ, R.K.; NIZET, V. Pathogen microevolution in high resolution. *Sci. Transl. Med.*, v. 2, n. 16, p. 16ps4, 2010.
- BAKER, S. et al. Genomic insights into the emergence and spread of antimicrobial-resistant bacterial pathogens. *Science*, v. 360, p. 733-738, 2018.
- BAQUERO, F. Gene Transmission in the One Health microbiosphere and the channels of antimicrobial resistance. *Front. Microbiol.*, v. 10, p. 2892, 2019.
- BEGANOVIC, M. et al. A review of combination antimicrobial therapy for *Enterococcus faecalis* bloodstream infections and infective endocarditis. *Clin. Infect. Dis.*, v. 67, p. 303-309, 2018.

- BENDER, J.K. et al. Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: towards a common nomenclature. *Drug Resist. Update*, v. 40, p. 25-39, 2018.
- BRODRICK, H.J. et al. Whole-genome sequencing reveals transmission of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a healthcare network. *Genom. Med.*, v. 8, p. 4, 2016.
- BYAPPANAHALLI, M.N. et al. Enterococci in the environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 76, p. 685-706, 2012.
- BROWN, S.P. et al. Ecology of microbial invasions: Amplification allows virus carriers to invade more rapidly when rare. *Curr. Biol.*, v. 16, p. 2048-2052, 2006.
- CANTÓN, R. et al. A potential role for daptomycin in enterococcal infections: what is the evidence? *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 65, p. 1126-1136, 2010.
- CASTILLO-ROJAS, G. et al. Comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from water and clinical samples: antimicrobial susceptibility and genetic relationships. *PLoS ONE*, v. 8, p. e59491, 2013.
- CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 30<sup>th</sup> Ed. CLSI supplement M100, West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2D:64-67. 2020.
- COLLIGNON, P.J.; and McEWEN, S.A. One Health - its importance in helping to better control antimicrobial resistance. *Trop. Med. Infect. Dis.*, v. 4, p. 22, 2019.
- COLOMER-LLUCH, M. et al. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One*, v. 6, p. e17549, 2011.
- CONAMA - CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE (Brasil). Resolução n° 274, de 29 de novembro de 2000. Dispõe sobre a qualidade das águas de balneabilidade e alerta o disposto na Resolução 020, de 18 de junho de 1986. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília.
- CORDERO, O.X.; POLZ, M.F. Explaining microbial genomic diversity in light of evolutionary ecology. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 12, p. 263-273, 2014.
- CORREIA, S. et al. Mechanisms of quinolone action and resistance, where do we stand? *J. Med. Microbiol.*, v. 66, p. 551-559, 2017.
- COUVIN, D. et al. CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Res.*, v. 46, p. W246-W251, 2018.
- D’COSTA, V.M. et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, v. 477, p. 457-461, 2011.

- 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, p. 7427-7443, 2013.
- DANNER, M.C. et al. Antibiotic pollution in surface fresh waters: occurrence and effects. *Sci. Total Environ.*, v. 664, p. 793-804, 2019.
- DAVIS, J.J. et al. The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities, *Nucleic Acids Res.*, v. 48, p. D606-D612, 2020.
- DE BRIYNE, N. et al. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Vet. Rec*, v. 175, p. 325, 2014.
- DE VAUX, A. et al. *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 2, p. 383-387, 1998.
- DESMARAIS, T.R. et al. Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 68, p. 1165-1172, 2002.
- DI CESARE, A. et al. Antibiotic-resistant enterococci in seawater and sediments from a coastal fish farm. *Microb. Drug Resist.*, v. 18, p. 502-509, 2012.
- DIDELOT, X.; MAIDEN, M.C.J. Impact of recombination on bacterial evolution. *Trends Microbiol.*, v. 18, n. 7, p. 315-322, 2010.
- DUERKOP, B. et al. Enterococcal bacteriophages and genome defense. In: GILMORE, M.S. et al. (Ed). *Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.
- EDELSBERG, J. et al. Prevalence of antibiotic resistance in US hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 78, p. 255-262, 2014.
- EDIRSANA, M. et al. Multiple antibiotic-resistance of *Enterococcus* isolated from coastal water near an outfall in Brazil. *Afr. J. Microbiol. Res.*, v. 8, p. 1825-1831, 2014.
- ELGHAIEB, H. et al. From farm to fork: identical clones and Tn6674-like elements in linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* from food-producing animals and retail meat. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 75, p. 30-35, 2020.
- ELLINGTON, M.J. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST subcommittee. *Clin. Microbiol. Infect.*, v 23, p. 2-22, 2017.
- EPA, Environmental Protection Agency (United States). Improved enumeration methods for the recreational water quality indicators: Enterococci and *Escherichia coli*. Washington, DC; 2000.

- EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breaking point tables for interpretation of MICs and zone diameters. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease. v 10.0, 2020.
- FARD, R.M. et al. Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 52, n. 6, p. 559-564, 2011.
- FARIA, A.R. Diversidade e estrutura populacional de *Enterococcus faecalis* resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos. 180f. Tese em Microbiologia Médica e Humana, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2017.
- 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, p. 1518-1530, 2004.
- FERGUSON, D.M. et al. Virulence genes among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from coastal beaches and human and nonhuman sources in southern California and Puerto Rico. *J. Pathog.*, v. 10, p. 1-7, 2016
- FIORE, E. et al. Pathogenicity of enterococci. *Microbiol. Spec.*, v. 7, p. 10.1128, 2019.
- FRAZZON, A.P.G. et al. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by *tet(M)* and *tet(L)* genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 26, p. 365-370, 2010.
- FREITAS, A.A.R. et al. Distribution of species and antimicrobial resistance among enterococci isolated from the fecal microbiota of captive blue-fronted parrot (*Amazona aestiva*) in Rio de Janeiro, Brazil. *Sci. Total Environ.*, v. 615, p. 1428-1437, 2018a.
- 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, p. 1104-1111, 2009.
- FREITAS, A.R. et al. Multilevel population genetic analysis of *vanA* and *vanB* *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986-2012). *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 71, p. 3351-3366, 2016.
- FREITAS, A.R. et al. Distribution of putative virulence markers in *Enterococcus faecium*: towards a safety profile review. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 73, p. 306-319, 2018b.
- FREITAS, A.R. et al. Multidrug-resistant high-risk *Enterococcus faecium* clones: can we really define them? *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 57, p.106227, 2021.
- FUJIKURA, Y. et al. Bayesian reconstruction of a vancomycin-resistant *Enterococcus* transmission route using epidemiologic data and genomic variants from whole genome sequencing. *J. Hosp. Infect.*, v. 103, p. 395-403, 2019.

GAGETTI, P. et al. Resistance to  $\beta$ -lactams in enterococci. *Ver. Argent. Microbiol.*, v. 51, p. 179-183, 2019.

GAO, W. et al. Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 41, p. 76-82, 2018.

GARCÍA-SOLACHE, M.; RICE, L.B. The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 32, p. e00058-18, 2019.

GIANNELLA, M. et al. Advances in the therapy of bacterial bloodstream infections. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 26, p. 158-167, 2020.

GILMORE, M.S. et al. (eds). *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

GUZMÁN-PRIETO, A.M. et al. Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: Attach of the clones? *Front. Microbiol.*, v. 7, p. 788, 2016.

HATOSY, S.M.; MARTINY, A.C. The ocean as a global reservoir of antibiotic resistance genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 81, p. 7593-7599, 2015.

HENDRIKSEN, R.S. et al. Using genomics to track global antimicrobial resistance. *Front. Public Health*, v. 7, p. 242, 2019.

HERNANDO-AMADO, S. et al. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat. Microbiol.*, v. 4, p. 1432-1442, 2019.

HOLLENBECK, B.L.; RICE, L.B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. *Virulence*, v. 3, p. 421-433, 2012.

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

IBARZ-PAVÓN, A.B.; MAIDEN, M.C. Multilocus sequence typing. *Methods Mol. Biol.*, v. 551, p. 129-140, 2009.

ISHII, S.; SADOWSKY, M.J. *Escherichia coli* in the environment: implications for water quality and human health. *Microbes and Environ.*, v. 23, p. 101-108, 2008.

JABBARI SHIADEH, S.M. et al. Global prevalence of antibiotic resistance in blood-isolated *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*: a systematic review and meta-analysis. *Infect. Drug Resist.*, v. 12, p. 2713-2725, 2019.

JACKSON, C.R. et al. Genetic relatedness of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from poultry carcasses. *Avian Dis.*, v. 48, p. 100-107, 2004.

JAHANSEPAS, A. et al. Occurrence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in various clinical infections: detection of their drug resistance and virulence determinants. *Microb. Drug Resist.*, v. 24, p. 76-82, 2018.

JOENSEN, K.G. et al. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 52, p. 1501-1510, 2014.

JUNG, A.V. et al. Microbial contamination detection in water resources: interest of current optical methods, trends and needs in the context of climate change. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 11, p. 4292-4310, 2014.

KAJFASZ, J.K. et al. Role of Clp proteins in expression of virulence properties of *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.*, v. 191, p. 2060-2068, 2009.

KIM, Y.B. et al., Characteristics of high-level ciprofloxacin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from retail chicken meat in Korea. *J. Food Prot.*, v. 81, p. 1357-1363, 2018.

KNAPP, C.W. et al. Differential fate of erythromycin and beta-lactam resistance genes from swine lagoon waste under different aquatic conditions. *Environ. Pollut.*, v. 158, p. 1506-1512, 2010.

KOLBJØRNSSEN, Ø. et al. Bacterial osteomyelitis in a 3-week-old broiler chicken associated with *Enterococcus hirae*. *Vet. Pathol.*, v. 48, p. 1134-1137, 2011.

KORAJKIC, A. et al. Antibiotic-resistant *Enterococcus* Species in marine habitats: a review. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health*, v. 19, p. 92-100, 2020.

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

LAM, M.M. et al. Comparative analysis of the first complete *Enterococcus faecium* genome. *J. Bacteriol.*, v. 194, p. 2334-2341, 2012.

LARSEN, M.V. et al. Multilocus sequence typing of total genome sequenced bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, v. 50, n. 4, p. 1355-1361, 2012.

LEE, B.J. et al. Treatment considerations for CNS infections caused by vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a focused review of linezolid and daptomycin. *Ann. Pharmacother.*, v. 54, p. 1243-1251, 2020.

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, p. 250-254, 2008.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive tree of life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.*, v. 47, p. W256-W259, 2019.

- LI, H. et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics.*, v. 25, p. 2078-2079, 2009.
- LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, v. 25, p. 1754-1760, 2009.
- 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, p. 553-560, 2011.
- LIU, B. et al. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res.*, v. 47, p. D687-D692, 2019.
- LÓPEZ, F. et al. Antimicrobial susceptibility and macrolide resistance genes in *Enterococcus faecium* with reduced susceptibility to quinupristin-dalfopristin: level of quinupristin-dalfopristin resistance is not dependent on *erm(B)* attenuator region sequence. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 66, p. 73-77, 2010.
- MADSEN, K.T. et al. Virulence factors associated with *Enterococcus faecalis* infective endocarditis: a mini review. *Open Microbiol. J.*, v. 11, p. 1-11, 2017.
- MAHBUB ALAM, 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, p. 239-247, 2005
- MAIDEN, M.C. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev. Microbiol.*, v. 60, p. 561-588, 2006.
- MAIDEN, M.C. et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 11, 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. 6, p. 211-215, 1998.
- MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.*, v. 17, p. 10-12, 2011.
- MCDERMOTT, P.F. et al. Whole-genome sequencing for detecting antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 60, p. 15-20, 2016.
- MELO, C.M.C. Águas recreacionais e seu potencial impacto em saúde pública: aspectos da diversidade de *Escherichia coli* e *Enterococcus* isolados de praias localizadas na região costeira da cidade do Rio de Janeiro. 162f. Dissertação em Ciências na área de Saúde Pública da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, FioCruz, 2015.

- MIKALSEN, T. et al. Investigating the mobilome in clinically important lineages of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *BMC Genomics*, v. 16, p. 282, 2015.
- MILLER, W.R. et al. Resistance in Vancomycin-Resistant Enterococci. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, v. 34, p. 751-771, 2020.
- MOLALE, L.G.; BEZUIDENHOUT, C.C. Antibiotic resistance, efflux pump genes and virulence determinants in *Enterococcus* spp. from surface water systems. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, v. 23, p. 21501-21510, 2016.
- MOREHEAD, M.S.; SCARBROUGH, C. Emergence of global antibiotic resistance, *Prim. Care*, v. 45, p. 467-484, 2018.
- MUNITA, J.M. et al. Correlation between mutations in *liaFSR* of *Enterococcus faecium* and MIC of daptomycin: Revisiting daptomycin breakpoints. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 56, p. 4354-4359, 2012.
- MURRAY, B.E. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 3, p. 46-65, 1990.
- NAPPIER, S.P. et al. Antibiotic Resistance in Recreational Waters: State of the Science. *Int. J. Environ. Res. Public Health* v. 17, p. 8034, 2020.
- NASER, S.M. et al. *Enterococcus canintestini* sp. nov., from faecal samples of healthy dogs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 55, p. 2177-2182, 2005.
- NG, L.K. et al. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol. Cell Probes.*, v. 15, p. 209-215, 2001.
- NICHOLS, G. Infections risks from water in natural and man-made environments. *Eurosurveillance*, v. 11, p. 76-78, 2006.
- NISHIDA, H. Genome DNA sequence variation, evolution and function in bacteria and archaea. *Curr. Issues Mol. Biol.*, v. 15, p. 19-24, 2013.
- NOGALES, B. et al. Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 35, p. 275-298, 2011.
- O'BRIEN, K.L. et al. Evaluation of a medium (STGG) for transport and optimal recovery of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal secretions collected during field studies. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, p. 1021-1024, 2001.
- PADMASINI, E. et AL. High-level aminoglycoside resistance and distribution of aminoglycoside resistant genes among clinical isolates of *Enterococcus* species in Chennai, India. *Sci. World J.*, eCollection, p. 329157, 2014.
- PAGE, A.J. et al. Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, v. 31, p. 3691-3693, 2015.

- PALMER, K.L.; GILMORE, M.S. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. *MBio*, v. 1, p. e00227-10, 2010.
- PANESSO, D. et al. The *hylEfm* gene in pHylEfm of *Enterococcus faecium* is not required in pathogenesis of murine peritonitis. *BMC Microbiol.*, v. 11, p. 20, 2011.
- 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, p. 1565-1570, 1997.
- PÉREZ-LOSADA, M. et al. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect. Genet. Evol.*, v. 16, p. 38-53, 2013.
- PFALLER, M.A. et al. Temporal and geographic variation in antimicrobial susceptibility and resistance patterns of enterococci: Results from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-2016. *Open Forum Infect. Dis.*, v. 6, p. S54-S62, 2019.
- PINHOLT, M. et al. Multiple hospital outbreaks of *vanA* *Enterococcus faecium* in Denmark 2012-13, investigated by WGS, MSLT and PFGE. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 70, p. 2474-2482, 2015.
- PÖNTINEN, A. et al. Heat resistance mediated by pLM58 plasmid-borne ClpL in *Listeria monocytogenes*. *mSphere*, v. 2, p. e00364-17, 2017.
- PORTILLO, A. et al. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 44, p. 967-971, 2000.
- PRATES, A. P. L. et al. Panorama da conservação dos ecossistemas costeiros e marinhos no Brasil. Brasília: MMA, 2012. 152 p.
- QUIÑONES, D. et al. Molecular epidemiologic analysis of *Enterococcus faecalis* isolates in Cuba by multilocus sequence typing. *Microb. Drug Resist.*, v. 15, p. 287-293, 2009.
- RAMOS, S. et al. Enterococci, from harmless bacteria to a pathogen. *Microorganisms*, v. 8, p. 1118, 2020.
- RANGBERG, A. et al. Molecular analysis and epidemiological typing of vancomycin-resistant *Enterococcus* outbreak strains. *Sci. Rep.*, v. 9, p. 11917, 2019.
- RAVEN, K.E. et al. Genome-based characterization of hospital-adapted *Enterococcus faecalis* lineages. *Nat. Microbiol.*, v. 1, p. 15033, 2016.
- REHMAN, M.A. et al. Genotypes and phenotypes of enterococci isolated from broiler chickens. *Front. Sustain. Food Syst.*, v. 2, p. 83, 2018.
- RESENDE, J.A. et al. Aquatic environments in the One Health context: modulating the antimicrobial resistance phenomenon. *Acta Limnol. Bras.*, v. 32, p. e102, 2020

- RIOS, R. et al. Genomic epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREfm) in Latin America: Revisiting the global VRE population structure. *Sci. Rep.*, v. 10, p. 5636, 2020.
- RODRIGUEZ-MOZAZ, S. et al. Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environment. *Environ. Int.*, v. 140, p. 105733, 2020.
- ROSIN, A.P.M. Avaliação do perfil clonal, resistência e virulência de isolados de Enterococci resistente a vancomicina em pacientes com doenças hematológicas ou submetidos a transplantes de medula óssea. 95f. Tese em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade de São Paulo, 2017.
- 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, p. 2220-2228, 2006.
- SADOWY, E.; LUCZKIEWICZ, A. Drug-resistant and hospital associated *Enterococcus faecium* from wastewater, riverine estuary and anthropogenically impacted marine catchment basin. *BMC Microbiol.*, v. 14, p. 1-15, 2014
- SAID, M.S. et al. *Enterococcus* infections. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021.
- SANTAGATI, M. et al. Genomic diversification of enterococci in hosts: the role of the mobilome. *Front. Microbiol.*, v. 3, p. 95, 2012.
- SANTIAGO-RODRIGUEZ, T.M. et al. Antibiotic-resistance and virulence genes in *Enterococcus* isolated from tropical recreational waters. *J. Water Health*, v. 11, p. 387-396, 2013.
- SCHWAIGER, K. et al. Detection of the macrolide-efflux protein A gene *mef(A)* in *Enterococcus faecalis*. *Microb. Drug Resist.*, v. 17, p. 429-432, 2011.
- SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.*, v. 30, p. 2068-2069, 2014.
- SEEMANN, T. MLST – v. 2.19.0, 2015. Disponível em: <<https://github.com/tseemann/mlst>>. Acesso em: 30 maio 2020.
- SHARMA, P. et al. Comparison of antimicrobial resistance and pan-genome of clinical and non-clinical *Enterococcus cecorum* from poultry using whole genome sequencing. *Foods*, v. 9, n. 6, p. 686, 2020.
- SOALHEIRO-ROMANO, L, et al. Base legal para a gestão das águas do Estado do Rio de Janeiro (1997-2021). Instituto Estadual do Ambiente – INEA; 5. ed., Rio de Janeiro, 2021.

- SOUZA, S.S.R. Estrutura populacional e cenário evolutivo do patógeno multirresistente *Enterococcus faecium* em instituições hospitalares do Rio de Janeiro. 204f. Tese em Microbiologia Médica e Humana, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2020.
- STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, v. 30, p. 1312-1313, 2014.
- STOGIOS, P.J.; SAVCHENKO A. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. *Protein Sci.*, v. 29, p. 654-669, 2020.
- SU, M.; SATOLA, S.W.; READ, T.D. Genome-based prediction of bacterial antibiotic resistance. *J. Clin. Microbiol.*, v. 57, n. 3, p. e01405-e01418, 2019.
- SUTCLIFFE, J. et al. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 40, p. 2562-2566, 1996.
- SWENSON, J.M. et al. Multilaboratory evaluation of screening methods for detection of high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *J. Clin. Microb.*, v. 33, p. 3008-3018, 1995.
- TAN, C. 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, p. 34-43, 2010.
- TEIXEIRA, L.M. et al. *Enterococcus*. In: CARROLL, K.C. et al. (Org) MCM, 12th ed. ASM Press. Washington DC, EUA. v. 1, p. 418-435, 2019.
- TOP, J. et al. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 52, p. 297-308, 2008.
- TORRES, C. et al. Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiol. Spectr.*, v. 6, p. ARBA-0032, 2018.
- TRAN, T.D. et al. Decrease in penicillin susceptibility due to heat shock protein ClpL in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 55, p. 2714-2728, 2011.
- TROSCIANCZYK, A. et al. Are dogs and cats a reservoir of resistant and virulent *Enterococcus faecalis* strains and a potential threat to public health? *J. Appl. Microbiol.* v. 131, p. 2061-2071, 2021.
- TURBOW, D.J. et al. Evaluation of recreational health risk in coastal waters based on *Enterococcus* densities and bathing patterns. *Environ. Health Perspect.*, v. 111, p. 598-603, 2003.
- TYSON, G.H. et al. WGS accurately predicts antimicrobial resistance in *Escherichia Coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 70, p. 2763-2769, 2015.
- TYSON, G.H. et al. Whole-genome sequencing based characterization of antimicrobial resistance in *Enterococcus*. *Pathog. Dis.*, v. 76, 2018.

- VAKULENKO, S.B. et al. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 47, p. 1423-1426, 2003.
- 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, p. e000048, 2016.
- 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.
- VAN TYNE, D. et al. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolyisin. *Toxins (Basel)*, v. 5, p. 895-911, 2013.
- VANCANNEYT, M. et al. *Enterococcus villorum* sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 51, p. 393-400, 2001.
- VELKERS, F.C. et al. *Enterococcus hirae*-associated endocarditis outbreaks in broiler flocks: clinical and pathological characteristics and molecular epidemiology. *Vet. Q.*, v. 31, p. 3-17, 2011.
- VIGNAROLI, C. et al. Epidemic *Escherichia coli* ST131 and *Enterococcus faecium* ST17 in coastal marine sediments from an Italian beach. *Environ. Sci. Technol.*, v. 47, p. 13772-80, 2013.
- WANG, S. et al. Characteristic of *Enterococcus faecium* clinical isolates with quinupristin/dalfopristin resistance in China. *BMC Microbiol.*, v. 16, p. 246, 2016.
- WERNER, G. et al. Linkage of *erm(B)* and *aadE-sat4-aphA-3* in multiple-resistant *Enterococcus faecium* isolates of different ecological origins. *Microb. Drug Resist.*, v. 9, n. 1, p. 9-16, 2003.
- WERNER, G. et al. 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, p. 28, 2007.
- WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017. Acesso em: [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25FebET\\_NM\\_WHO](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25FebET_NM_WHO).
- WICK, R.R. et al. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol.*, v. 13, p. e1005595., 2017.
- WILLEMS, R.J.L. et al. Restricted gene flow among hospital subpopulations of *Enterococcus faecium*. *MBio*, v. 3, p. e00151-12, 2012.
- WINGETT, S.W.; ANDREWS, S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Res.*, v. 7, p. 1338, 2018.

WRIGHT, G.D. The antibiotic resistome. *Expert Opin. Drug Discov.*, v. 5, n. 8, p. 779-788, 2010.

YIM, J. et al. Role of combination antimicrobial therapy for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infections: review of the current evidence. *Pharmacotherapy*, v. 37, p. 579-592, 2017.

ZAHEER, R. et al. Surveillance of *Enterococcus* spp. reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One-Health continuum. *Sci. Rep.*, v. 10, p. 3937, 2020.

ZANKARI, E. et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 67, p. 2640-2644, 2012.

ZENG, D. et al. Approved glycopeptide antibacterial drugs: Mechanism of action and resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, v. 6, n. 12, p. a026989, 2016.

ZHONG, Z. et al. Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*. *Microbiological Res.*, v. 196, p. 95-105, 2017.

ZHONG, Z. et al. Comparative genomic analysis revealed great plasticity and environmental adaptation of the genomes of *Enterococcus faecium*. *BMC Genomics.*, v. 20, p. 602, 2019.