

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MODALIDADE BIOTECNOLOGIA

MARCELLE CAROLINA CAETANO COELHO

**RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE
ENTEROCOCCUS ISOLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS NO
MUNICÍPIO DE CACHOEIRO DE ITAPEMIRIM, ESPÍRITO SANTO**

DUQUE DE CAXIAS

2023

MARCELLE CAROLINA CAETANO COELHO

**RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE
ENTEROCOCCUS ISOLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS NO
MUNICÍPIO DE CACHOEIRO DE ITAPEMIRIM, ESPÍRITO SANTO**

Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio Janeiro, Campus Duque de Caxias, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Biotecnologia. Trabalho realizado no Instituto de Microbiologia Paulo de Goés, UFRJ.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Lucia Martins Teixeira

Coorientação: MSc. Maicon Marvila Miranda

DUQUE DE CAXIAS

2023

MARCELLE CAROLINA CAETANO COELHO

**RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE *ENTEROCOCCUS*
ISOLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS NO MUNICÍPIO DE CACHOEIRO
DE ITAPEMIRIM, ESPÍRITO SANTO**

Data de Aprovação: 21/06/2023

Banca Examinadora

Prof. Dr. Lucia Martins Teixeira, UFRJ

Prof. Dr. Robson Roney Bernardo, UFRJ

Dr^a. Ana Caroline Nunes Botelho, UFRJ

Dr^a. Adriana Rocha Faria (Revisor – Suplente interno – UFRJ)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, minha família que sempre me apoiou e que esteve comigo em todos os momentos me dando forças, A irmã Gessy que hoje é uma estrelinha lá no céu, mas ela foi e é um grande exemplo pra mim, que com suas palavras me motivaram a nunca desistir, queria compartilhar o meu carinho para minha querida amiga Marcella, uma amizade de tantos anos que até hoje guardo em meu coração.

A faculdade para mim foi bem difícil, tiveram momentos que eu queria muito desistir, conheci pessoas maravilhosas que compartilharam as dores de ser um estudante desesperado, e essas pessoas me motivaram e me ajudaram em cada momento, então dedico, meu muito obrigado e apreço, a Mariana que foi e ainda é tudo para mim, uma pessoa que eu tenho um imenso carinho, minha best friend; Minha amiga Myriam que me ajudava, a não surtar com nesses períodos finais da faculdade, ainda mais com o surto de se escrever um TCC e ainda se manter insana às vezes; Bruno que foi a pessoa que eu mais desabafava em meio às crises da vida acadêmica e pessoal; Lilian também que me ajudou a me levantar quando eu estava em um momento de solidão, e me ajudou a fugir um pouco da minha realidade, todas as vezes que eu iria visitar a casa dela e além disso tiveram outras pessoas que me fortaleceram e me ajudaram durante a minha trajetória acadêmica como Jefferson, Pedro, entre outras pessoas que foram fofas comigo.

Queria agradecer ao meu laboratório que me acolheu principalmente a Professora Lucia Martins Teixeira, me dando orientação neste projeto para a conclusão da minha graduação; Ao meu Coorientador Maicon Marvila Miranda que me deu suporte em todo o projeto e teve bastante paciência comigo e também a todos do laboratório, que mesmo o pouco tempo que eu estive lá com eles, eu fui muito bem tratada por todos.

Todo o meu carinho ao meu campus da UFRJ Duque de Caxias, que me ajudaram a evoluir como pessoa por todas as etapas que vivenciei por lá.

Aos órgãos de fomento ao ensino e pesquisa, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), sobretudo através do projeto Instituto Nacional de Pesquisa em Resistência a Antimicrobianos (INPRA) do programa Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT), 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 que tornou este projeto possível.

RESUMO

COELHO, Marcelle Carolina Caetano. Resistência aos antimicrobianos em amostras de *Enterococcus* isoladas de pacientes hospitalizados no município de Cachoeiro do Itapemirim, Espírito Santo, 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas: Biotecnologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Duque de Caxias, Rio de Janeiro, 2023.

Algumas espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* têm se destacado entre os mais importantes patógenos oportunistas da atualidade. Com a finalidade de entender as características associadas a amostras de origem hospitalar, o presente estudo avaliou características fenotípicas e genotípicas de resistência aos antimicrobianos em amostras de *Enterococcus* isoladas de pacientes hospitalizados em instituições localizadas no município de Cachoeiro do Itapemirim, Espírito Santo, no período que compreendeu os meses de outubro de 2017 a janeiro de 2020. Foram isoladas 152 amostras provenientes de duas instituições hospitalares e denominadas de HE e SA, das quais 62 (41%) foram obtidas no hospital HE e 90 (59%) no hospital SA. A identificação bacteriana foi realizada pelo método de MALDI TOF e as espécies predominantes foram *Enterococcus faecalis* (130 amostras, 85,6%) e *Enterococcus faecium* (18 amostras, 11,8%). Outras espécies também foram observadas: *Enterococcus avium* (2 amostras, 1,4%), *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus hirae*, ambas representadas por uma amostra (0,6%). Em relação às fontes de isolamento, as mais frequentes foram: urina [61 (40,1%)], swab retal [31 (20,3%)] e sangue [27 (17,7%)]. A susceptibilidade das amostras foi determinada para um painel de 18 antimicrobianos, e utilizada para estimar a frequência e os perfis de multirresistência, empregando o critério de não-susceptibilidade a três ou mais classes de antimicrobianos. Foram observados os seguintes percentuais de resistência: ampicilina (11,8%), ciprofloxacina (46,1%), cloranfenicol (32,9%), eritromicina (61,8%), estreptomicina (25%), gentamicina (34,9%), levofloxacina (46,1%), linezolida (2%), nitrofurantoína (12,5%), norfloxacina (46,7%), penicilina (25,7%), quinupristina/dalfopristina (80,3%), rifampicina (27%), teicoplanina (33,6%), tetraciclina (67,8%), tigeciclina (0,7%) e vancomicina (35,5%). Todavia, variações nas taxas de resistência foram observadas nas duas espécies mais frequente, com taxas mais elevadas nas amostras de *E. faecium*, destacando-se a resistência aos betalactâmicos (ampicilina e penicilina), bem como taxas mais elevadas para os glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina), fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina e levofloxacina) e aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina). Observou-se que 93 (61,2%) das amostras apresentaram multirresistência, sendo identificados 12 perfis em amostras de *E. faecium* e 42 em *E. faecalis*. A pesquisa de marcadores genéticos associados a resistências a níveis elevados de aminoglicosídeos: gentamicina e outros aminoglicosídeos (exceto estreptomicina) – *aac(6')-le-aph(2')-la*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id* e *aph(3')IIIa*; estreptomicina - *ant(6')*, *ant(3')-la*, *ant(9')-la*, *ant(9')-Ib*; e glicopeptídeos: *vanA*, foi realizada por PCR. Observou-se a resistência a vancomicina em 52 amostras e todas apresentaram o gene *vanA*. A resistência a níveis elevados de gentamicina foi detectada em 54 amostras, associada à presença do gene *aac(6')-le-aph(2')-la*, e em 20,2% (n=11/54) à presença concomitante do gene *aph(3')IIIa*, bem como à presença de *ant(6')* em 86,8% das amostras (n=33/38).

O cenário associado com as infecções pertencentes à assistência à saúde (IRAS) é uma circunstância predominante em instituições hospitalares brasileiras, já que proporciona a utilização de várias classes de antimicrobianos, fato que beneficia o evento de resistência microbiana, e esse evento é um sério problema de saúde pública em todo o mundo por ser responsável por milhões de mortes e altos custos para os sistemas de saúde. E para contornar esse problema emergente e a propagação desses microrganismos resistentes aos antimicrobianos, são utilizados métodos, como o monitoramento através de informações e dados epidemiológicos, de acordo com o perfil epidemiológico e o contexto regional.

O presente estudo fornece dados sobre a ocorrência e distribuição de espécies bacteriana de *Enterococcus* em duas instituições hospitalares, assim como sobre as características fenotípicas e genotípicas de resistência aos antimicrobianos, indicando a frequência expressiva de amostras multirresistentes, incluindo VRE, e contribuindo com informações que podem servir de base para ações relacionadas à vigilância e tratamento de infecções enterocócicas.

Palavras-Chaves: *Enterococcus*; infecção hospitalar; resistência aos antimicrobianos, caracterização genotípica, resistência aos glicopeptídeos e aminoglicosídeos; multirresistência.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição das amostras de <i>Enterococcus</i> de acordo com a fonte de isolamento (infecção e colonização) e a instituição de origem	30
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das amostras de <i>Enterococcus</i> de acordo com a fonte de isolamento e a instituição de origem	31
Tabela 2. Distribuição das amostras de <i>Enterococcus</i> de acordo com a espécie e a instituição de origem	31
Tabela 3. Distribuição das espécies de <i>Enterococcus</i> de acordo com as fontes de isolamento	32
Tabela 4. Susceptibilidade a 18 antimicrobianos entre 152 amostras de <i>Enterococcus</i> isoladas de pacientes hospitalizados em instituições localizadas no município de Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo	33
Tabela 5. Susceptibilidade a 18 antimicrobianos entre 130 amostras de <i>E. faecalis</i> isoladas de pacientes hospitalizados em instituições localizadas no município de Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo	34
Tabela 6. Susceptibilidade a 18 antimicrobianos entre 18 amostras de <i>E. faecium</i> isoladas de pacientes hospitalizados em unidades no município de Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo	35
Tabela 7. Antibiótipos identificados entre 93 amostras classificadas como multirresistentes de acordo com as espécies de <i>Enterococcus</i>	36
Tabela 8. Distribuição do gene <i>vanA</i> em 52 amostras de <i>Enterococcus</i> com fenótipo de resistência aos glicopeptídeos *, de acordo com a instituição de origem	38
Tabela 9. Distribuição dos genótipos associados à resistência a níveis elevados de gentamicina e demais aminoglicosídeos *, de acordo com a origem e a espécie	39
Tabela 10. Distribuição do genótipo associado à resistência a níveis elevados de estreptomicina *, de acordo com a origem e a espécie	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Genes associados a diferentes perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos ^a	17
Quadro 2. Genes associados à resistência aos glicopeptídeos ^a em <i>Enterococcus</i>	19
Quadro 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a pesquisa de genes associados à resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos e aos glicopeptídeos em <i>Enterococcus</i>	27

ABREVIATURAS E SIGLAS

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - *Clinical Laboratory Standards Institute*

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EI - Endocardite Infecciosa

EMAs - Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos

FDA - *Food and Drug Administration*

GTP - Trifosfato de guanosina

HLR - A - *High-Level Resistance to Aminoglycosides*

HLR - G - *High-Level Resistance to Gentamicin*

HLR - S - *High-Level Resistance to streptomycin*

IRAS - Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

ITU - Infecção do Trato Urinário

LAP L - leucina- β -naftilamida

MDR - *Multidrug Resistance*

MSCRAMM - *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*

pb - pares de bases

PBPs - *Penicillin Binding Proteins*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PYR L - pirroglutamil- β -naftilamida

RNA - Ácido ribonucleico

TGI - Trato Gastrointestinal

VRE - *Vancomycin-Resistant Enterococci*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS BACTÉRIAS	12
1.2	CARACTERÍSTICAS DOS <i>ENTEROCOCCUS</i>	13
1.3	RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM <i>ENTEROCOCCUS</i>	14
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GERAL	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	AMOSTRAGEM	25
3.2	IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	25
3.3	DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	25
3.4	EXTRAÇÃO DE DNA E AMPLIFICAÇÃO DOS GENES ASSOCIADOS A RESISTÊNCIA A NÍVEIS ELEVADOS DE AMINOGLICOSÍDEOS E GLICOPEPTÍDEOS	26
4	RESULTADOS	30
4.1	AMOSTRAGEM	30
4.2	SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	32
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA AOS GLICOPEPTÍDEOS E A NÍVEIS ELEVADOS DE AMINOGLICOSÍDEOS	37
4.3.1	DETECÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA AOS GLICOPEPTÍDEOS	37
4.3.2	DETECÇÃO DE GENES ASSOCIADOS A RESISTÊNCIA A NÍVEIS ELEVADOS DE GENTAMICINA E OUTROS AMINOGLICOSÍDEOS	38
5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÃO	48
	BIBLIOGRAFIA	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS BACTÉRIAS

As bactérias são os microrganismos mais antigos da Terra e algumas poucas espécies bacterianas são responsáveis por causar doenças (ARANSON, 2022). Apesar disso, as bactérias são fundamentais para a vida, sendo que a maioria é benéfica ao ecossistema (MURRAY *et al.*, 2014).

Esses microrganismos são encontrados fazendo parte da microbiota de humanos e animais. São encontrados na pele e superfície de mucosas, bem como no trato gastrointestinal dos homens e dos animais, estando ligados, de forma intrínseca, à vida desses organismos e aos diversos ambientes em que habitam: água e solo. Com propriedades benéficas ao hospedeiro, auxiliam na metabolização de nutrientes e sua absorção, ou até mesmo, na proteção contra patógenos e doenças, limitando a adesão e colonização por bactérias nocivas (MURRAY *et al.*, 2014).

São seres procariotos, constituídos por células de composição relativamente simples, apresentando poucos componentes estruturais e essenciais: um nucleóide (DNA), ribossomos, membrana citoplasmática e parede celular (PERKINS, *et al.*, 1981; VOLKE; NIKEL, 2018; ARANSON, 2022).

Com base na composição da parede celular, as bactérias quando passível a coloração de Gram, podem ser classificadas em Gram-positivas, com parede celular constituída por uma camada de peptidoglicano espessa, ou em Gram-negativas, nas quais o peptidoglicano constitui uma camada basal delgada, sobre a qual se encontra outra camada, a membrana externa, composta por lipoproteínas, fosfolípidios, proteínas e lipopolissacarídeos (ROGERS; PERKINS; WARD, 1981; SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010). Outras características que podem ser observadas nas bactérias são os flagelos, que são apêndices delgados que tem como função a locomoção e de composição diferente dos presentes em células eucariotas, e outras estruturas proteicas filamentosas, as fímbrias. As fímbrias são apêndices finos, retos e curtos, encontrados tanto nas espécies móveis (presença de flagelo), bem como nas imóveis (ausência do flagelo), originados através de corpúsculos basais na membrana citoplasmática e responsáveis na associação entre células bacterianas e a troca de material genético no processo de conjugação bacteriana, denominadas, nesse caso, de fímbria sexual, e pela aderência às superfícies mucosas dos hospedeiros (JONES; AIZAWA, 1991; SILVERMAN; SIMON, 1977).

1.2 CARACTERÍSTICAS DOS *ENTEROCOCCUS*

O gênero *Enterococcus* compreende bactérias Gram-positivas que pertencem ao grupo das bactérias ácido-láticas, e é composto por mais de 50 espécies (EUZEBY, 1997; PARTE *et al.*, 2020) que fazem parte da microbiota natural do trato gastrointestinal (TGI) de humanos e de vários outros animais, como aves e bovinos, sendo, também, encontradas em solo, água e alimentos e em uma variedade de ambientes, incluindo os hospitalares (VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 1999; AARESTRUP; HASMAN, 2004; GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

Nas últimas décadas, o gênero *Enterococcus* tem se destacado como um dos principais patógenos oportunistas, associados tanto as infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), causando infecção do trato urinário (ITU), bacteremia, endocardite, em queimaduras, infecções de ferida cirúrgica, abdominal, do trato biliar, de cateteres e outros dispositivos médicos implantados (MURDOCH *et al.*, 2009; SLIPCZUK *et al.*, 2013), bem como as infecções adquiridas na comunidade, onde as duas principais espécies, mais frequentemente associadas às infecções humanas são *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (OZBAK, 2018; RAZA *et al.*, 2018). As infecções por enterococos podem se originar da microbiota normal do paciente, da transferência de microrganismos de paciente para paciente ou da aquisição dos patógenos através do consumo de água ou alimentos contaminados (KÜHN *et al.*, 2003; RAMOS *et al.*, 2020). Algumas espécies deste gênero demonstram resistência intrínseca aos antimicrobianos mais comuns, como as cefalosporinas, aminoglicosídeos, clindamicina e trimetoprim-sulfametoxazol (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

Além disso, possuem um genoma com alta capacidade de plasticidade que permite que essas duas espécies adquiram rapidamente a resistência a outros antimicrobianos, como resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos, de ampicilina e à vancomicina, seja por mutação ou por transferência horizontal de elementos genéticos que conferem determinantes de resistência (SPERA; FARBER, 1994; MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000).

Estes microrganismos possuem morfologia celular de cocos, não são formadores de esporos (SCHLEIFER; KILPPER-BÄLZ, 1984) e podem se apresentar como células isoladas, em pares ou cadeias curtas. Se cultivados em ágar sangue de

cavalo, os enterococos podem apresentar os padrões alfa, beta ou não hemolíticos e formar colônias de 1 a 2 mm com aparência úmida (ENGLAND, 2014). Com base em suas capacidades metabólicas, diferentes meios de cultura seletivos foram desenvolvidos para o isolamento de enterococos; esses meios seletivos frequentemente contêm sais biliares, azida sódica, esculina e antimicrobianos. Nem todas as espécies enterocócicas são capazes de crescer nesses meios seletivos, mas as espécies clinicamente mais relevantes crescem bem (TEIXEIRA *et al.*, 2019). A maioria dos esquemas para identificação de enterococos inclui o teste de catalase, sendo os enterococos catalase negativos; os testes de L-pirrolidonil- β -naftilamida (PYR) e L-leucina- β -naftilamida (LAP), nos quais os enterococos são positivos por apresentarem a capacidade de hidrolisar estes compostos por produzirem as enzimas pirrolidonil arilamidase (pirrolidonil aminopeptidase) e leucina aminopeptidase, respectivamente; e o teste de hidrólise de esculina na presença de sais biliares, no qual também são positivos, devido a produção de um composto enegrecido, a esculetina, que se complexar com íons férricos do meio (WILLIAMS; RODRIGUES; COLLINS, 1991; TEIXEIRA *et al.*, 2019).

As espécies de enterococos podem ser distinguidas por testes fenotípicos baseados na capacidade de produzir ácidos a partir da fermentação de diferentes açúcares, tais como: manitol, sorbose, arabinose, sorbitol e rafinose e para hidrolisar a arginina, entre outros (FACKLAM; COLLINS, 1989; FACKLAM; CARVALHO; TEIXEIRA, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2019).

A metodologia que, cada vez mais, vem sendo empregada na identificação de microrganismos é a espectrometria de massa por tempo de voo com ionização de desorção a laser assistida por matriz, ou MALDI-TOF MS (no inglês, *matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*). É reconhecido que o emprego desse sistema comercial na caracterização bacteriana, particularmente no diagnóstico das infecções humanas, tem representado um avanço nessa área, por conjugar a rapidez dos resultados com o baixo custo do teste, apesar do equipamento ainda apresentar um valor elevado. Diversos estudos demonstram que o seu emprego é eficaz na caracterização das espécies de *Enterococcus*.

1.3 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM *ENTEROCOCCUS*

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um problema de saúde grave nos dias atuais (MURRAY *et al.*, 2022), sendo responsável por um considerável aumento do

número de mortes (AHMAD *et al.*, 2021). O fenômeno da resistência bacteriana é um processo natural e resulta da pressão seletiva exercida pelos antibióticos, levando à seleção e aumento de populações bacterianas resistentes (ASLAM *et al.*, 2018).

O impacto das IRAS é observado não apenas com relação a cada paciente individual, mas também com relação à comunidade, pois têm sido associadas às infecções multirresistentes (MONEGRO; MUPPIDI; REGUNATH, 2020; AHMAD *et al.*, 2021). As infecções causadas por organismos resistentes aumentam o tempo de internação e a taxa de morbi-mortalidade, requerem o uso de diferentes medicamentos, e, portanto, aumentam os custos gerais de tratamento e hospitalização. Entre as principais bactérias resistentes a antimicrobianos estão os enterococos resistentes à vancomicina (VRE, do inglês *Vancomycin-Resistant Enterococci*), já que o risco de colonização e infecções por VRE está associado à exposição prévia aos antimicrobianos, especialmente ao uso de vancomicina e cefalosporinas, e levando ao desequilíbrio dos microbiomas intestinais normais (OZBAK, 2018; PÉREZ-RODRÍGUEZ).

Os membros do gênero *Enterococcus* apresentam resistência intrínseca a diferentes antimicrobianos e exímia capacidade em adquirir elementos genéticos que favorecem a resistência aos antimicrobianos (TORRES *et al.*, 2018). Os traços de resistência intrínseca aos antimicrobianos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e glicopeptídeos, lincosamidas e sulfametoxazol+trimetoprim estão associados com a necessidade de sobreviver e persistir em ambientes altamente competitivos, como o trato gastrointestinal. Já a resistência adquirida é devida a mecanismos de transferência genética (transposons e/ou plasmídeos) e/ou mutações que fornecem aos enterococos a capacidade de adquirir resistência a diversos antimicrobianos, entre eles: β -lactâmicos, aminoglicosídeos e glicopeptídeos, lincosamidas, macrolídeos, estreptograminas, tetraciclina, quinolonas, bacitracina e cloranfenicol (GERALDES *et al.*, 2022).

A resistência aos aminoglicosídeos em enterococos é mediada por dois fatores principais: má absorção do antibiótico, que requer concentrações mais altas para promover a entrada no espaço intracelular e inativação por modificação covalente dos grupos hidroxila ou amino do aminoglicosídeo, molécula realizada por enterococos de ocorrência natural de enzimas, criando um impedimento estérico e diminuindo a ligação ao alvo ribossômico. Além disso, a modificação no alvo ribossômico também pode estar relacionada à resistência aos aminoglicosídeos em enterococos.

O *E. faecium* possui uma enzima 6'-acetiltransferase codificada pelo gene *aac(6')-li*, localizado no cromossomo, a qual é capaz de modificar os aminoglicosídeos: tobramicina, sisomicina, canamicina e netilmicina (COSTA *et al.*, 1993). Além disso, a enzima codificada pelo gene *aph(3')-IIIa*, que confere resistência à canamicina e amicacina por meio de sua capacidade de fosfotransferase, bem como serem capazes de modificar o alvo ribossômico através de uma RNA ribossômico (rRNA) metiltransferase conhecida como EfM (GALIMAND *et al.*, 2011). Esta enzima reconhece uma citidina específica na posição 1404 do 16S rRNA em *E. faecium*, e a metilação deste resíduo leva a resistência à canamicina e à tobramicina. Devido às tais modificações, apenas dois aminoglicosídeos, gentamicina e estreptomicina, são usados na prática clínica para enterococos, pelo fato de que esses compostos não são facilmente afetados por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) produzidas por enterococos e em sinergismo com os beta- lactâmicos, visto que o uso combinado de um agente antimicrobiano ativo contra parede celular permite mais facilmente o acesso dos aminoglicosídeos ao interior da célula. No entanto, a resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos, definida por concentração inibitória mínima (CIM) > 2000 mg/ml para estreptomicina e 500 mg/ml para gentamicina, suprime o efeito sinérgico dos aminoglicosídeos com betalactâmicos (MILLER; MUNITA; ARIAS, 2014).

A resistência à estreptomicina ocorre por dois mecanismos: devido a mudanças no sítio de ação no ribossomo por causa de mutações na subunidade 30S, ou pela ação de EMAs, codificadas pelos genes *ant(6)-Ia, ant(3'')-Ia, ant(9')-Ia* e *ant(9')-Ib* presentes em plasmídeos e/ou transposons, que causam modificações por adenilação da molécula do fármaco, promovendo a sua inativação (inibição enzimática) (PADMASINI; PADMARAJ; RAMESH, 2014; WANG *et al.*, 2022). De forma semelhante, a resistência a níveis elevados de gentamicina é principalmente devido a uma enzima modificadora, codificada pelo gene *aac(6')-Ie/aph(2')-Ia*, que possui tanto atividades de 6'-acetiltransferase quanto 2'-fosfotransferase e confere resistência a todos os aminoglicosídeos, exceto a estreptomicina (COURVALIN; CARLIER; COLLATZ, 1980; GERALDES *et al.*, 2022). Três outros genes adquiridos que codificam fosfotransferases que podem afetar a atividade da gentamicina foram identificados: *aph(2')-Ic*, que foi originalmente detectado em *E. gallinarum* e depois também encontrado em *E. faecium* e *E. faecalis* (CHOW *et al.*, 1997), e tem atividade contra

gentamicina e tobramicina, mas não a amicacina ou netilmicina; *aph(2')-Id*, que confere resistência à gentamicina, mas não a amicacina e foi identificado em *E. casseliflavus* e *E. faecium* (TSAI *et al.*, 1998), e *aph(2')-Ib* que foi descrito em *E. faecium* e sua presença resulta em resistência a todos os aminoglicosídeos, exceto estreptomicina e amicacina (CHOW, 2000).

O **Quadro 1** apresenta os genes associados aos perfis de susceptibilidade aos diferentes antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos.

Quadro 1. Genes associados a diferentes perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos^a

Genes	Antimicrobianos							
	GEN	TOB	AMI	CAN	NET	DIB	EST	ESC
<i>aac(6')-Ie-aph(2')-Ia</i>	R	R	R	R	R	R	S	S
<i>aph(2'')-Ib</i>	R	R	S	R	R	R	S	S
<i>aph(2'')-Ic</i>	R	R	S	R	S	S	S	S
<i>aph(2')-Id</i>	R	R	S	R	R	R	S	S
<i>aph(3')-IIIa</i>	S	S	R	R	S	S	S	S
<i>aac(6')-Ii</i>	S	R	S	R	R	ND	S	S
<i>ant(3'')-Ia</i>	S	S	S	S	S	S	R	S
<i>ant(4')-Ia</i>	S	R	R	R	S	ND	S	S
<i>ant(6')-Ia</i>	S	S	S	S	S	S	R	S
<i>ant(9')-Ia</i>	S	S	S	S	S	S	R	R
<i>ant(9')-Ib</i>	S	S	S	S	S	S	R	R

^aAdaptado de Chow, 2000; Alam *et al.*, 2005; Werner, 2008; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; AMI, amicacina; CAN, canamicina; NET, netilmicina; DIB, dibecacina; EST, estreptomicina; ESC, espectinomicina; R, resistência; S, susceptibilidade; ND, não detectado

A resistência aos β -lactâmicos varia de acordo com o subgrupo: aminopenicilinas, ureidopenicilinas, cefalosporinas, penicilina G e carbapenemas (FONTANA *et al.*, 1992; WEINSTEIN, 2001). A maioria das cefalosporinas, quando usadas em monoterapia, não tem atividade em enterococos. A resistência intrínseca pode ser relacionada, em parte, às proteínas de ligação à penicilina (PBPs) que estão envolvidas na biossíntese e manutenção da camada de peptidoglicano que envolve a célula enterocócica. Em *E. faecalis* quanto em *E. faecium*, são conhecidas três PBPs de classe A e três PBPs de classe B, cada uma das quais têm afinidade diminuída para diferentes antimicrobianos dos subgrupos dos β -lactâmicos (ARBELOA *et al.*, 2004; RICE *et al.*, 2009).

O principal determinante da redução da suscetibilidade aos β -lactâmicos é a enzima PBP5 de classe B de baixa afinidade em *E. faecium* (SIFAUI *et al.*, 2001; GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019). Esse fenótipo é conferido através de uma

combinação de fatores, incluindo alterações na expressão gênica da PBP5 e um mosaico de mudanças na sequência de aminoácidos da enzima, sendo uma substituição de metionina para treonina ou alanina na posição 485 e a adição de ácido aspártico ou serina após a posição 466, em que ambas as posições estão localizadas próximas ao sítio ativo da enzima. Além disso, outras substituições de aminoácidos, incluindo alanina para isoleucina ou treonina na posição 499, glutamina para valina na posição 629 e prolina para serina na posição 667, parecem influenciar a conformação do sítio ativo e a afinidade para β -lactâmicos (RICE *et al.*, 2004; MONTEALEGRE *et al.*, 2017). A presença dos alelos de resistência que codificam variantes de PBP5 tem sido associada com cepas de *E. faecium* adaptadas ao hospital, e pode ser um dos fatores que permitiram que essas cepas se estabelecessem no ambiente hospitalar (GALLOWAY-PENA; RICE; MURRAY, 2011; GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019). O ortólogo em *E. faecalis* é PBP4, que confere resistência às cefalosporinas, mas, em geral, não confere resistência às aminopenicilinas (ARBELOA, *et al.*, 2004; MOON *et al.*, 2018). Todavia, amostras de *E. faecalis* resistentes à penicilina tem sido reportadas, sendo em sua maioria suscetível à ampicilina, mas isolados totalmente resistentes à ampicilina também já foram descritos. Esses fenótipos de resistência parecem estar relacionados às substituições de aminoácidos, a mudança de valina para isoleucina no resíduo 223 no domínio N-terminal da molécula e a mudança de alanina para treonina no resíduo 617 no domínio transpeptidase, que remodelam o sítio ativo da PBP4 e mutações do promotor, que aumentam a expressão do gene (CONCEIÇÃO *et al.*, 2014; RICE *et al.*, 2018).

Os glicopeptídeos também atuam interferindo na biossíntese da parede celular, mas em um alvo diferente dos β -lactâmicos, inibindo a síntese de peptidoglicano pela ligação específica aos resíduos de D-Alanil-D-Alanina e, conseqüentemente, a síntese da parede celular. A resistência é devida a alteração do precursor de peptidoglicano D-Alanil-D-Alanina por D-Alanil-D-Lactato ou D-Alanil-D-Serina, com afinidade de ligação à droga de 1000 vezes a 7 vezes menor, respectivamente (ARTHUR; COURVALIN, 1993; COURVALIN, 2006; KRISTICH; RICE; ARIAS, 2014).

Em resposta a presença do glicopeptídeo, os operons de resistência regulam a expressão de um conjunto de enzimas que, em conjunto, levam a alteração para os precursores de peptidoglicano modificados e de baixa afinidade aos glicopeptídeos. Os dois principais genótipos de resistência são *vanA* e *vanB* (COURVALIN, 1993; GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019). O operon *vanA* são codificados no *Tn1546*, conferindo resistência a níveis elevados de vancomicina e à teicoplanina. O operon *vanB* são encontrados em transposons do tipo *Tn5382/Tn1549*, tanto em plasmídeos

quanto no cromossomo, proporcionando resistência moderada apenas à vancomicina (WILLEMS *et al.*, 2005; TORRES *et al.*, 2018).

Outros genótipos associados à resistência aos glicopeptídeos já foram descritos em *Enterococcus*: *vanC*, *vanE*, *vanG*, *VanL* e *vanN* que conferem resistência intrínseca a níveis baixos a vancomicina alteração para D-alanil-D-Serina e comumente não transferível; *vanD*, caracterizado por resistência à vancomicina e suscetibilidade ou resistência intermediária à teicoplanina; *vanM*, determina elevados níveis de resistência à vancomicina, por precursores alterados formados de D-alanil-D-lactato. Contudo, os genes *vanA* e *vanB* são, ainda, os mais frequentemente associados à resistência à vancomicina (AHMED; BAPTISTE, 2018; MARCHI *et al.*, 2022) (**Quadro 2**).

Quadro 2. Genes associados à resistência aos glicopeptídeos^a em *Enterococcus*

Característica	Gene								
	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanC</i>	<i>vanD</i>	<i>vanE</i>	<i>vanG</i>	<i>vanL</i>	<i>VanM</i>	<i>vanN</i>
Ligase	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser
Posição	Plasmídeo/ Cromossomo	Plasmídeo/ Cromossomo	Cromossomo	Cromossomo	Cromossomo	Cromossomo	Cromossomo	Plasmídeo	Desconhecida
Nível de resistência a Vancomicina	Alta	Alta	Baixa	Alta	Baixa para Moderada	Baixa	Baixa	Alta	Baixa
Nível de resistência a Teicoplanina	Alta	Suscetível	Suscetível	Baixa para alta	Suscetível	Suscetível	Suscetível	Alta	Suscetível
Classificação entre as espécies de <i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. durans</i> <i>E. hirae</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. avium</i> <i>E. mundtii</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i> <i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. gallinarum</i>	<i>E. Faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>

^aBaseado em Courvalin, 2006; Ahmed; Baptiste, 2018; Werner, 2008; Teixeira *et al.*, 2019

A linezolid, pertencente à classe das oxazolidinonas, é um agente bacteriostático com ampla atividade contra bactérias Gram-positivas. Ela se liga ao rRNA 23S e interrompe o encaixe do aminoacil-tRNA no sítio do ribossomo, inibindo assim a entrega de peptídeos e o subsequente alongamento da cadeia polipeptídica (SHINABARGER *et al.*, 1997; LEACH *et al.*, 2007). Mutações em genes que codificam o rRNA 23S, parte importante do sítio de ligação da droga no ribossomo, representam os mecanismos mais comuns de resistência à linezolid. Os enterococos, como muitas outras bactérias, possuem múltiplas cópias do gene 23S rRNA e o número de alelos mutados correlaciona-se com o fenótipo de resistência (MARSHALL *et al.*, 2002). Entre essas mudanças no domínio V do rRNA 23S, a substituição G2576T (que

se refere à posição de nucleotídeo originalmente designado para genes de rRNA em *Escherichia coli*) é a mais comum e a seleção de mutações no rRNA está associada à maior duração da terapia. Além disso, mutações nas proteínas ribossômicas L3 e L4, que fazem fronteira com o centro da peptidiltransferase, onde se liga a linezolida, estão associadas ao aumento da CIM de linezolida. Essas mutações foram originalmente descritas em estafilococos resistentes à linezolida e foram posteriormente identificadas também em enterococos resistentes (LOCKE; HILGERS; SHAW, 2009; CHEN *et al.*, 2013). Modificação enzimática do rRNA 23S por metilação de uma adenina na posição 2503 também foi descrita em enterococos (TOH *et al.*, 2007). Também é descrito na literatura o gene *cfr*, que codifica uma metilase (Cfr) determinante de resistência plasmidial, que foi encontrado em isolados clínicos de *E. faecalis*, bem como em outros organismos Gram-positivos clinicamente relevantes, como estafilococos (DIAZ *et al.*, 2012; MENDES *et al.*, 2008; TORRES *et al.*, 2018). O gene *cfr* tem sido associado com elemento celular transponível IS256, cuja sequência é comum em estafilococos e enterococos multirresistentes, e esta sequência medeia a transferência de resistência a antimicrobianos, além de alterar a sequência promotora de proteínas ou ativar a expressão de determinantes de resistência existentes (HENNIG; ZIEBUHR, 2010). Esse fenômeno poderia explicar a capacidade do *cfr* para se espalhar entre as espécies e traz preocupação quanto a possibilidade de ampla disseminação no cenário clínico. Dados de um modelo de peritonite em camundongos *in vivo* sugeriram que a resistência *cfr* em estafilococos pode ser superada por doses de linezolida que mimetizam a farmacocinética humana; no entanto, mutações no 23S rRNA resultaram em falha terapêutica (DIAZ *et al.*, 2013).

A quinupristina/dalfopristina (Q/D), pertence à classe das estreptograminas e compreende uma mistura de derivados de pristinamicina, estreptogramina A (dalfopristina) e B (quinupristina), eficazes contra *E. faecium*, mas não contra *E. faecalis* (WANG *et al.*, 2016). *E. faecalis* possui um gene cromossômico chamado *lsa* que confere resistência a lincosamida e estreptogramina e codifica uma proteína putativa com um motivo de cassete de ligação a ATP de proteínas transportadoras, mas não a região transmembrana, que seria esperada para uma bomba de efluxo (SINGH; WEINSTOCK; MURRAY, 2002; MERCURO, *et al.*, 2018). A ação molecular exata e os mecanismos de resistência permanecem por serem elucidados, mas sua presença fornece resistência intrínseca à estreptogramina A e lincosamidas a *E. faecalis*, o que explica a falta de ação de Q/D contra este microrganismo. Além disso, a resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B (conhecida como fenótipo MLS_B) é

prevalente em enterococos (HERSHBERGER *et al.*, 2004). Resistência cruzada com todos os macrolídeos surge da modificação do alvo de rRNA 23S por metilases produzidas por uma variedade de genes, sendo comum o *ermB* (PORTILLO *et al.*, 2000; WEISBLUM, 1995). O mecanismo de ação bactericida de Q/D resulta de um efeito sinérgico de ambos os compostos de pristinamicina. A ligação da dalfopristina induz uma mudança conformacional no ribossomo que expõem um sítio de ligação de alta afinidade para a quinupristina, levando à inibição irreversível do complexo ribossomo (CANU; LECLERCQ, 2001). A resistência a Q/D em *E. faecium* é mediada por vários mecanismos. Em primeiro lugar, a modificação da dalfopristina através das acetiltransferases VatD e VatE torna-a ineficaz, eliminando a sinergia observada com quinupristina (WERNER; KLARE; WITTE, 2002). Um segundo mecanismo de resistência, originalmente descrito em estafilococos, envolve a clivagem enzimática da estrutura em anel da estreptogramina B por lactonases VgbA e VgbB (KORCZYNSKA *et al.*, 2007). Curiosamente, o fenótipo MLS_B conferido pelos genes *erm* modificam o alvo para quinupristina (estreptogramina B); no entanto, a dalfopristina, estreptogramina A, permanece ativa. No entanto, *in vivo* a presença de *ermB* pode afetar a eficácia de Q/D. De fato, esse fenômeno foi demonstrado em um modelo em que descobriram que a atividade de Q/D foi diminuída em enterococos possuindo fenótipo MLS_B devido à penetração incompleta de dalfopristina na vegetação valvar, resultando em falha terapêutica de cinco pacientes no grupo com monoterapia Q/D, em comparação com nenhum no grupo da amoxicilina (FANTIN *et al.*, 1997). Finalmente, bombas de efluxo como *msrC* também foram implicadas em desempenhar um papel na remoção de Q/D da célula e, mais recentemente, foi constatado que uma mutação no gene *eatA* (para o transportador *Enterococcus ABC*) confere resistência a amostras susceptíveis de *E. faecium* (ISNARD *et al.*, 2013).

As tetraciclinas compreendem outra classe de antimicrobianos que exerce seu efeito antibacteriano ligando-se ao ribossomo e interferindo no encaixe do aminoacil-tRNA. Isso ocorre via associação com várias alças do rRNA 16S e a proteína ribossomal S7, no entanto, este é um processo reversível, comum aos agentes que são bacteriostáticos (SCHNAPPINGER; HILLEN, 1996). A resistência é mediada por múltiplos genes, e pelos mecanismos de efluxo do antimicrobiano e/ou proteção ribossomal. Bombas de efluxo codificados pelos genes *tetK* e *tetL* são transmitidos por plasmídeos e codificam proteínas com 14 alfa-hélices que compõem os domínios transmembrana e conferem resistência à tetraciclina, mas não minociclina (CHOPRA; ROBERTS, 2001). Na presença da tetraciclina, o complexo ribossomal é incapaz de

sintetizar o peptídeo líder normal, uma estrutura de alça alternativa se forma do mRNA e o segundo sítio de ligação se tornam acessíveis, permitindo a síntese da bomba de efluxo. Os genes *tetM*, *tetO* e *tetS* estão no cromossomo e conferem resistência à doxiciclina e minociclina, bem como à tetraciclina e podem ser transferidos através do transposon *Tn916* (BENTORCHA; DE CESPÉDÈS; HORAUD, 1987; PEPPER, KAREN *et al.*, 1991; TORRES *et al.*, 2018). Esses genes codificam uma proteína com uma homologia significativa com fatores de alongamento bacteriano (EFs) e, como os EFs, são capazes de hidrolisar guanosina trifosfato (GTP), o que altera a conformação ribossomal e desloca a tetraciclina ligada (CHOPRA; ROBERTS, 2001).

Entre os anos de 1950 a 1970, vários membros da família das tetraciclinas haviam sido desenvolvidos, uns como produtos naturais, outros como produtos semissintéticos e, neste mesmo período, as tetraciclinas figuraram entre os antimicrobianos mais usados nos Estados Unidos. Após a descoberta da minociclina em 1972, um longo tempo se passou sem que novas tetraciclinas fossem descobertas até que, no ano de 1993, as glicilciclinas foram sintetizadas como um derivado sintético da minociclina com amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo MRSA e VRE (PEREIRA-MAIA *et al.*, 2010; BENDER *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2022). Este composto é aprovado pelo FDA dos EUA para o tratamento de infecções da pele e tecidos moles e infecções abdominais (RUSU; BUTA, 2021). Semelhante a todas as tetraciclinas, a tigeciclina se liga ao rRNA 16S da subunidade 30S do ribossomo e inibe a associação do aminoacil-tRNA (BAUER *et al.*, 2004). Ao contrário de outras tetraciclinas, no entanto, as suas CIMs não são afetadas por determinantes típicos de resistência à tetraciclina (FLUIT *et al.*, 2005). Até hoje, existem poucos relatos publicados de resistência à tigeciclina em enterococos (CORDINA *et al.*, 2012; WERNER *et al.*, 2008; BENDER *et al.*, 2018).

As quinolonas constituem uma outra família de antimicrobianos, contendo uma estrutura central bicíclica relacionada ao composto 4-quinolona. Desde sua descoberta no início da década de 1960, ganharam importância crescente como terapias-chave para tratar infecções adquiridas na comunidade e IRAS graves. Seu mecanismo de ação ocorre por relaxamento do superenrolamento do DNA. As quinolonas têm, então, como alvo, duas das enzimas responsáveis por este processo: DNA girase e topoisomerase IV. Ambas as enzimas são tetrâmeras compostas por duas subunidades diferentes: GyrA e GyrB formam o complexo DNA girase, enquanto a topoisomerase IV é composta por ParC e ParE (PHAM, ZIORA, BLASKOVICH, 2019). A DNA girase causa superenrolamento negativo na fita de DNA, preparando-o para o início da replicação e

relaxando a fita na frente da polimerase em avanço. Por outro lado, a topoisomerase IV separa a dupla hélice de DNA entrelaçada recém-replicada, permitindo que a segregação ocorra antes da divisão celular. Ambos os processos requerem fita dupla de DNA aberta e a estabilização da enzima/DNA complexo, porém quinolonas resultam em uma interrupção da continuidade da fita e parada da replicação (HAWKEY, 2003; PHAM, ZIORA, BLASKOVICH, 2019). Há evidências de que há inibição diferencial dessas duas enzimas entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e graus variados de inibição entre os diferentes tipos de quinolonas (HAWKEY, 2003; OYAMADA *et al.*, 2006). Os enterococos demonstram baixos níveis de resistência intrínseca às quinolonas, mas podem adquirir resistência a níveis elevados através de vários mecanismos. Mutações nos genes-alvo, especificamente *gyrA* e *parC*, foram descritos em *E. faecium* e *E. faecalis* (LÓPEZ *et al.*, 2011; YASUFUKU *et al.*, 2011; TORRES *et al.*, 2018). Essas mudanças afetam as chamadas “regiões determinantes da resistência às quinolonas”, que presumivelmente alteram a afinidade de ligação do antimicrobiano. A expulsão do antimicrobiano do meio intracelular por bombas de efluxo é outro mecanismo bem descrito de resistência às quinolonas. Entre elas, NorA e PmrA foram implicadas na resistência a quinolonas em *S. aureus* e *Streptococcus pneumoniae* (HOOPER, 2000), e a primeira também foi descrita em *E. faecium* (HAWKEY, 2003). Um terceiro mecanismo de resistência, encontrado em *E. faecalis* (ARSÈNE; LECLERCQ, 2007) é mediado por *qnr* que codifica uma proteína com uma série de repetições de pentapeptídeos semelhantes aos codificados por genes de resistência a quinolonas transmitidos por plasmídeos descritos em *Enterobacteriaceae*. A presença desta proteína é capaz de proteger a DNA girase, diminuindo a ligação da quinolona ao DNA e a subsequente formação do complexo quinolona-girase (TRAN; JACOBY; HOOPER, 2005).

A contínua importância dos enterococos como agentes de infecções oportunistas de difícil tratamento devido à frequência e diversidades da resistência a antimicrobianos apresentada por esses microrganismos fundamenta a necessidade de seu rastreamento em diferentes regiões e períodos de tempo, sobretudo onde os dados disponíveis ainda são bastante limitados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar características fenotípicas e genotípicas de resistência aos antimicrobianos em amostras de *Enterococcus* isoladas de pacientes hospitalizados em duas instituições hospitalares no município de Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, no período que compreende os meses de outubro de 2017 a janeiro de 2020.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e avaliar a distribuição de espécies de *Enterococcus*, associadas a processos infecciosos ou colonização, isoladas de pacientes internados em duas unidades hospitalares de Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo;
- Avaliar a susceptibilidade a um painel de 18 antimicrobianos e caracterizar os perfis de multirresistência.
- Caracterizar os marcadores genéticos relacionados à resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos e aos glicopeptídeos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

Foram investigadas 152 amostras de *Enterococcus* isoladas de espécimes clínicos relacionados à infecção ou colonização, oriundas de dois hospitais do estado do Espírito Santo, denominados, neste estudo, de HE (n= 62) e SA (n=90). O hospital HE é referência no setor de cardiologia, e presta serviços de diagnóstico e tratamento de doenças cardiovasculares e também no setor da oncologia, enquanto o hospital SA é referência no setor de ortopedia e traumatologia. Ambos os hospitais deste estudo fornecem atendimento para o SUS, e possuem 129 e 217 leitos, respectivamente.

3.2 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras bacterianas foram isoladas e identificadas presuntivamente nos laboratórios de diagnóstico bacteriológico dos hospitais de origem, sendo posteriormente armazenadas em freezer, sob a forma de suspensões em solução contendo leite desnatado e glicerol a 10%. Para a ativação e obtenção das culturas bacterianas recentes utilizadas nos diferentes experimentos do presente estudo, as amostras foram inicialmente semeadas em meio de ágar sangue e incubadas por 18-24h a uma temperatura de $36\pm 1^\circ\text{C}$.

A confirmação da identificação foi realizada utilizando a técnica de MALDI-TOF. Para tal, a partir do crescimento recente obtido, uma colônia foi depositada, com a ajuda de uma haste de madeira, em uma placa de aço inoxidável polida e, logo após, o material foi coberto com 1µl da matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico). Em seguida, as amostras foram encaminhadas para análise no espectrômetro de massa, equipado com laser de 337 nm de nitrogênio no modo linear, e empregando o software, no modo automático. Os espectros de massas foram obtidos na faixa de 2.000 a 20.000 m/z e analisados com a assistência do software para identificação bacteriana, por meio de comparação dos espectros gerados para as amostras em estudo e os espectros já presentes em bancos de dados do sistema.

3.3 DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliada com auxílio da técnica de disco-difusão em ágar seguindo-se as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2022).

Foi testado um painel de 18 antimicrobianos para cada amostra, abrangendo o contingente de treze classes de antimicrobianos: β -lactâmicos (ampicilina 10 μ g e penicilina 10 μ g); ansamicinas (rifampicina 5 μ g); estreptograminas (quinupristina/dalfopristina 15 μ g); fluoroquinolonas (ciprofloxacina 5 μ g, norfloxacina 10 μ g e levofloxacina 5 μ g); fencóis (cloranfenicol 30 μ g); macrolídeos (eritromicina 15 μ g); fosfomicinas (fosfomicina 200 μ g); oxazolidinonas (linezolida 30 μ g); furantoínas (nitrofurantoína 300 μ g); tetraciclina (tetraciclina 30 μ g); glicopeptídeos (vancomicina 30 μ g e teicoplanina 30 μ g); glicilciclina (tigeciclina 15 μ g) e aminoglicosídeos em níveis elevados (gentamicina 120 μ g e estreptomicina 300 μ g).

Para a realização do teste, inicialmente foi feita a semeadura das amostras bacterianas em meio de ágar sangue, seguida de incubação por 18h-24h à temperatura de 36°C \pm 1. Posteriormente, foi preparado o inóculo em solução salina esterilizada (NaCl 0,85%) numa concentração correspondente a do padrão 0,5 da escala de turbidez de McFarland. Cada suspensão bacteriana foi semeada, de forma confluenta, na superfície de meio de ágar Müeller-Hinton, onde, em seguida, foram posicionados os discos de antimicrobianos. Posteriormente, as placas foram incubadas a 36 °C \pm 1 °C por 16h-18h, com a exceção dos glicopeptídeos, cujo período de incubação foi de 24h.

Os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados e interpretados de acordo com os pontos de corte determinados pelo CLSI (2022), permitindo a classificação das amostras como sensíveis, intermediárias ou resistentes e obtenção dos seus perfis de não-susceptibilidade aos diferentes antimicrobianos testados. As amostras que apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos foram classificadas como multirresistentes (MDR, do inglês *Multidrug resistant*).

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA E AMPLIFICAÇÃO DOS GENES ASSOCIADOS À RESISTENCIA A NÍVEIS ELEVADOS DE AMINOGLICOSÍDEOS E GLICOPEPTÍDEOS

Os DNAs bacterianos empregados nas reações em cadeia da polimerase (PCRs) do presente estudo foram obtidos através do procedimento descrito por Pinto *et al.* (2013), no qual uma alíquota de 1 μ l da suspensão bacteriana armazenada a -20 °C, foi semeada em meio de ágar sangue, incubada por 18-24h a uma temperatura de 36 \pm 1°C e, posteriormente, uma colônia foi repicada em meio e condições semelhantes. A partir desse crescimento, foi retirada uma alíquota, com ajuda de uma alça bacteriológica de 1 μ l, transferindo esse crescimento para microtubo estéril contendo 200 μ l de uma solução da resina 5% e 2 μ l de proteinase K.

A suspensão bacteriana obtida foi então homogeneizada e submetida à incubação por 1h a 50°C, seguida de uma nova homogeneização e incubação de 10 min a 95°C. Após, centrifugação a 12.000g por três minutos, o sobrenadante foi armazenado a -20 °C até ser usado como DNA molde para os testes.

Foram pesquisados genes associados à resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos e aos glicopeptídeos, através de amplificação por PCR, empregando oligonucleotídeos descritos no **Quadro 3**.

Quadro 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na pesquisa de genes associados à resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos e aos glicopeptídeos em *Enterococcus*

Antimicrobianos	Gene	Sequências iniciadoras 5'-3'	Produto (pb)	Referência
HLR-Ge ^a	<i>aac(6')-Ie--aph(2'')-Ia</i>	PAF: CAGAGCCTTGGGAAGATGAAG PAR: CTCGTGTAATTCATGTTCTGGC	348	Vakulenko <i>et al.</i> , 2003
	<i>aph(2'')-Ib</i>	PBF: CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC PBR: TTTGTAGCAATTCAGAAACACCCCTT	867	Vakulenko <i>et al.</i> , 2003
	<i>aph(2'')-Ic</i>	PCF: CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC PCR: CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG	444	Vakulenko <i>et al.</i> , 2003
	<i>aph(2'')-Id</i>	PDF: GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC PDR: CCTCTTCATACCAATCCATATAAACC	641	Vakulenko <i>et al.</i> , 2003
	<i>aph(3')-IIIa</i>	PEF: GGCTAAAATGAGAATATCACCGG PER: CTTTAAAAAATCATACAGCTCGCG	523	Vakulenko <i>et al.</i> , 2003
	<i>ant(4')-Ia</i>	PFF: AAAGTCTAAATCGGTAGAAGCC PFR: GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT	294	Vakulenko <i>et al.</i> , 2003
HLR-St ^b	<i>ant(6')-Ia</i>	F: ACTGGCTTAATCAATTTGGG R: GCCTTTCGCCACCTCACCG	577	Swenson <i>et al.</i> , 1995
	<i>ant(9')-Ia</i>	F: GGTCAGCAGTAAATGGTGGT R: TGCCACATTCGAGCTAGGGTT	476	Alam <i>et al.</i> , 2005
	<i>ant(9')-Ib</i>	F: CGTCGTATCTGAACCATTGACA R: TCCATAATGGCTCTTCTCAC	351	Alam <i>et al.</i> , 2005
	<i>ant(3')-Ia</i>	F: ACCGTAAGGCTTGATGAAACA R: GCCGACTACCTTGGTGATCTC	624	Leelaporn <i>et al.</i> , 2008
Vancomicina	<i>vanA</i>	GGGAAAACGACAATTGC EA2: GTACAATGCGGCCGTTA	732	Dutka-Malen <i>et al.</i> , 1995
	<i>vanB</i>	EB3: ACGGAATGGGAAGCCGA EB4: TGCACCCGATTTTCGTTC	642	Depardieu <i>et al.</i> , 2004

^aHLR-Ge, resistência a níveis elevados de gentamicina; ^bHLR-St, resistência a níveis elevados de estreptomicina; ^cpb, pares de base

Os genes relacionados à resistência a níveis elevados de estreptomicina foram pesquisados baseado no protocolo desenvolvido pelo grupo de pesquisa do laboratório, usando os iniciadores publicados para os genes *ant(6')-Ia* (SWENSON *et al.*, 1995), *ant(9')-Ia* e *ant(9')-Ib* (ALAM *et al.*, 2005) e *ant(3')-Ia* (LEELAPORN *et al.*, 2008).

Os controles positivos foram: *E. faecalis* ATCC 49533 para *ant(6')-Ia*, *E. faecium* Ca-6 para *ant(9')-Ia*, *E. faecalis* Fa-23 para *ant(9')-Ib* e *E. faecalis* F31C8 para *ant(3')-Ia*.

Os genes *ant(6')-Ia*, *ant(9')-Ia* e *ant(9')-Ib* foram investigados por PCR multiplex, em uma solução com volume final de 25µl, composta por: 2,5µl do extrato de DNA molde, 1x do tampão de PCR [10mM Tris, 50mM KCl (pH 8.3)], 3,0mM de cloreto de Magnésio (MgCl₂), 0,4mM de cada deoxinucleotídeotri-fosfatado e 1,25U da enzima *Taq* DNA polimerase. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizadas para amplificação dos genes pesquisados foram incluídas na reação na concentração de 0,2µM. Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador, com uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 10min, seguida de 30 ciclos a 94°C por 30s para desnaturação, uma etapa de anelamento a 55°C por 30s e uma etapa de extensão a 72°C por 30s. Logo após, foi realizada uma etapa de extensão final a 72°C por 10min.

A pesquisa do gene *ant(3')-Ia* foi feita através de PCR *uniplex*, em uma solução com o volume final de 50µl, composta de: 5,0µl do extrato de DNA molde, 1x do tampão de PCR [10mM Tris, 50mM KCl (pH 8.3)], 2,0mM de cloreto de Magnésio (MgCl₂), 0,25mM de cada deoxinucleotídeotri-fosfatado (Invitrogen) e 0,1U da enzima *Taq* DNA polimerase. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores foram incluídas na reação na concentração de 0,2µM. Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador, com uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 10min, seguida de 30 ciclos a 94°C por 30s para desnaturação, uma etapa de anelamento a 55°C por 30s e uma etapa de extensão a 72°C por 30s. Logo após, foi realizada uma etapa de extensão final a 72°C por 10min.

Os genes relacionados à resistência a níveis elevados de gentamicina e outros aminoglicosídeos foram determinados com o auxílio de PCR multiplex, pelo protocolo estabelecido por Vakulenko *et al.* (2003), porém com algumas modificações. Os genes pesquisados foram: *aac(6')-le-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id*, *aph(III')-IIIa* e *ant(4')-Ia*. A reação de volume final de 25µl foi composta de: 2,5µl de DNA molde, 1x PCR Buffer (Invitrogen), 1,5mM de cloreto de Magnésio [(MgCl₂) (Invitrogen)], 0,1mM de cada deoxinucleotídeotri-fosfatado (Invitrogen) e 2U da enzima Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram incluídos à reação nas seguintes concentrações: 0,4µM de *aac(6')-le-aph(2'')-Ia*, 0,48µM de *aph(2'')-Ib*, 0,07µM de *aph(2'')-Ic*, 0,1µM de *aph(2'')-Id*, 0,1µM de *aph(III')-IIIa* e 0,1µM de *ant(4')-Ia*.

Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador, com uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 min, 35 ciclos compostos de desnaturação a 94°C por 40s, anelamento a 55°C por 40s e extensão a 72°C por 40s. Logo após, foi realizada uma etapa de extensão final de um ciclo de 72°C por 2 min.

Os controles positivos nesse experimento foram: SF11770 para os genes *aph(2'')-Ib*, *aph(III')-IIIa* e *aph(2'')-Ic*; SF9117 para o gene *aph(2'')-Ic*; SF11300 para o gene *aph(2'')-Ide* a MBO4541E para o gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*.

A presença do gene *vanA*, que codifica a resistência à vancomicina e teicoplanina, foi determinada com o auxílio de reação em cadeia da polimerase, utilizando oligonucleotídeos iniciadores determinados por Dutka-Malen *et al.* (1995). O gene *vanB* foi pesquisado usando os oligonucleotídeos iniciadores determinados por Depardieu *et al.* (2004). Foram feitas duas PCR uniplex, distintas pelo par de sequências iniciadoras usadas, em solução com o volume final de 50µl, composta de: 4µl do DNA molde, 1x do tampão de PCR, 1,5mM de cloreto de Magnésio (MgCl₂), 0,1mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado e 0,8U de *Taq* DNA polimerase. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores foram incluídas na reação na concentração de 0,4µM. Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador para ambas as reações, com uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 2 min, 35 ciclos a 94°C por 50s para desnaturação, 55°C por 30s para anelamento e 72°C por 1 min para extensão, na qual foi feita em um ciclo a 72°C por 10min.

O controle positivo para o gene *vanA* utilizado foi a amostra *E. faecalis* A256, portadora do gene *vanA*, e a amostra *E. faecalis* V583 como controle negativo. Já para o gene *vanB*, a amostra *E. faecalis* V583, portadora do gene *vanB*, foi usada como controle positivo, e a amostra *E. faecalis* A256 como controle negativo.

Após amplificação, foi utilizado tampão TBE 0.5X para a eletroforese em gel de agarose sob uma corrente constante de 100V, promovendo a migração/separação dos produtos que, em seguida, foram tratados com brometo de etídio 0.5µg/ml por 20 min, e observados em transluminador sob luz ultravioleta (UV).

4 RESULTADOS

4.1 AMOSTRAGEM

Os resultados aqui apresentados são derivados das análises realizadas a partir de 152 amostras de *Enterococcus* isoladas de pacientes hospitalizados na cidade de Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo. As amostras foram provenientes de duas instituições hospitalares denominadas, no estudo, de HE (n=62/152; 41%) e SA (n=90/152; 59%), no período de outubro de 2017 a janeiro de 2020. Dentre as 62 amostras do hospital HE, originadas de diferentes fontes de isolamento, apenas uma amostra era de colonização, enquanto que das 90 amostras do hospital SA, 30 foram oriundas de colonização (33%) e 60 de infecção (67%). A **Figura 1** representa a distribuição das amostras conforme a classificação da fonte de isolamento em infecção ou colonização e as instituições de origem.

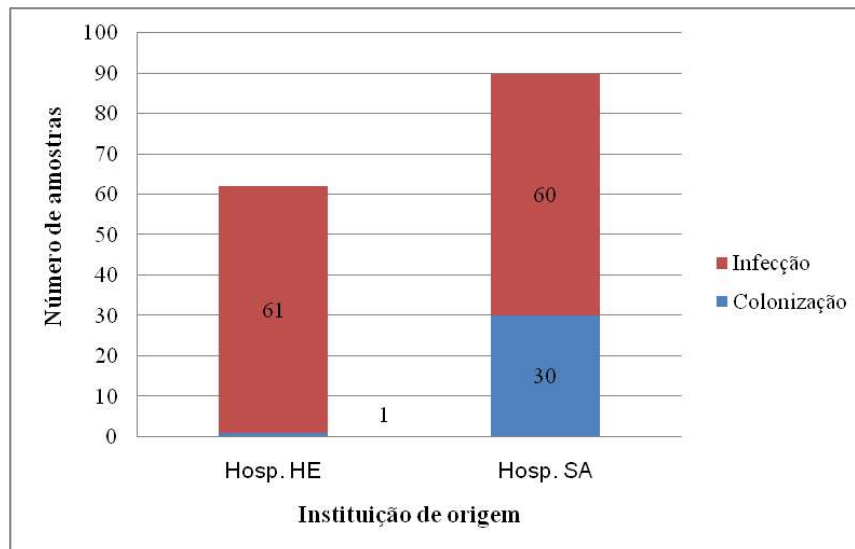


Figura 1. Distribuição das amostras de *Enterococcus* de acordo com a fonte de isolamento (infecção e colonização) e a instituição de origem

A **Tabela 1** apresenta a distribuição das amostras de acordo com a fonte de isolamento e com o hospital de origem. No hospital HE, amostras isoladas na urina foram as mais frequentes (n=31/62; 50%), seguidas por sangue (n=18/62; 29%). As demais fontes de isolamento incluíram: secreções/fluidos diversos (n=11/62; 17,7%); ponta de cateter e swab retal (n=1; 1,6% cada). No hospital SA, amostras de colonização (swab retal), juntamente com amostras isoladas de urina foram as mais frequentes, ambas compreendendo 33,3% (n=30/90). Outras fontes de isolamento

foram: sangue (n=9/90; 10%); secreções/fluidos diversos (n=6/90; 6,7%); e fragmentos teciduais, incluindo-se, também, fragmentos ósseos (n=15/90; 16,7%).

Tabela 1. Distribuição das amostras de *Enterococcus* de acordo com a fonte de isolamento e a instituição de origem

Fonte de isolamento	Amostragem HE n (%)	Amostragem SA n (%)	Total n (%)
Sangue	18 (29%)	9 (10%)	27 (17,8%)
Ponta cateter	1 (1,6%)	-	1 (0,6%)
Secreções*	11 (17,7%)	6 (6,7%)	17 (11,2%)
Swab retal	1 (1,6%)	30 (33,3%)	31 (20,4%)
Urina	31 (50%)	30 (33,3%)	61 (40,1%)
Fragmentos teciduais*	-	15 (16,7%)	15 (9,9%)
Total	62	90	152

-, ausência; *, diferentes sítios.

As 152 amostras incluídas neste estudo tiveram sua identificação confirmada por meio da técnica de MALDI-TOF MS, sendo *E. faecalis* a espécie mais frequente (n=130;85,6%) seguida de *E. faecium* (n=18;11,8%), *E. avium* (n=2;1,4%), e *E. gallinarum* e *E. hirae*, ambas representadas por uma amostra, cada.

A espécie *E. faecalis* foi a mais frequente nas duas instituições hospitalares investigadas, correspondendo a 91,9% (n=57/62) das amostras obtidas no HE e 81,2% (n=73/90) no hospital SA, seguida de *E. faecium* 4,9% (n=3/62) e 16,6% (n=15/90), respectivamente. Duas amostras de *E. avium* foram identificadas, sendo uma no hospital HE e outra no SA. *E. gallinarum* foi observada apenas no hospital AS (n=1; 1,1%) e *E. hirae* apenas no HE (n=1; 1,6%) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Distribuição das amostras de *Enterococcus* de acordo com a espécie e a instituição de origem

Espécies	Amostragem HE n (%)	Amostragem AS n (%)	Amostragem HE+SA n (%)
<i>E. faecalis</i>	57 (91,9%)	73 (81,2%)	130 (85,6%)
<i>E. faecium</i>	3 (4,9%)	15 (16,6%)	18 (11,8%)
<i>E. avium</i>	1 (1,6%)	1 (1,1%)	2 (1,4%)
<i>E. gallinarum</i>	-	1 (1,1%)	1 (0,6%)
<i>E. hirae</i>	1 (1,6%)	-	1 (0,6%)
Total	62	90	152

-, ausência

A **Tabela 3** apresenta a correlação da fonte de isolamento das 152 amostras com as espécies identificadas. As 130 amostras da espécie *E. faecalis* foram isoladas de diferentes espécimes clínicos, com maior número de amostras isoladas de urina (n=55;42,2%), seguido de sangue (n=23;17,7%) e swab retal (n=23;17,7%), secreções (n=14;10,8%), fragmentos (n=14;10,8%), e ponta de cateter (n=1;0,8%). Já, as 18 amostras da espécie *E. faecium* foram isoladas de swab retal (n=8;44,4%), seguido de urina (n=6;33,4%), de sangue (n=3;16,6%) e uma amostra de secreção. As duas amostras de *E. avium* foram isoladas de secreção e fragmento. *E. gallinarum* foi obtida de secreção e *E. hirae* de sangue.

Tabela 3. Distribuição das espécies de *Enterococcus* de acordo com as fontes de isolamento

Espécies	Fontes de isolamento						Total (n=152)
	Urina (n=61)	Sangue (n=27)	Fragmento* (n=15)	Secreções* (n=17)	Ponta De Cateter (n=1)	Swab retal (n=31)	
<i>E. faecalis</i>	55 (42,2%)	23 (17,7%)	14 (10,8%)	14 (10,8%)	1 (0,8%)	23 (17,7%)	130 (100%)
<i>E. faecium</i>	6 (33,4%)	3 (16,6%)	-	1 (5,6%)	-	8 (44,4%)	18 (100%)
<i>E. avium</i>	-	-	1 (50%)	1 (50%)	-	-	2 (100%)
<i>E. gallinarum</i>	-	-	-	1 (100%)	-	-	1 (100%)
<i>E. hirae</i>	-	1 (100%)	-	-	-	-	1 (100%)

-, ausência; *, diferentes sítios.

4.2 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Os resultados dos testes de susceptibilidade aos 18 antimicrobianos, realizados com as 152 amostras incluídas no presente trabalho, considerando os critérios de interpretação do CLSI (2022), estão apresentados na **Tabela 4**.

Percentuais de resistência elevados foram observados para: quinupristina/dalfopristina 80,3% (n=122), tetraciclina 67,8% (n=103), eritromicina 61,8% (n=94), norfloxacin 46,7% (n=71), ciprofloxacina 46,1% (n=70), levofloxacina 46,1% (n=70), vancomicina 35,5% (n=54), gentamicina 34,9% (n=53), teicoplanina 33,6% (n=51), cloranfenicol 32,9% (n=50), rifampicina 27% (n=41), penicilina 25,7% (n=39), estreptomicina 25% (n=38), nitrofurantoína 12,5% (n=19), ampicilina 11,8%

(n=18). A maioria das amostras foi sensível à tigeciclina 99,3% (n=151), fosfomicina 97,4% (n=148) e linezolida 94,1% (n=143).

Tabela 4. Susceptibilidade a 18 antimicrobianos entre 152 amostras de *Enterococcus* isoladas de pacientes hospitalizados em instituições localizadas no município de Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo

Antimicrobianos	Categoria de susceptibilidade aos antimicrobianos n (%)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	134 (88,2%)	-	18 (11,8%)
Ciprofloxacina	48 (31,6%)	34 (22,4%)	70 (46,1%)
Cloranfenicol	101 (66,4%)	1 (0,7%)	50 (32,9%)
Eritromicina	22 (14,5%)	36 (23,7%)	94 (61,8%)
Estreptomicina	111 (73%)	3 (2,0%)	38 (25%)
Fosfomicina	148 (97,4%)	4 (2,6%)	-
Gentamicina	97 (63,8%)	2 (1,3%)	53 (34,9%)
Levofloxacina	81 (53,3%)	1 (0,7%)	70 (46,1%)
Linezolida	143 (94,1%)	6 (3,9%)	3 (2%)
Nitrofurantoína	125 (82,2%)	8 (5,3%)	19 (12,5%)
Norfloxacina	73 (48%)	8 (5,3%)	71 (46,7%)
Penicilina	113 (74,3%)	-	39 (25,7%)
Quinupristina/Dalfopristina	26 (17,1)	4 (2,6%)	122 (80,3%)
Rifampicina	97 (63,8%)	14 (9,2%)	41 (27%)
Teicoplanina	99 (65,1%)	2 (1,3%)	51 (33,6%)
Tetraciclina	48 (31,6%)	1 (0,7%)	103 (67,8%)
Tigeciclina	151 (99,3%)	-	1 (0,7%)
Vancomicina	91 (59,9%)	7 (4,6%)	54 (35,5%)

-, ausência.

Algumas amostras apresentaram resultados na categoria de susceptibilidade intermediária, em relação aos seguintes antimicrobianos: eritromicina 23,7% (n=36), ciprofloxacina 22,4% (n=34), rifampicina 9,2% (n=14), nitrofurantoína 5,3% (n=8), norfloxacina 5,3% (n=8), vancomicina 4,6% (n=7), linezolida 3,9% (n=6), fosfomicina 2,6% (n=4), quinupristina/dalfopristina 2,6% (n=4), estreptomicina 2,0% (n=3), cloranfenicol, tetraciclina e levofloxacina, todas com 0,7% (n=1).

Conforme observado na **Tabela 5**, as amostras de *E. faecalis* (n=130) apresentaram frequências elevadas de resistência aos seguintes antimicrobianos: tetraciclina 71,6% (n=93) e eritromicina 57,6% (n=75). A maioria das amostras foi sensível a: fosfomicina 96,9% (n=126), linezolida 93,1% (n=121), nitrofurantoína 90% (n=117), penicilina 83,8% (n=109), estreptomicina 78,4% (n=102), teicoplanina e rifampicina, ambas com 71,6% (n=93), vancomicina 66,2% (n=86), gentamicina 62,4%

(n=81), cloranfenicol 60,8% (n=79), levofloxacina 59, 2% (n=77) e norfloxacina 53,1% (n=69). Todas as amostras foram sensíveis a ampicilina e tigeciclina. A resistência à quinupristina/dalfopristina é intrínseca à espécie e o percentual de amostras na categoria sensível 10,7% (n=14) é incomum.

Tabela 5. Susceptibilidade a 18 antimicrobianos entre 130 amostras de *E. faecalis* isoladas de pacientes hospitalizados em instituições localizadas no município de Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo

Antimicrobianos	Categoria de susceptibilidade aos antimicrobianos		
	n (%)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	130 (100%)	-	-
Ciprofloxacina	44 (33,8%)	34 (26,2%)	52 (40%)
Cloranfenicol	79 (60,8%)	1 (0,8%)	50 (38,4%)
Eritromicina	19 (14,8%)	36 (27,6%)	75 (57,6%)
Estreptomicina	102 (78,4%)	1 (0,8%)	27 (20,8%)
Fosfomicina	126 (96,9%)	4 (3,1%)	-
Gentamicina	81 (62,4%)	-	49 (37,6%)
Levofloxacina	77 (59,2%)	1 (0,8%)	52 (40%)
Linezolida	121 (93,1%)	6 (4,6%)	3 (2,3%)
Nitrofurantoína	117 (90%)	6 (4,6%)	7 (5,4%)
Norfloxacina	69 (53,1%)	8 (6,2%)	53 (40,7%)
Penicilina	109 (83,8%)	-	21 (16,2%)
Quinupristina\Dalfofpristina*	14 (10,7%) *	4 (3,1%)	112 (86,2%)
Rifampicina	93 (71,6%)	12 (9,2%)	25 (19,2%)
Teicoplanina	93 (71,6%)	2 (1,5%)	35 (26,9%)
Tetraciclina	36 (27,6%)	1 (0,8%)	93 (71,6%)
Tigeciclina	130 (100%)	-	-
Vancomicina	86 (66,2%)	7 (5,4%)	37 (28,4%)

*, resultado incomum para espécie; -, ausência.

Todas as 18 amostras de *E. faecium* apresentaram resistência aos seguintes antimicrobianos: ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina, levofloxacina, norfloxacina e penicilina (**Tabela 6**). Percentuais elevados de resistência foram também observados com relação a: vancomicina 94,4% (n=17); rifampicina, teicoplanina 88,8% (n=16); nitrofurantoína 66,6% (n=12); estreptomicina 61,1% (n=11) e quinupristina/dalfopristina 55,6% (n=10).

Tabela 6. Susceptibilidade a 18 antimicrobianos entre 18 amostras de *E. faecium* isoladas de pacientes hospitalizados em instituições localizadas no município de Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo

Antimicrobianos	Categoria de susceptibilidade aos antimicrobianos		
	n (%)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	-	-	18 (100%)
Ciprofloxacina	-	-	18 (100%)
Cloranfenicol	18 (100%)	-	-
Eritromicina	-	-	18 (100%)
Estreptomicina	5 (27,7%)	2 (11,2%)	11 (61,1%)
Fosfomicina	18 (100%)	-	-
Gentamicina	13 (72,2%)	2 (11,2%)	3 (16,6%)
Levofloxacina	-	-	18 (100%)
Linezolida	18 (100%)	-	-
Nitrofurantoína	4 (22,2%)	2 (11,2%)	12 (66,6%)
Norfloxacina	-	-	18 (100%)
Penicilina	-	-	18 (100%)
Quinupristina\Dalofopristina	8 (44,4%)	-	10 (55,6%)
Rifampicina	-	2 (11,2%)	16 (88,8%)
Teicoplanina	2 (11,2%)	-	16 (88,8%)
Tetraciclina	10 (55,6%)	-	8 (44,4%)
Tigeciclina	17 (94,4%)	-	1 (5,6%)
Vancomicina	1 (5,6%)	-	17 (94,4%)

-, ausência.

As duas amostras de *E. avium* foram suscetíveis à maioria dos antimicrobianos testados: ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, estreptomicina, fosfomicina, gentamicina, levofloxacina, linezolida, nitrofurantoína, norfloxacina, penicilina, quinupristina/dalofopristina, rifampicina, teicoplanina, tigeciclina e vancomicina; com exceção dos seguintes antibióticos, aos quais apresentaram resistência: eritromicina (uma amostra) e tetraciclina (duas amostras).

A única amostra de *E. hirae* apresentou resistência apenas ao antibiótico gentamicina e susceptibilidade a todos os demais antimicrobianos testados.

Das 152 amostras do gênero *Enterococcus* que constituem a amostragem deste estudo, 93 (61,2%) apresentaram multirresistência aos antimicrobianos. Quando analisamos, conforme as espécies, todas as 18 amostras de *E. faecium* foram classificadas como multirresistentes, apresentando 14 perfis de não-susceptibilidade diferentes, que podem ser visualizadas na **Tabela 7**. Em relação às amostras de *E.*

Faecalis, 76 (58,4%) exibiram multirresistência e foram distribuídas em 42 perfis de não-susceptibilidade distintos.

Tabela 7. Antibiotipos identificados entre 93 amostras de *Enterococcus* classificadas como multirresistentes, de acordo com a espécie

Perfil de Não Susceptibilidade	Nº	ESPÉCIE
CIP ^R , CLO ^R , ERI ^R , GEN ^R , LEV ^R , NOR ^R , PEN ^R , QD ^R , TEI ^R , TET ^R , VAN ^R	2	<i>E. faecalis</i>
CLO ^R , ERI ^R , QD ^R , RIF ^R	1	
CIP ^I , CLO ^R , ERI ^R , EST ^R , QD ^R , TET ^R	2	
CIP ^I , ERI ^R , EST ^I , QD ^R , TEI ^I , TET ^R , VAN ^I	1	
CIP ^I , ERI ^R , EST ^R , LEV ^I , NIT ^I , NOR ^R , QD ^R , TET ^R	1	
CIP ^I , ERI ^R , EST ^R , QD ^R , TET ^R	1	
CIP ^I , ERI ^R , GEN ^R , NIT ^I , NOR ^R , QD ^R	1	
CIP ^R , CIP ^R , EST ^R , LEV ^R , LNZ ^I , NOR ^R , QD ^R , RIF ^R , TET ^R , VAN ^I	1	
CIP ^R , CLO ^I , ERI ^R , EST ^R , GEN ^R , LEV ^R , NOR ^R , QD ^R , RIF ^R , TET ^R	1	
CIP ^R , CLO ^R , ERI ^R , EST ^R , GEN ^R , LEV ^R , NIT ^R , NOR ^R , PEN ^R , QD ^R	1	
CIP ^R , CLO ^R , ERI ^R , EST ^R , GEN ^R , LEV ^R , NIT ^R , NOR ^R , PEN ^R , QD ^R , RIF ^R , TEI ^R , TET ^R , VAN ^R	1	
CIP ^R , CLO ^R , ERI ^R , EST ^R , GEN ^R , LEV ^R , NOR ^R	1	
CIP ^R , CLO ^R , ERI ^R , EST ^R , GEN ^R , LEV ^R , NOR ^R , PEN ^R , QD ^R , TEI ^R , TET ^R , VAN ^R	1	
CIP ^R , CLO ^R , ERI ^R , EST ^R , GEN ^R , LEV ^R , NOR ^R , QD ^R , TEI ^R , TET ^R , VAN ^R	1	
CIP ^R , CLO ^R , ERI ^R , EST ^R , LEV ^R , LNZ ^I , NIT ^R , NOR ^R , QD ^R , TET ^R	1	
CIP ^R , CLO ^R , ERI ^R , FOS ^I , GEN ^R , LEV ^R , NOR ^R , PEN ^R , QD ^R , TEI ^R , TET ^R , VAN ^R	2	
CIP ^R , CLO ^R , ERI ^R , GEN ^R , LEV ^R , NIT ^I , NOR ^R , QD ^R , TEI ^R , TET ^R , VAN ^R	1	
CIP ^R , CLO ^R , ERI ^R , GEN ^R , LEV ^R , NIT ^R , NOR ^R , PEN ^R , QD ^R , RIF ^R , TEI ^R , TET ^R , VAN ^R	1	
CIP ^R , CLO ^R , ERI ^R , GEN ^R , LEV ^R , NIT ^R , NOR ^R , QD ^R , RIF ^R , TEI ^R , TET ^R , VAN ^R	1	
CIP ^R , CLO ^R , ERI ^R , GEN ^R , LEV ^R , NOR ^R , PEN ^R , QD ^R	1	
CIP ^R , CLO ^R , ERI ^R , GEN ^R , LEV ^R , NOR ^R , PEN ^R , QD ^R , TEI ^R , TET ^R , VAN ^R	9	
CIP ^R , CLO ^R , ERI ^R , GEN ^R , LEV ^R , NOR ^R , QD ^R , TEI ^R , TET ^R , VAN ^R	7	
CIP ^R , CLO ^R , ERI ^R , GEN ^R , LEV ^R , NOR ^R , QD ^R , TET ^R	3	
CIP ^R , CLO ^R , ERI ^R , GEN ^R , LEV ^R , QD ^R , TEI ^R , TET ^R , VAN ^R	1	
CIP ^R , CLO ^R , ERI ^R , GEN ^R , NOR ^R , PEN ^R , QD ^R , TEI ^R , TET ^R , VAN ^R	4	
CIP ^R , CLO ^R , ERI ^R , LEV ^R , NIT ^R , NOR ^R , QD ^R , TEI ^R , TET ^R , VAN ^R	1	
CIP ^R , CLO ^R , ERI ^R , LEV ^R , NOR ^R , QD ^R , TEI ^R , TET ^R , VAN ^R	1	
CIP ^R , CLO ^R , GEN ^R , LEV ^R , NOR ^R , PEN ^R , QD ^R , TEI ^R , TET ^R , VAN ^R	1	
CIP ^R , CLO ^R , LEV ^R , NOR ^R , PEN ^R , QD ^R , TEI ^R , TET ^R , VAN ^R	1	
CIP ^R , ERI ^I , LEV ^R , NIT ^I , NOR ^R , QD ^R , TET ^R	1	
CIP ^R , ERI ^R , EST ^R , GEN ^R , LEV ^R , NOR ^R , QD ^R , TET ^R	1	
CIP ^R , ERI ^R , EST ^R , GEN ^R , LEV ^R , NOR ^R , TET ^R	1	
CIP ^R , ERI ^R , GEN ^R , LEV ^R , NOR ^R , QD ^R , RIF ^I , TET ^R	1	
CIP ^R , ERI ^R , GEN ^R , LEV ^R , NOR ^R , QD ^R , TET ^R	3	
CIP ^R , ERI ^R , LEV ^R , NOR ^R , QD ^R , TET ^R	1	
CLO ^R , ERI ^R , EST ^R , QD ^R , RIF ^I , TET ^R	2	

Continuação Tabela 7

Perfil de Não Susceptibilidade	Nº	ESPÈCIE
CLO ^R , ERI ^R , EST ^R , QD ^R , TET ^R	3	
ERI ^R , EST ^R , GEN ^R , LNZ ^R , QD ^R , RIF ^R , TET ^R , VAN ^I	1	
ERI ^R , EST ^R , QD ^I , TET ^R	1	
ERI ^R , EST ^R , QD ^R , TET ^R	4	
ERI ^R , GEN ^R , QD ^R , TET ^R	1	
ERI ^R , LNZ ^I , NIT ^I , QD ^R , RIF ^R , TET ^R	1	
ERI ^R , QD ^R , RIF ^I , TET ^R	1	
GEN ^R , LNZ ^R , NOR ^I , QD ^R , RIF ^R , TET ^R , VAN ^I	1	
LNZ ^I , NOR ^R , QD ^R , RD ^I , TET ^R , VAN ^R	1	
AMP, CIP, ERI, EST, LEV, NOR, PEN, QD, RIF, TEI, TET, VAN	1	<i>E. faecium</i>
AMP ^R , CIP ^R , ERI ^R , EST ^I , GEN ^I , LEV ^R , NIT ^R , NOR ^R , PEN ^R , RIF ^I , TEI ^R , VAN ^R	1	
AMP ^R , CIP ^R , ERI ^R , EST ^I , GEN ^I , LEV ^R , NIT ^R , NOR ^R , PEN ^R , RIF ^R , TEI ^R , VAN ^R	1	
AMP ^R , CIP ^R , ERI ^R , EST ^R , GEN ^R , LEV ^R , NIT ^I , NOR ^R , PEN ^R , QD ^R , RIF ^R , TEI ^R , VAN ^R	1	
AMP ^R , CIP ^R , ERI ^R , EST ^R , GEN ^R , LEV ^R , NIT ^R , NOR ^R , PEN ^R , RIF ^I , TEI ^R , VAN ^R	1	
AMP ^R , CIP ^R , ERI ^R , EST ^R , GEN ^R , LEV ^R , NOR ^R , PEN ^R , QD ^R , RIF ^R , TEI ^R , TET ^R , VAN ^R	1	
AMP ^R , CIP ^R , ERI ^R , EST ^R , GEN ^R , LEV ^R , NOR ^R , PEN ^R , QD ^R , RIF ^R , TEI ^R , VAN ^R	1	
AMP ^R , CIP ^R , ERI ^R , EST ^R , LEV ^R , NIT ^R , NOR ^R , PEN ^R , QD ^R , RIF ^R , TEI ^R , TET ^R , TET ^R , VAN ^R	1	
AMP ^R , CIP ^R , ERI ^R , EST ^R , LEV ^R , NIT ^R , NOR ^R , PEN ^R , QD ^R , RIF ^R , TEI ^R , TET ^R , TIG ^R , TET ^R , VAN ^R	1	
AMP ^R , CIP ^R , ERI ^R , EST ^R , LEV ^R , NIT ^R , NOR ^R , PEN ^R , QD ^R , RIF ^R , TEI ^R , TET ^R , VAN ^R	4	
AMP ^R , CIP ^R , ERI ^R , LEV ^R , NIT ^R , NOR ^R , PEN ^R , RIF ^R , TEI ^R , VAN ^R	1	
AMP ^R , CIP ^R , ERI ^R , LEV ^R , NIT ^R , NOR ^R , PEN ^R , RIF ^R , VAN ^R	1	
AMP ^R , CIP ^R , ERI ^R , LEV ^R , NOR ^R , PEN ^R , RIF ^I	1	
AMP ^R , CIP ^R , ERI ^R , LEV ^R , NOR ^R , PEN ^R , RIF ^R , TEI ^R , VAN ^R	2	

R: resistente; I: intermediária; AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina; CLO: cloranfenicol; ERI: eritromicina; EST: estreptomicina; FOS: fosfomicina; GEN: gentamicina; LEV: levofloxacina; NIT: nitrofurantoína, NOR: norfloxacina; PEN: penicilina; QD: quinupristina/dalfopristina; RIF: rifampicina; TEI: teicoplanina; TET: tetraciclina e VAN: vancomicina.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA AOS GLICOPEPTÍDEOS E A NÍVEIS ELEVADOS DE AMINOGLICOSÍDEOS

4.3.1 DETECÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA AOS GLICOPEPTÍDEOS

Para a pesquisa de genes que conferem resistência aos glicopeptídeos, 52 amostras foram selecionadas por apresentarem características fenotípicas no teste de susceptibilidade aos glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina. Considerando a

distribuição do gene *vanA*, de acordo com o hospital (**Tabela 8**), 9,6% (n=5/52) das amostras portadoras desse gene foram isoladas em pacientes hospitalizados no HE e 90,4% (n=47/52) no SA. Em relação às espécies, 5,8% (n=3/52) em *E. faecalis* e 3,8% (n=2/52) em *E. faecium* no hospital HE, enquanto que, no hospital SA, os percentuais de amostras portadoras de *vanA* foram mais expressivos em ambas as espécies: 61,6% (n=32/52) em *E. faecalis* e 28,8% (n=15/52) em *E. faecium*. Duas amostras (3,8%) resistentes a vancomicina, e portadoras do gene *vanA*, se apresentaram como sensíveis ou intermediárias ao antimicrobiano teicoplanina.

Tabela 8. Distribuição do gene *vanA* em 52 amostras de *Enterococcus* com fenótipo de resistência aos glicopeptídeos, de acordo com a espécie e a instituição de origem

Espécies	Gene <i>vanA</i> associado à resistência aos glicopeptídeos n (%)		
	Amostragem HE	Amostragem SA	Total
<i>E. faecalis</i>	3 (5,8%)	32 (61,6%)	35 (67,4%)
<i>E. faecium</i>	2 (3,8%)	15 (28,8%)	17 (32,6%)

-, ausência; *

4.3.2 DETECÇÃO DE GENES ASSOCIADOS A RESISTÊNCIA A NÍVEIS ELEVADOS DE GENTAMICINA E OUTROS AMINOGLICOSÍDEOS

Foram selecionadas 54 amostras que apresentaram características fenotípicas de resistência a gentamicina. Todas as 54 amostras apresentaram o gene da enzima bifuncional, o *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (**Tabela 9**). Além disso, 20,2% (n=11) amplificaram para o gene *aph(3')IIIa* que confere resistência aos aminoglicosídeos amicacina e canamicina. Todas as amostras foram negativas para amplificação dos genes *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id* e *ant(4')-Ia*.

Considerando a distribuição dos genótipos de resistência a níveis elevados de gentamicina e demais aminoglicosídeos, de acordo com o hospital (**Tabela 9**), 22,2% (n=12/54) das amostras que amplificaram para o gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* foram isoladas no HE, e 77,8% (n=42/54) no SA. Em relação às espécies por instituição hospitalar, 18,6% (n=10/54) de *E. faecalis* no HE e 1 amostra de *E. faecium* e outra de *E. hirae*. No hospital SA, foram 70,6% (n=34/54) de *E. faecalis* e 7,4% (n=4/54) de *E. faecium*.

Tabela 9. Distribuição dos genótipos associados a resistências a níveis elevados de gentamicina e demais aminoglicosídeos *, de acordo com a origem e a espécie

Origem	Espécies	Genótipos de resistência n (%)	
		<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*</i> * (Bifuncional)	<i>aph(3')IIIa*</i>
HE	<i>E. faecalis</i>	10 (18,6%)	4 (7,4%)
	<i>E. Faecium</i>	1 (1,8%)	1 (1,8%)
	<i>E. hirae</i>	1 (1,8%)	-
AS	<i>E. faecalis</i>	38 (70,4%)	3 (5,5%)
	<i>E. faecium</i>	4 (7,4%)	3 (5,5%)

-, ausência; *, exceto estreptomicina; **, confere resistência a amicacina e canamicina.

No que diz respeito à resistência a estreptomicina, foram selecionadas 38 amostras que apresentaram características fenotípicas de resistência a este antimicrobiano, entre as quais 33 amostras (86,8%) apresentaram o gene *ant(6')* (**Tabela 10**). Todas as amostras foram negativas para amplificação dos genes *ant(3')-Ia*, *ant(9')-Ia*, *ant(9')-Ib*.

Considerando a distribuição dos genes de resistência a níveis elevados de estreptomicina de acordo com o hospital (**Tabela 10**), 36,4% (n=12/33) das amostras que amplificaram *ant(6')* foram isoladas no HE, enquanto 63,6% (n=21/33) no SA. Em relação às espécies que apresentaram essa característica, de acordo com a instituição hospitalar, no Hospital HE, todas as amostras isoladas (n=12) foram identificadas como da espécie *E. faecalis*. Já no hospital SA, foram identificadas dez amostras de *E. faecalis* carregando o gene *ant(6')* e onze amostras de *E. faecium*.

Tabela 10. Distribuição do genótipo associado à resistência a níveis elevados de estreptomicina *, de acordo com a origem e a espécie

Origem	Espécies	Genótipo de resistência n (%)
		<i>ant(6')</i>
HE	<i>E. faecalis</i>	12 (36,4%)
	<i>E. faecalis</i>	10 (30,3%)
SA	<i>E. faecium</i>	11 (33,3%)

5 DISCUSSÃO

Os dados apresentados, neste estudo, indicam que a maior parte das amostras de *Enterococcus* foram obtidas de sítios representativos de processos infecciosos, em detrimento da colonização. Foi observado também os isolados de sítos clínicos decorrentes a colonização associados com VRE foram superiores no hospital SA em comparação com hospital HE, e sendo a maior parte presente nas espécimes de *E. Faecalis* em comparação com *E. Faecim*. É preciso notar que a colonização bacteriana refere-se à presença de bactérias em um determinado local do organismo sem provocar resposta ativa do hospedeiro à sua presença, sendo que a microbiota residente tem um papel fundamental na manutenção e saúde do organismo (KUSAHARA *et al.*, 2012). Durante o nascimento, o bebê vem de um ambiente estéril e entra em contato com uma variedade de microrganismos que irão colonizar suas superfícies e desempenhar diversas funções. O contato inicial com essa microbiota estimula o desenvolvimento das funções do trato gastrointestinal, dos movimentos peristálticos, além de auxiliar na degradação de polissacarídeos e a ocupação desse nicho que impede a colonização por microrganismos patogênicos (TAMBURINI *et al.*, 2016). Já, em relação ao sistema imune, os microrganismos colonizadores atuam como indutores da maturação de todo o sistema imune, promovendo a capacidade de reconhecer patógenos e desenvolver uma resposta protetora contra eles (BELKAID; HAND, 2014). Os enterococos são microrganismos que se tornaram colonizadores altamente adaptados ao trato digestivo, tendo características de comensais intestinais que são refletidas pelo fato de colonizar esse sítio em diversos organismos, desde insetos até humanos. Porém, após a antibioticoterapia do hospedeiro, os enterococos exploram sua resistência antibiótica intrínseca e adquirida para proliferar no TGI, levando ao domínio da comunidade do TGI e potencial disseminação para órgãos extra-intestinais, onde podem causar infecções com risco de vida. Sendo assim, os enterococos apresentam um papel oportunista, no qual sua proficiência na colonização do TGI os posiciona para explorar efetivamente a disbiose ecológica resultante da intervenção iatrogênica, facilitando a transição para um estado patogênico (BANLA; SALZMAN; KRISTICH, 2019). Os protocolos usados para identificar microrganismos que colonizam são compostos pela realização de cultura de vigilância em pacientes/unidades de alto risco para colonização por MDR: UTI, unidades com altas taxas de MDR, pacientes com histórico de exposição a antibióticos, internação prolongada, oncohematológicos, transplantados, contato com outros pacientes colonizados, pacientes transferidos de outras instituições conhecidas por terem alta prevalência de MDR, histórico de hospitalização recente ou internações em instituições de longa permanência para idosos. Os sítios de coleta variam

de acordo com o MDR de interesse, tais como: MRSA, swab de ambas as cavidades nasais, podendo-se também coletar swab da orofaringe, perianal e de feridas; VRE: cultura de fezes, swab retal ou perianal; Enterobactérias: swab perianal ou retal; *Acinetobacter* e *Pseudomonas aeruginosa*: região orofaríngea, endotraqueal, retal, inguinal ou de ferida (BRASIL, 2021).

Avaliando-se isolados de swab retal foi possível observar a predominância de *E. faecalis* em relação a *E. faecium*, assim como quantitativo entre os hospitais, o que pode estar relacionado com as rotinas de controle de vigilância, que são fundamentais para uma detecção rápida e precisa de pacientes colonizados por VRE. Ao que se sabe, no hospital SA foram aplicados procedimentos de vigilância ativa em comparação ao hospital HE. Possuir um monitoramento adequado auxilia na prevenção da transmissão horizontal em pacientes hospitalizados, além de que, o diagnóstico por reação em cadeia da polimerase (PCR) contribui para identificar pacientes colonizados por VRE rapidamente e, posteriormente, prever infecções por VRE. (LIOU *et al.*, 2014; KRAM *et al.*, 2021; HAQUE *et al.*, 2018).

A distribuição de espécies encontradas neste trabalho é mostrada na **Tabela 2**, está de acordo com a literatura: *E. faecalis* e *E. faecium* são as espécies mais frequentemente associadas à infecções relacionadas à assistência à saúde, tais como bacteremia, endocardite, infecções do trato urinário, infecções de feridas cirúrgicas, infecções intra-abdominais e intra-pélvicas (RAZA *et al.*, 2018). *E. gallinarum* e *E. avium* são menos frequentes em humanos e são mais encontrados em produtos cárneos e fezes de animais, podendo carrear genes de resistência transmissíveis a vários antibióticos (TOC *et al.*, 2022). *E. hirae* é raramente identificado em humanos e pode ser um patógeno comensal em psitacídeos (PINKES; WHITE; WONG, 2019).

A distribuição das espécies de enterococos, de acordo com a fonte de isolamento (apresentada na **Tabela 3**), indicou que a urina foi a fonte mais comum, a partir da qual foram obtidas 55 (42,3%) amostras de *E. faecalis*, e 6 (33,4%) amostras de *E. faecium*. É pertinente destacar que infecções do trato urinário (UTI) estão entre as infecções bacterianas mais comuns e afetam cerca de 150 milhões de indivíduos anualmente em todo o mundo (WERNEBURG, 2022). A prevalência de *E. faecalis* e *E. faecium* em UTIs adquiridas na comunidade é pouco frequente e torna-se maior entre pacientes com fatores complicadores subjacentes, incluindo diabetes, lesão medular e outras comorbidades. No entanto, os enterococos constituem a terceira causa mais comum de UTIs hospitalares, respondendo por 15-30% das infecções relacionadas a cateteres e o segundo uropatógeno mais frequente em ITUs complicadas, com a frequência de isolamento de *E. faecalis* maior do que a de *E. faecium*, e sendo que o aumento da taxa

de isolamento de *E. faecalis* se dá principalmente devido a cateteres urinários e stents, associados à formação de biofilme (GIANNAKOPOULOS *et al.*, 2019; KHALIL *et al.*, 2023). Esses percentuais de isolamento de *E. faecalis* e *E. faecium* a partir de urina são comuns (WERNEBURG, 2022), e as anomalias congênitas renais e do trato urinário, disfunções vesicais e intestinais, urolitíase e esvaziamento incompleto da bexiga são também os principais fatores de risco para o desenvolvimento de ITUs (GIANNAKOPOULOS *et al.*, 2019).

No presente estudo, o sangue constituiu a fonte de isolamento de 23 amostras de *E. faecalis*, 3 amostras de *E. faecium* e 1 amostra de *E. hirae*, distribuição essa semelhante ao observado na literatura. O isolamento de enterococos a partir de sangue está relacionado com as infecções da corrente sanguínea de início comunitário e hospitalar, geralmente se desenvolvendo a partir de fontes geniturinárias e gastrintestinais, podendo ocorrer endocardite que é uma doença que tem alta morbidade e mortalidade. Especialmente em *E. faecalis*, está diretamente relacionado com populações envelhecidas, com comorbidades, material protético implantado no coração, e um número crescente de procedimentos cirúrgicos no trato urinário e gastrointestinal. Entretanto, recentemente foi observado que os enterococos são a causa mais frequente de endocardite em pacientes submetidos à troca valvar aórtica transcater (DAHL *et al.*, 2019; BRIGHT *et al.*, 2020; MADRAZO *et al.*, 2020).

Em relação às outras amostras isoladas de sítios clínicos, foram observadas amostras provenientes de secreções/líquidos/abscessos diversos, predominantemente identificadas como *E. faecalis* (14 amostras). As amostras originadas de fragmentos teciduais ósseos, foram identificadas como *E. faecalis* e *E. avium* (1 amostra). As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* foram reconhecidas como os patógenos oportunistas comuns implicados em infecções do trato urinário, infecções de feridas/sítio cirúrgico e infecções associadas a cateteres da corrente sanguínea. Em geral, *E. faecalis* é mais frequentemente isolado de materiais clínicos do que *E. faecium* (GIBB; HADJIARGYROU, 2021; ANDERSEN *et al.* 2022; WERNEBURG, 2022). Em Salamanca, em um total de 106 pacientes internados com ITUs causadas por *Enterococcus*, foram identificadas 88 amostras de *E. faecalis* e 18 amostras de *E. faecium* (ALY *et al.*, 2016; MOTA; OLIVEIRA, 2019; ALVAREZ-ARTERO *et al.*, 2021). No presente estudo, a única amostra isolada de ponta de cateter foi identificada como *E. faecalis* (**Tabela 3**).

Os resultados de testes de susceptibilidade a antimicrobianos entre amostras de *E. faecalis*, revelaram percentuais elevados de resistência a diferentes antibióticos. De

acordo com a análise do percentual de resistência entre as espécies (**Tabela 5**) as amostras de *E. faecalis* apresentaram frequências elevadas com relação aos antimicrobianos tetraciclina (71,6%) e eritromicina (57,6%), em consonância com a **Tabela 3**. Também foram observados percentuais expressivos de resistência para os antimicrobianos utilizados em casos de infecções graves, tais como gentamicina (37,6%) e vancomicina (28,4%).

Para o antibiótico eritromicina, em um estudo feito na Polônia, a resistência foi de 50,5%, enquanto que a resistência à tetraciclina foi de 82% (RÓŻAŃSKA *et al.*, 2019). Esses dados estão em consonância com as taxas elevadas também observadas neste estudo. Contudo, taxas ainda maiores foram observadas, como em outro estudo realizado no Egito, em que a resistência à eritromicina foi de 96% (ESMAIL; ABDULGHANY; KHAIRY, 2019).

Com relação à resistência a vancomicina na espécie *E. faecalis*, um estudo feito na Índia revelou a ocorrência de resistência em 14,3% das amostras (YANGZOM; SINGH, 2019), enquanto em um outro estudo, na Polônia, a resistência à vancomicina foi de 0,6% (RÓŻAŃSKA *et al.*, 2019), percentuais estes bem inferiores àquele encontrado no presente trabalho. Há evidências de que a prevalência de VRE pode ser resultado das diferenças nas populações investigadas, condições climáticas, atividades da população das regiões e metodologia empregada (PIEZZI *et al.*, 2020; SHRESTHA *et al.*, 2021). Em um estudo feito no Irã, a resistência a níveis elevados de gentamicina entre *E. faecalis* foi de 45%, (HAGHI.; LOHRASBI; ZEIGHAMI, 2019), sendo um valor próximo àquele encontrado no presente estudo, que foi de 37,6%.

Conforme mostrado na **Tabela 6**, a espécie *E. faecium* apresentou destacada resistência aos antimicrobianos: todas resistentes a ampicilina, ciprofloxacina e eritromicina, 94,4% resistentes a vancomicina, 55,6% a quinupristina/dalfopristina e 16,6% a níveis elevados de gentamicina, em consonância com a **Tabela 3**.

Na Polônia, em um estudo incluindo 395 amostras de origem animal, no período de 2014 a 2017, foram identificadas 35 amostras de *E. faecium*, sendo 15 (42,8%) delas resistentes a quinupristina/dalfopristina (RÓŻAŃSKA *et al.*, 2019). Outro estudo, no noroeste do Irã, envolvendo 160 amostras de enterococos obtidas de várias fontes clínicas de diversas enfermarias de hospitais universitários, no período de setembro de 2014 a julho de 2015, revelou 35 (21,8%) amostras identificadas como *E. faecium*, sendo 6 (17,1%) delas resistentes a quinupristina/dalfopristina (JAHANSEPAS *et al.*, 2018).

Um estudo que foi conduzido para determinar a prevalência de fatores de virulência, resistência a drogas e seus determinantes genéticos e linhagens clonais de isolados clínicos de *E. faecalis* e *E. faecium*, no norte do Japão, resultou num total de 480 amostras, sendo 54 amostras identificadas como *E. faecium*, coletadas durante um período de quatro meses. Em *E. faecium*, a resistência a eritromicina foi identificada em 48 (88,9%) amostras (AUNG *et al.*, 2023). Entretanto, no noroeste do Irã, das 35 (21,8%) amostras identificadas como *E. faecium*, 34 (97,1%) foram resistentes à eritromicina (JAHANSEPAS *et al.*, 2018).

Entre 35 amostras de *E. faecium* isoladas na Polônia, a resistência a tetraciclina foi encontrado em 11 (31,4%) (RÓŻAŃSKA *et al.*, 2019). Por outro lado, na China, em um estudo que teve como objetivo investigar a prevalência do sistema CRISPR-Cas em isolados nosocomiais de *Enterococcus* e sua possível associação com resistência a antibióticos e genes de virulência, foram isoladas 100 amostras de *Enterococcus*, sendo 38 (38,0%) de *E. faecium*, das quais 28 (73,6%) eram resistentes a tetraciclina (TAO *et al.*, 2022).

Em um estudo na Polônia, que teve como objetivo determinar a necessidade de mudança no tratamento empírico das UTIs causadas por *Enterococcus*, foram isoladas 542 amostras, entre os anos de 2016–2021, sendo 151 (27,8%) identificadas como *E. faecium*, das quais 83 (55%) eram resistentes a vancomicina (KRASZEWSKA *et al.*, 2022). Na China, entre 100 isolados de *Enterococcus*, a resistência à vancomicina foi detectada em 24 (63,1%) amostras de *E. faecium* (TAO *et al.*, 2022). Em um estudo mais amplo, na Suíça, a prevalência de *E. faecium* VRE foi de 40,5%, entre 2.173 amostras, enquanto na Nigéria a prevalência de VRE em *E. faecium* foi de 63,1% (PIEZZI *et al.*, 2020). A ocorrência de resistência à vancomicina entre isolados de *E. faecium* é geralmente mais elevada, uma vez que esta espécie tem alto potencial para a obtenção de resistência tornando-se extremamente resistente a numerosos antimicrobianos. Assim, *E. faecium* está sendo cada vez mais relatado como a espécie mais frequente de VRE, o que é atribuído a uma das variantes fenotípicas de resistência aos glicopeptídeos, denominada VanA, que é codificada pelo gene *vanA*, principalmente transportado por *E. faecium* (PIEZZI *et al.*, 2020; SHRESTHA *et al.*, 2021).

Com relação à resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos, nossos resultados indicam diferenças, quando considerados os percentuais relativos a cada um dos dois aminoglicosídeos testados e as duas principais espécies identificadas. Assim, em relação a estreptomicina, os percentuais de resistência foram próximos, sendo ligeiramente mais elevados entre *E. faecalis* (20,8%), quando comparados aos

observados entre *E. faecium* (16,6%). Entretanto, a diferença marcante foi observada com relação aos percentuais de resistência a gentamicina, ao se verificar que 37,6% das amostras de *E. faecalis* apresentaram essa característica, em comparação a 61,1% das amostras de *E. faecium*. Percentuais elevados de resistência a gentamicina entre amostras de *E. faecium* também já foram relatados em diferentes países, como China (44,7%) (TAO *et al.*, 2022) e no Irã (54,3%) (JAHANSEPAS *et al.*, 2018). Na Índia, em um estudo para determinar a prevalência de enterococos apresentando resistência a aminoglicosídeos, em um total de 100 isolados, 52% eram *E. faecalis* e 48% eram *E. faecium*: 60% das amostras foram consideradas resistentes à níveis elevados de gentamicina, enquanto 45% também foram resistentes a níveis elevados de estreptomicina. A resistência à gentamicina foi mais frequente entre as amostras de *E. faecium* (77%) do que entre as de *E. faecalis* (44%), enquanto 52% das amostras de *E. faecium* e 38% das de *E. faecalis* foram considerados resistentes a estreptomicina (SHETE; GROVER; KUMAR, 2017).

Embora *E. hirae* tenha sido considerada a causa de doenças graves em humanos, poucos casos foram relatados devido, em parte, à dificuldade em identificar a espécie e à falta de relatórios abrangentes sobre características clínicas e tratamentos. No presente estudo, a única amostra apresentou susceptibilidade a todos os antimicrobianos testados, exceto à gentamicina. Um estudo feito no Japão, no qual foi relatado um caso de pielonefrite associada à bacteremia por *E. hirae* e realização de uma revisão da literatura sobre bacteremia por *E. hirae*, mostrou que a resistência a gentamicina foi observada em 4 (19%) amostras (AVBERŠEK *et al.*, 2021; NAKAMURA *et al.*, 2021). A susceptibilidade de *E. hirae* a agentes antimicrobianos é semelhante à de *E. faecalis*:esses microrganismos costumam ser suscetível à penicilina, ampicilina, a níveis elevados de gentamicina, ciprofloxacina, eritromicina e linezolida. Em estudos recentes, *E. hirae* tem sido reconhecido como um patógeno de infecções do trato urinário, especialmente em pacientes com doenças subjacentes, mas ainda com informações bastante limitadas em relação a dados clínicos, fatores de risco, manifestações clínicas e susceptibilidade antimicrobiana (NAKAMURA *et al.*, 2021).

As duas amostras de *E. avium* identificadas no presente estudo, foram sensíveis à maior parte dos antimicrobianos testados, exceto eritromicina com uma amostra resistente e tetraciclina, com duas amostras.

Na **Tabela 7** observa-se que foram encontradas 94 amostras apresentando multirresistência aos antimicrobianos, sendo que todas as *E. faecium* [18 (100%)], foram classificadas como multirresistentes, distribuídas em 14 perfis de não-

susceptibilidades diferentes e 76 (58,4%) das amostras de *E. faecalis* foram classificadas como MDR distribuídas em 42 perfis de não-susceptibilidade distintos. Os enterococos multirresistentes acumulam diferentes mecanismos de resistência aos antimicrobianos, os quais incluem modificação de alvos de drogas, inativação de agentes terapêuticos e superexpressão de bombas de efluxo, que imputam notável plasticidade genômica, conferindo aos enterococos alta capacidade para adquirir e transferir genes de resistência a antibióticos, incluindo resistência à vancomicina (FODOR *et al.*, 2020). As infecções humanas causadas por *E. faecium* e *E. faecalis* MDR são, associadas especialmente, a linhagens resistentes à vancomicina, e as taxas de VRE são altamente variáveis entre diferentes áreas, com tendências crescentes contínuas em vários países. Alguns antimicrobianos, como linezolida, daptomicina e tigeciclina, apresentam-se como opções para tratar infecções graves causadas por enterococos MDR, entretanto falhas terapêuticas e/ou amostras apresentando mecanismos de resistência a esses antimicrobianos já foram relatadas (FREITAS *et al.*, 2021).

Neste presente estudo foi observada a alta predominância de gene *vanA*, sendo que todas as 52 amostras que apresentaram resistência fenotípica à vancomicina possuíam tal gene (**Tabela 8**). A detecção molecular do gene *vanA* entre VRE isolados de pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTIs) costuma ser bastante frequente em diferentes regiões do globo. Este gene está frequentemente associado a resistência à vancomicina em diferentes regiões do mundo, incluindo Brasil (SILVA *et al.*, 2012; MARCHI *et al.*, 2018).

Os dados do presente estudo mostraram que todas as 54 amostras resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos apresentaram o gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (**Tabela 9**), e todas as amostras foram negativas para amplificação dos genes *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id* e *ant(4')-Ia*. Os aminoglicosídeos como gentamicina e estreptomicina, têm sido usados como agentes adjuvantes no tratamento de infecções enterocócicas graves, visto que seus efeitos de sinergismo bactericida, quando em combinação com agentes ativos da parede celular, são fundamentais no tratamento da endocardite enterocócica (KHODABANDEH *et al.*, 2020). Anteriormente, o *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* era o único gene encontrado associado à resistência a níveis elevados de gentamicina, porém, nos últimos anos (JAHANSEPAS *et al.*, 2018) a ocorrência de outros genes tem sido descrita, geralmente em baixas frequências, em concordância com

nossos achados. Na amostragem incluída neste estudo, foram observadas 11 amostras (20,2%) que amplificaram o gene *aph(3')-IIIa* (**Tabela 9**). Este gene confere resistência a outros antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos, a amicacina e canamicina, e pode estar sendo selecionado por pressão seletiva devido estar presente em um mesmo elemento genético móvel que carregam também outros genes de resistência e virulência.

A prevalência, em um estudo indiano, foi de 80% de amostras resistentes a níveis elevados de gentamicina portadoras do gene da enzima bifuncional *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, enquanto que resistência a níveis elevados de estreptomicina esteve presente em 40%. Os genes *aph(3')-IIIa*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id* e *ant(4')-Ia* não foram detectados (SHETE; GROVER; KUMAR, 2017).

Na Malásia, em um estudo para determinar a prevalência de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos e a distribuição dos genes associados a essa resistência entre isolados clínicos de *E. faecalis* e *E. faecium*, foi constatada que a prevalência de resistência a níveis elevados de gentamicina (51%) era ligeiramente maior quando comparada com resistência a níveis elevados de estreptomicina (45–49%) e a análise dos genes de resistência mostrou que os genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* e *aph(3')-IIIa* estiveram relacionados a resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos em *E. faecalis* e *E. faecium*, enquanto que outros genes codificadores de EMAs [*aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id*] não foram detectados nesse estudo (MOUSSA *et al.*, 2019).

A resistência a níveis elevados a estreptomicina em enterococos é mais comumente codificada pelo gene *ant(6')-Ia*, também conhecido como gene *aadE*, que possui ampla distribuição e codifica a enzima ANT(6')-Ia, uma nucleotidiltransferase que propicia a inativação da estreptomicina (GARCIA-SOLACHE; RICE. 2019; RODRIGUES SOUZA *et al.*, 2020; ZAHEER *et al.*, 2020). Um estudo que teve como objetivo investigar a ocorrência de resistência a aminoglicosídeos e a prevalência dos genes das enzimas modificadoras *ant(3'')-III*, *ant(6')-Ia*, *aac(6')-Ie aph(2'')-Ia* e *aph(2'')-Id*, em cepas de *Enterococcus* isoladas na província de Kermanshah, oeste do Irã, mostrou que, de 108 isolados de enterococos, todas as 19 amostras que possuíam resistência fenotípica a estreptomicina, carregavam o gene *ant(6)-Ia* (AMINI *et al*, 2018). Já, um outro estudo, no Egito, sobre enterococos isolados de ITU hospitalar, mostrou que, de 80 amostras de enterococos, 53 amostras (66,3%), apresentaram o gene *ant(6)-Ia* (EL-MAHDY; MOSTAFA; EL-KANNISHY, 2018).

Destacamos, ainda, que a resistência frente às quinolonas apresentou percentuais elevados. Outros autores também encontraram percentuais elevados de resistência a esta classe de antimicrobiano,

6 CONCLUSÃO

As espécies mais comumente isoladas de pacientes hospitalizados nas duas instituições investigadas foram *E. faecalis* e *E. faecium*. Outras espécies, compreendendo *E. avium*, *E. gallinarum* e *E. hirae*, foram observadas em baixa frequência.

Percentuais elevados com a proporção maior que 50% de resistência aos antimicrobianos testados foram observados com relação, a tetraciclina e eritromicina. As amostras de *E. faecalis* mostraram percentuais elevados de resistência a eritromicina e tetraciclina, bem como resistência com taxas expressivas para gentamicina e vancomicina.

Entre amostras de *E. faecium*, percentuais elevados de resistência foram encontrados para a maior parte dos antimicrobianos, exceto para cloranfenicol, fosfomicina, linezolida e tigeciclina. Destacando-se nessa espécie as taxas expressivas de resistência aos glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina), beta-lactâmicos (ampicilina e penicilina), fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina e levofloxacina) e aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina).

Amostras multirresistentes compreenderam 61,2% da amostragem, sendo que todas as amostras pertencentes à espécie *E. faecium* foram MDR, distribuídas em 14 perfis de não-susceptibilidade diferentes e 58,4% das amostras de *E. faecalis* foram classificadas como MDR distribuídas em 42 perfis de não-susceptibilidade distintos.

A resistência aos glicopeptídeos foi associada à presença do gene *vanA* em todas as amostras de *E. faecalis* e *E. faecium*. Todas as amostras resistentes à níveis elevados de gentamicina carregavam o gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*. O gene *aph (3')-IIIa* que confere resistência aos aminoglicosídeos amicacina e canamicina também foi observado.

O uso crescente de antimicrobianos em ambientes hospitalares, promoveu o desenvolvimento de resistência microbiana e tornou-se um problema emergente que proporciona enormes custos e é responsável pela altíssima morbimortalidade. A diversidade de mecanismos empregados pelos microrganismos contribui para o avanço constante da resistência antimicrobiana, e é extremamente custoso para os serviços de saúde, paciente, e, a sociedade, onde microrganismos resistentes podem se propagar e a quanto mais às cepas bacterianas se tornam resistentes a diversos antimicrobianos, as opções terapêuticas se tornam mais limitadas. O controle de vigilância para monitoramento de IRAS é essencial para inspecionar os microrganismos multirresistentes e inclui as práticas de vigilância, investigação, fiscalização de surtos, protocolos de esterilização, desinfecção de equipamentos e implementação de práticas

de cuidados ao paciente. O presente estudo fornece dados sobre a ocorrência e distribuição de espécies de *Enterococcus* em duas instituições hospitalares na cidade de Cachoeiro de Itapemirim, no Espírito Santo, assim como sobre as características fenotípicas e genotípicas de resistência aos antimicrobianos, demonstrando a frequência expressiva de amostras multirresistentes, incluindo VRE, e contribuindo com informações que podem servir de base para ações relacionadas à vigilância e tratamento de infecções enterocócicas.

BIBLIOGRAFIA

AARESTRUP, F. M.; HASMAN, H. Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. **Veterinary Microbiology**, v. 100, n. 1-2, p. 83-89, 2004.

AHMAD, I. *et al.* Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 27, p. 101-111, 2021.

AHMED, M. O.; BAPTISTE, K. E. Vancomycin-resistant enterococci: a review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 5, p. 590-606, 2018.

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(aad9)* in clinical isolates of enterococci. **Microbial Drug Resistance**, v. 11, n. 3, p. 239-247, 2005.

ALY, S. A. *et al.* Bacterial catheter-associated urinary tract infection in the intensive care unit of Assiut University Hospital. **Al-Azhar Assiut Medical Journal**, v. 14, n. 2, p. 52, 2016.

ALVAREZ-ARTERO, E. *et al.* Urinary tract infection caused by *Enterococcus* spp.: risk factors and mortality. An observational study. **Revista Clínica Española (English Edition)**, v. 221, n. 7, p. 375-383, 2021.

ANDERSEN, M. J. *et al.* Inhibiting host-protein deposition on urinary catheters reduces associated urinary tract infections. **Elife**, v. 11, p. e75798, 2022.

AMINI, F. *et al.* Prevalence of aminoglycoside resistance genes in *Enterococcus* strains in Kermanshah, Iran. **Iranian journal of medical sciences**, v. 43, n. 5, p. 487, 2018.

ARANSON, Igor. Bacterial Active Matter. **Reports on Progress in Physics**, 85, 076601, 2022.

ARBELOA, A. *et al.* Role of class a penicillin-binding proteins in PBP5-mediated β -lactam resistance in *Enterococcus faecalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1221-1228, 2004.

ARESTRUP, F. M. *et al.* Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 37, n. 2, p. 127-137, 2000.

ASLAM, B. *et al.* Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1645, 2018.

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

- ARTHUR, M.; COURVALIN, P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 8, p. 1563-1571, 1993.
- AUNG, M. S. *et al.* Antimicrobial Resistance, Virulence Factors, and Genotypes of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Clinical Isolates in Northern Japan: Identification of *optrA* in ST480 *E. faecalis*. **Antibiotics**, v. 12, n. 1, p. 108, 2023.
- AVBERŠEK, J. *et al.* Surveillance of the source of poultry infections with *Enterococcus hirae* and *Enterococcus cecorum* in Slovenia and *E. hirae* antibiotic resistance patterns. **The New Microbiologica**, v. 44, n. 4, 2021.
- BANLA, L. I.; SALZMAN, N. H.; KRISTICH, C. J. Colonization of the mammalian intestinal tract by enterococci. **Current opinion in microbiology**, v. 47, p. 26-31, 2019.
- BAUER, G. *et al.* Comparison of tetracycline and tigecycline binding to ribosomes mapped by dimethylsulphate and drug-directed Fe²⁺ cleavage of 16S rRNA. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 4, p. 592-599, 2004.
- BELKAID, Y.; HAND, T. W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 121-141, 2014.
- 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 Resistance Updates**, v. 40, p. 25-39, 2018.
- BENTORCHA, F.; DE CESPÉDÈS, G.; HORAUD, T. Tetracycline resistance heterogeneity in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 5, p. 808-812, 1991.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Prevenção de infecções por microrganismos multirresistentes em serviços de saúde – Série Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde- Brasília: Anvisa, 2021. Disponível em: <https://pncq.org.br/wp-content/uploads/2021/03/manual-prevencao-demultirresistentes7.pdf>.
- BRIGHT, M. *et al.* Occurrence and determinants of enterococcal bloodstream infections: a population-based study. **Infectious Diseases**, v. 52, n. 9, p. 638-643, 2020.
- CANU, A.; LECLERCQ, R. Overcoming bacterial resistance by dual target inhibition: the case of streptogramins. **Current Drug Targets-Infectious Disorders**, v. 1, n. 2, p. 215-225, 2001.
- CHEN, H. *et al.* Linezolid-resistant clinical isolates of enterococci and *Staphylococcus cohnii* from a multicentre study in China: molecular epidemiology and resistance mechanisms. **International journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, n. 4, p. 317-321, 2013.
- CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232-260, 2001.

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

CHOW, Joseph W. Aminoglycoside resistance in enterococci. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 2, p. 586-589, 2000.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 32th ed. CLSI supplement M100 (ISBN 978-1-68440-134-5 [Print]; ISBN 978-1-68440-135-2 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2022.

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

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

COSTA, Y. *et al.* Characterization of the chromosomal *aac (6')-I* gene specific for *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 9, p. 1896-1903, 1993.

COURVALIN, P.; CARLIER, C.; COLLATZ, E. Plasmid-mediated resistance to aminocyclitol antibiotics in group D streptococci. **Journal of Bacteriology**, v. 143, n. 2, p. 541-551, 1980.

COURVALIN, Patrice. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. Supplement_1, p. S25-S34, 2006.

DAHL, A. *et al.* Prevalence of infective endocarditis in *Enterococcus faecalis* bacteremia. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 74, n. 2, p. 193-201, 2019.

DEPARDIEU, F. *et al.* Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, 5857-5860, 2004.

DIAZ, L. *et al.* Transferable plasmid-mediated resistance to linezolid due to cfr in a human clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 7, p. 3917-3922, 2012.

DIAZ, L. *et al.* Dissecting the mechanisms of linezolid resistance in a *Drosophila melanogaster* infection model of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 1, p. 83-91, 2013.

DUTKA-MALEN, S *et al.* Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p 24-27, 1995.

EL-MAHDY, R; MOSTAFA, A; EL-KANNISHY, G. High level aminoglycoside resistant enterococci in hospital-acquired urinary tract infections in Mansoura, Egypt. **Germes**, v. 8, n. 4, p. 186, 2018.

ENGLAND, P. H. Identification of *Streptococcus* species, *Enterococcus* species and morphologically similar organisms *In*: ENGLAND, P. H. (org). **UK Stand MicrobiolInvestig.** England. v. 4, p. 1-36, 2014.

ESMAIL, M. A. M; ABDULGHANY, H. M.; KHAIRY, R. M. M. Prevalence of multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* in hospital-acquired surgical wound infections and bacteremia: Concomitant analysis of antimicrobial resistance genes. **Infectious Diseases: Research and Treatment**, v. 12, p. 1178633719882929, 2019.

EUZÉBY, Jean Paul. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 590-592, 1997.

FACKLAM, R. R.; COLLINS, M. D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 731-734, 1989.

FACKLAM, R. R.; CARVALHO, M. Da Gloria. S.; TEIXEIRA, L. M. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. **The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance**, p. 1-54, 2002.

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

FLUIT, A. C. *et al.* Presence of tetracycline resistance determinants and susceptibility to tigecycline and minocycline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1636-1638, 2005.

FONTANA, R. *et al.* Mechanisms of resistance to growth inhibition and killing by β -lactam antibiotics in *enterococci*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 486-489, 1992.

FODOR, A. *et al.* Multidrug resistance (MDR) and collateral sensitivity in bacteria, with special attention to genetic and evolutionary aspects and to the perspectives of antimicrobial peptides—a review. **Pathogens**, v. 9, n. 7, p. 522, 2020.

FREITAS, A. R. *et al.* Multidrug-resistant high-risk *Enterococcus faecium* clones: can we really define them?. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 57, n. 1, p. 106227, 2021.

GALIMAND, M. *et al.* Intrinsic resistance to aminoglycosides in *Enterococcus faecium* is conferred by the 16S rRNA m5C1404-specific methyltransferase EfmM. **Rna**, v. 17, n. 2, p. 251-262, 2011.

GALLOWAY-PENA, J. R.; RICE, L. B.; MURRAY, B. E. Analysis of PBP5 of early US isolates of *Enterococcus faecium*: sequence variation alone does not explain increasing ampicillin resistance over time. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3272-3277, 2011.

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

GIANNAKOPOULOS, X. *et al.* Impact of enterococcal urinary tract infections in immunocompromised-neoplastic patients. **J BUON**, v. 24, n. 5, p. 1768-1775, 2019.

GERALDES, C. *et al.* *Enterococcus* Virulence and Resistant Traits Associated with Its Permanence in the Hospital Environment. **Antibiotics**, v. 11, n. 7, p. 857, 2022.

GIBB, B. P.; HADJIARGYROU, M. Bacteriophage therapy for bone and joint infections: an instructional review. **The Bone & Joint Journal**, v. 103, n. 2, p. 234-244, 2021.

HAGHI, F; LOHRASBI, V; ZEIGHAMI, H. High incidence of virulence determinants, aminoglycoside and vancomycin resistance in enterococci isolated from hospitalized patients in Northwest Iran. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2019.

HAQUE, M. *et al.* Health care-associated infections—an overview. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 2321, 2018.

HAWKEY, Peter M. Mechanisms of quinolone action and microbial response. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. suppl_1, p. 29-35, 2003.

HENNIG, S.; ZIEBUHR, W. Characterization of the transposase encoded by IS 256, the prototype of a major family of bacterial insertion sequence elements. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 16, p. 4153-4163, 2010.

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

HOOPER, David C. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. Supplement_2, p. S24-S28, 2000.

ISNARD, C. *et al.* Genetic basis for in vitro and in vivo resistance to lincosamides, streptogramins A, and pleuromutilins (LSAP phenotype) in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 9, p. 4463-4469, 2013.

JAHANSEPAS, A. *et al.* Occurrence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in various clinical infections: detection of their drug resistance and virulence determinants. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 1, p. 76-82, 2018.

JONES, C. J.; AIZAWA, S. I. The bacterial flagellum and flagellar motor: structure, assembly and function. **Advances in Microbial Physiology**, v. 32, p. 109-172, 1991.

- KHALIL, M. A. *et al.* Antibiotic Resistance and Biofilm Formation in *Enterococcus spp.* Isolated from Urinary Tract Infections. **Pathogens**, v. 12, n. 1, p. 34, 2023.
- KHODABANDEH, M. *et al.* High-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*; as a serious threat in hospitals. **Infectious Disorders Drug Targets (Formerly Current Drug Targets Infectious Disorders)**, v. 20, n. 2, p. 223-228, 2020.
- KORCZYNSKA, M. *et al.* Structural basis for streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus* by virginiamycin B lyase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 25, p. 10388-10393, 2007.
- KRAM, S. J. *et al.* VanA rectal swab screening as a predictor of subsequent vancomycin-resistant enterococcal bloodstream infection in critically ill adults. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 42, n. 4, p. 411-416, 2021.
- KRASZEWSKA, Z. *et al.* Antibiotic Resistance of *Enterococcus spp.* Isolated from the Urine of Patients Hospitalized in the University Hospital in North-Central Poland, 2016–2021. **Antibiotics**, v. 11, n. 12, p. 1749, 2022.
- KRISTICH, C. J.; RICE, L. B.; ARIAS, C. A. Enterococcal infection—treatment and antibiotic resistance. **Enterococci: from Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]**, 2014.
- KÜHN, I. *et al.* Comparison of *enterococcal* populations in animals, humans, and the environment—a European study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2-3, p. 133-145, 2003.
- KUSAHARA, D. M. *et al.* Colonização e translocação bacteriana orofaríngea, gástrica e traqueal em crianças submetidas à ventilação pulmonar mecânica. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 25, p. 393-400, 2012.
- LEACH, K. L. *et al.* The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria. **Molecular Cell**, v. 26, n. 3, p. 393-402, 2007.
- LEELAPORN, A. *et al.* novel structure of *Tn4001*- truncated element, type V, in clinical enterococcal isolates and multiplex PCR for detecting aminoglycoside resistance genes.
- LIU, D. Z. *et al.* To swab or not to swab? A prospective analysis of 341 SICU VRE screens. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 76, n. 5, p. 1192-1200, 2014.
- LOCKE, J. B.; HILGERS, M.; SHAW, K. J. Mutations in ribosomal protein L3 are associated with oxazolidinone resistance in staphylococci of clinical origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5275-5278, 2009.
- LÓPEZ, M. *et al.* Characterization of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in vancomycin-resistant enterococci of different origins. **Journal of Chemotherapy**, v. 23, n. 2, p. 87-91, 2011.

MADRAZO, M. *et al.* Predictive factors for *Enterococcus faecalis* in complicated community-acquired urinary tract infections in older patients. **Geriatrics & Gerontology International**, v. 20, n. 3, p. 183-186, 2020.

MARCHI, A. P. *et al.* Genetic description of VanD phenotype vanA genotype in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from a Bone Marrow Transplantation Unit. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-6, 2022.

MARSHALL, S. H. *et al.* Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 10, p. 3334-3336, 2002.

MENDES, R. E. *et al.* First report of cfr-mediated resistance to linezolid in human staphylococcal clinical isolates recovered in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2244-2246, 2008.

MERCURO, N. J. *et al.* Combatting resistant enterococcal infections: a pharmacotherapy review. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 19, n. 9, p. 979-992, 2018.

MILLER, W. R.; MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 12, n. 10, p. 1221-1236, 2014.

MONEGRO, A. F.; MUPPIDI, V.; REGUNATH, H. Hospital acquired infections. *In: StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing, 2020.

MONTEALEGRE, M. C. *et al.* Differential penicillin-binding protein 5 (PBP5) levels in the *Enterococcus faecium* clades with different levels of ampicillin resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 1, p. e02034-16, 2017.

MOON, T. M. *et al.* The structures of penicillin-binding protein 4 (PBP4) and PBP5 from *Enterococci* provide structural insights into β -lactam resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 48, p. 18574-18584, 2018.

MOTA, E. C; OLIVEIRA, A. C. Infecção do trato urinário associada a cateter vesical: por que não controlamos esse evento adverso?. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 53, 2019.

MOUSSA, A. A. *et al.* High level aminoglycoside resistance and distribution of the resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from teaching hospital in Malaysia. **Infection and Drug Resistance**, p. 3269-3274, 2019.

MURDOCH, D. R. *et al.* Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis–Prospective Cohort Study. **Archives of Internal Medicine**, v. 169, n. 5, p. 463-473, 2009.

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

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Introdução à Microbiologia Médica. In: MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. (org.). Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. p. 29-40.

MURRAY, C. J. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022.

NAKAMURA, T. *et al.* *Enterococcus hirae* bacteremia associated with acute pyelonephritis in a patient with alcoholic cirrhosis: a case report and literature review. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 1-10, 2021.

OYAMADA, Y. *et al.* Combination of known and unknown mechanisms confers high-level resistance to fluoroquinolones in *Enterococcus faecium*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 729-736, 2006.

OZBAK, H. A. A novel high-resolution melting analysis approach for rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. **Annals of Saudi Medicine**, v. 38, n. 3, p. 200-207, 2018.

PADMASINI, E; PADMARAJ, R.; RAMESH, S. Srivani. High level aminoglycoside resistance and distribution of aminoglycoside resistant genes among clinical isolates of *Enterococcus* species in Chennai, India. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

PARTE, A. C. *et al.* List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5607, 2020.

PHAM, T. D.; ZIORA, Z. M.; BLASKOVICH, M. A.T. Quinolone antibiotics. **Medchemcomm**, v. 10, n. 10, p. 1719-1739, 2019.

PEPPER, K. *et al.* Location of antibiotic resistance markers in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* with similar antibiotypes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, n. 9, p. 1394-1402, 1987.

PEREIRA-MAIA, E. C. *et al.* Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. **Química nova**, v. 33, p. 700-706, 2010.

PIEZZI, V. *et al.* Increasing proportion of vancomycin resistance among enterococcal bacteraemias in Switzerland: A 6-year nation-wide surveillance, 2013 to 2018. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 35, p. 1900575, 2020.

PINKES, M. E.; WHITE, C; WONG, C. S. Native-valve *Enterococcus hirae* endocarditis: a case report and review of the literature. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, p. 1-5, 2019

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

- RAMOS, S. *et al.* Enterococci, from harmless bacteria to a pathogen. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1118, 2020.
- RAZA, T. *et al.* Vancomycin resistant Enterococci: a brief review. **J Pak Med Assoc**, v. 68, n. 5, p. 768-772, 2018.
- RICE, L. B. *et al.* A potential virulence gene, *hyl_{Efm}*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. 3, p. 508-512, 2003.
- RICE, L. B. *et al.* Role of class a penicillin-binding proteins in the expression of β -lactam resistance in *Enterococcus faecium*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 11, p. 3649-3656, 2009.
- RICE, L. B. *et al.* Structural and regulatory changes in PBP4 trigger decreased β -lactam susceptibility in *Enterococcus faecalis*. **MBio**, v. 9, n. 2, p. e00361-18, 2018.
- RODRIGUES SOUZA, S. *et al.* Occurrence and associated characteristics of a mutated *ant (6')-Ia* gene among *Enterococcus faecium* strains expressing phenotypic susceptibility to high levels of streptomycin. **bioRxiv**, p. 2020.12. 28.424548, 2020.
- ROGERS, H. J.; PERKINS, H. R.; WARD, J. B. Microbial Cell Walls and Membranes. **FEBS LETTERS**, 1981.
- RÓŻAŃSKA, H. *et al.* Occurrence of enterococci in mastitic cow's milk and their antimicrobial resistance. **Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 1, p. 93, 2019.
- RUSU, A; BUTA, E. L. The development of third-generation tetracycline antibiotics and new perspectives. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 12, p. 2085, 2021.
- SCHLEIFER, K. H.; KILPPER-BÄLZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 31-34, 1984.
- SCHNAPPINGER, D.; HILLEN, W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. **Archives of microbiology**, v. 165, n. 6, p. 359-369, 1996.
- SHETE, V; GROVER, N; KUMAR, M. Analysis of aminoglycoside modifying enzyme genes responsible for high-level aminoglycoside resistance among enterococcal isolates. **Journal of Pathogens**, v. 2017, 2017.
- SHINABARGER, D. L. *et al.* Mechanism of action of oxazolidinones: effects of linezolid and eperezolid on translation reactions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 10, p. 2132-2136, 1997.

SHRESTHA, S. *et al.* Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Asia—A systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 46, n. 5, p. 1226-1237, 2021.

SIFAOU, F. *et al.* Role of penicillin-binding protein 5 in expression of ampicillin resistance and peptidoglycan structure in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2594-2597, 2001.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 5, p. a000414, 2010.

SILVA, G. N. D. *et al.* Use of tigecycline at a teaching hospital. **ABCS Health Sci**, p. e022202- e022202, 2022.

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

SLIPCZUK, L. *et al.* Infective endocarditis epidemiology over five decades: a systematic review. **PloSOne**, v. 8, n. 12, p. e82665, 2013.

SPERA, R. V.; FARBER, B. F. Multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. **Drugs**, v. 48, n. 5, p. 678-688, 1994.

SWENSON, J. M. de *et al.* Molecular characterization and multilaboratory evaluation of *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 for quality control of screening tests for vancomycin and high-level aminoglycoside resistance in enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 11, p. 3019-3021, 1995.

TAMBURINI, S. *et al.* The microbiome in early life: implications for health outcomes. **Nature medicine**, v. 22, n. 7, p. 713-722, 2016.

TAO, S. *et al.* Association of CRISPR-Cas System with the Antibiotic Resistance and Virulence Genes in Nosocomial Isolates of *Enterococcus*. **Infection and DrugResistance**, p. 6939-6949, 2022.

TEIXEIRA, L. M. *et al.* *Enterococcus*. In: CARROLL *et al.* (org). **Manual of Clinical Microbiology**, 12^a ed. Washington D.C.: ASM Press. p. 418-435, 2019.

TOC, D. A. *et al.* *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus durans* and *Enterococcus avium* Isolated from a Tertiary Care Hospital in Romania - Retrospective Study and Brief Review. **Biology**, v. 11, n. 4, p. 598, 2022.

TOH, Seok-Ming. *et al.* Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. **Molecular Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 1506-1514, 2007.

- TORRES, C. *et al.* Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. **Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals**, p. 185-227, 2018.
- TRAN, J. H.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 118-125, 2005.
- VAKULENKO, S. B. *et al.* Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, n.4, p. 1423-1426, 2003.
- VAN DEN BOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E. E. Antibiotic usage in animals. **Drugs**, v. 58, n. 4, p. 589-607, 1999.
- VOLKE, D. C.; NIKEL, P. I. Getting bacteria in shape: synthetic morphology approaches for the design of efficient microbial cell factories. **Advanced Biosystems**, v. 2, n. 11, p. 1800111, 2018.
- WANG, S. *et al.* Characteristics of *Enterococcus faecium* clinical isolates with quinupristin/dalfopristin resistance in China. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1-5, 2016.
- WANG, N. *et al.*, Antibiotic Combination Therapy: A Strategy to Overcome Bacterial Resistance to Aminoglycoside Antibiotics. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 2022.
- WEISBLUM, Bernard. Erythromycin resistance by ribosome modification. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 3, p. 577-585, 1995.
- WEINSTEIN, Melvin. P. Comparative evaluation of penicillin, ampicillin, and imipenem MICs and susceptibility breakpoints for vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2729-2731, 2001.
- WERNEBURG, G. T. Catheter-associated urinary tract infections: current challenges and future prospects. **Research and Reports in Urology**, p. 109-133, 2022.
- WERNER, G.; KLARE, I.; WITTE, W. Molecular analysis of streptogramin resistance in enterococci. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, n. 2, p. 81-94, 2002.
- WERNER, G. *et al.* Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from a German intensive care unit patient. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. 1182-1183, 2008.
- WILLEMS, R. JL *et al.* Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 821, 2005.
- WILLIAMS, A. M.; RODRIGUES, U. M.; COLLINS, M. D. Intrageneric relationships of enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA. **Research in Microbiology**, v. 142, n. 1, p. 67-74, 1991.

YANGZOM, T; SINGH, T. S. K. Study of vancomycin and high-level aminoglycoside-resistant *Enterococcus* species and evaluation of a rapid spot test for enterococci from Central Referral Hospital, Sikkim, India. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 11, n. 03, p. 192-199, 2019.

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

ZAHEER, R. *et al.* Surveillance of *Enterococcus* spp. reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One-Health continuum. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3937, 2020.