



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

MICHELLY LOPES DA SILVA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE
ENTEROCOCCUS FAECIUM RESISTENTES À VANCOMICINA EM
HOSPITAL TERCIÁRIO DO RECIFE**

Recife
2023

MICHELLY LOPES DA SILVA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE
ENTEROCOCCUS FAECIUM RESISTENTES À VANCOMICINA EM
HOSPITAL TERCIÁRIO DO RECIFE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Msc. Carlos Alberto das Neves de Andrade.

Coorientador: Dr. Igor Vasconcelos Rocha.

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Michelly Lopes da.

Diversidade genética de isolados de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina em hospital terciário do Recife / Michelly Lopes da Silva. - Recife, 2023.

p.67 : il., tab.

Orientador(a): Carlos Alberto das Neves de Andrade

Coorientador(a): Igor Vasconcelos Rocha

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

1. *Enterococcus faecium*. 2. Resistência à vancomicina. 3. ERIC-PCR. 4. IRAS. 5. vanA. I. Andrade, Carlos Alberto das Neves de. (Orientação). II. Rocha, Igor Vasconcelos. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

MICHELLY LOPES DA SILVA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE
ENTEROCOCCUS FAECIUM RESISTENTES À VANCOMICINA EM
HOSPITAL TERCIÁRIO DO RECIFE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Aprovada em: 22/09/2023

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Msc. Carlos Alberto das Neves de Andrade
Unidade de Hematologia, Hemoterapia e Oncologia do Hospital das Clínicas - UFPE

Msc. Renata Pessôa Germano Mendes
Instituto Aggeu Magalhães - Laboratório de virologia e terapia experimental

Dra. Thaíse Yasmine Vasconcelos de Lima Cavalcanti
Instituto Aggeu Magalhães - Laboratório de virologia e terapia experimental

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus por ter permitido que eu tivesse saúde, sabedoria e paciência para iniciar e completar a graduação.

Aos meus pais, Gilson e Catarina que me apoiaram emocionalmente e financeiramente e que mesmo estando em outra cidade, sempre me deram todo apoio possível, juntamente ao meu irmão por todo carinho e preocupação.

Ao meu padrinho e madrinha, que sempre apoiaram as minhas escolhas e me incentivaram a continuar estudando.

Ao meu namorado, que acompanhou minha trajetória desde o início da graduação e dividiu comigo minhas alegrias e ansiedades.

As minhas amigas Pâmala e Maria Luiza, que literalmente moram comigo, obrigada por tornar nossa convivência boa, todos os dias.

Ao meu orientador, Carlos, por querer participar desse projeto comigo, por sempre estar presente e ser prestativo, por todo conhecimento que adquiri, um exemplo de profissional, uma das pessoas mais inteligentes e proativas que já conheci, obrigada pela paciência de ler todas as atrocidades que escrevi.

Ao meu coorientador, Igor, por ter aceitado fazer parte deste trabalho e ter fornecido seu apoio durante todo o processo.

Aos membros da banca avaliadora, por terem aceitado o convite e disponibilizado seu tempo para estar presente nesse momento.

As amigas que fiz durante o curso, Juliana e Caíque, pelo apoio do começo ao final de toda a nossa jornada na graduação.

Aos meus amigos de longa data, qual conheço a mais tempo do que posso contar, Lorena, Jéssica, Luana, Sarone, André, Marcos e Kenenton, pela amizade e carinho.

Ao Instituto Aggeu Magalhães, pelo suporte científico e tecnológico para a realização desta pesquisa.

SILVA, Michelly Lopes. **DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Enterococcus faecium* RESISTENTES À VANCOMICINA EM HOSPITAL TERCIÁRIO DO RECIFE**. 2023. 67p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

E.faecium é um Gram positivo, ubiquitário, comumente isolada em infecções nosocomiais. Por sua facilidade em adquirir e transmitir resistências por componentes móveis, facilmente se tornam bactérias multirresistentes, expondo pacientes imunocomprometidos a taxas elevadas de comorbidade e mortalidade. O objetivo deste estudo, foi avaliar a predominância de populações clonais, em pacientes assistidos por um hospital terciário do Recife, PE. Os isolados foram obtidos através de banco de cepas fornecido pela Fiocruz/PE. O perfil de susceptibilidade à vancomicina foi realizado por microdiluição. O DNA das amostras foi extraído por protocolo com Triton-X-100 e avaliado através do NanoDrop. Foi realizado PCR do material utilizando primers ERIC específicos. Todos os produtos foram analisados por eletroforese em géis de agarose. A análise filogenética foi realizada utilizando PHYLIP-3.68, com dendrogramas gerados por UPGMA. Foram isoladas 46 amostras durante intervalo de tempo 2021-2023, derivadas de cultura de vigilância, hemocultura e urocultura, de pacientes com idades variantes de 16 a 93 anos. As amostras tinham como clínica de origem enfermarias, UTIs e clínica médica. A análise ERIC-PCR isolou 9 clusters. O mais frequente foi o A com 30,95% dos isolados analisados, seguido de F (23.80%), D (11.90%), G (9.52%), H (7.14%), B (4.76%) e E (4.76%), sendo todos eles portadores do gene *vanA* de resistência à vancomicina e com CIMs > 256 µg/mL. Esses isolados foram majoritariamente identificados em pacientes idosos (>60 anos) (58,7%) e em sítios associados à colonização (90,7%). A persistência destes clones no ambiente hospitalar reforça o papel das ferramentas moleculares no estudo epidemiológico, na prevenção e rastreio de surtos hospitalares.

Palavras-chave: *Enterococcus faecium*. Resistência à vancomicina. ERIC-PCR. IRAS. *vanA*.

SILVA, Michelly Lopes. **GENETIC DIVERSITY OF VANCOMYCIN-RESISTANT *Enterococcus faecium* ISOLATES IN A TERTIARY HOSPITAL IN RECIFE**. 2023. 67p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

E. faecium is a Gram-positive, ubiquitous bacterium commonly isolated in nosocomial infections. Due to its ease in acquiring and transmitting resistance through mobile components, it easily becomes multidrug-resistant bacteria, exposing immunocompromised patients to high rates of comorbidity and mortality. The objective of this study was to evaluate the predominance of clonal populations in patients treated at a tertiary hospital in Recife, PE. The isolates were obtained from a strain bank provided by Fiocruz/PE. Vancomycin susceptibility profiles were determined using microdilution. DNA from the samples was extracted using a Triton-X-100 protocol and evaluated using NanoDrop. PCR was performed on the material using specific ERIC primers. All products were analyzed by agarose gel electrophoresis. Phylogenetic analysis was conducted using PHYLIP-3.68, dendrograms generated Through UPGMA method. A total of 46 samples were isolated during the period from 2021 to 2023, derived from surveillance cultures, blood cultures, and urine cultures, from patients ranging in age from 16 to 93 years. The samples originated from wards, ICUs, and medical clinics. ERIC-PCR analysis identified 9 clusters. The most frequent was A with 30,95% of the samples identified, followed by F (23.80%), D (11.90%), G (9.52%), H (7.14%), H (7.14%), B (4.76%) and E (4.76%). All of which exhibiting a *vanA* gene of vancomycin resistance with MICs >256 µg/mL. These isolates were identified in elderly patients (58,7%) and in sites associated with colonization (90,7%). The persistence of these clones in the hospital environment underscores the role of molecular tools in epidemiological studies, outbreak prevention, and tracking.

Key words: *Enterococcus faecium*. Vancomycin resistance. ERIC-PCR. HAI. *vanA*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Características bioquímicas e morfológicas dos <i>Enterococcus</i>	16
Figura 02 – Estrutura química da vancomicina.....	22
Figura 03 – Mecanismo de ação dos fármacos β -lactâmicos e glicopeptídeos.....	24
Figura 04 – Diagrama esquemático do mecanismo de resistência à vancomicina..	25
Figura 05 – Operons relacionados a resistência a vancomicina.....	26
Figura 06 – Percentual de resistência dos isolados de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> notificados entre 2019 e 2022 de infecções do trato urinário (ITU) em UTIs adulto. .	34
Figura 07 – Percentual de resistência dos Gram-positivos isolados entre 2019 e 2022 em infecções primárias da corrente sanguínea (IPSCl) em UTIs adulto.....	35
Figura 08 – Dendograma dos padrões de ERIC-PCR dos 46 isolados.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Características dos fenótipos VRE.....	28
Tabela 02 – Relação de idade entre a amostragem de pacientes.....	44
Tabela 03 – Isolados bancados por clínicas de origem.....	45
Tabela 04 – Sítio de isolamento.....	45
Tabela 05 – Clusters identificados pelo ERIC-PCR.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BrCAST	Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
CC17	Clonal Complex 17 (Complexo Clonal 17)
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CNCIRAS	Coordenação Nacional de Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde
CoNS	Coagulase-Negative Staphylococci (<i>Staphylococcus Coagulase-Negativos</i>)
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
CVC	Cateter Venoso Central
CIM/MIC	Minimum Inhibitory Concentration (Concentração Inibitória Mínima)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERIC-PCR	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction
EUA	Estados Unidos da América
IPCSL	Infecção Primária da Corrente sanguínea associada a Cateter Vesical
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ITU	Infecção do Trato Urinário
MLST	Multilocus Sequence Typing (Tipagem de Sequência Multilocus)
MDR	Multidrug-Resistant (Multirresistente)
MRSA	Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (Staphylococcus Aureus Resistente à Meticilina)
MRSE	Methicillin-Resistant Staphylococcus Epidermidis (Staphylococcus Epidermidis Resistente à Meticilina)
MSCRAMM	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (Componentes de Superfície Microbiana Reconhecendo Moléculas de Matriz Adesiva)
NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAV	Pneumonia Associada à Ventilação
PBP	Penicillin-Binding Protein (Proteína de Ligação à Penicilina)

PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis (Eletroforese em Gel em Campo Pulsado)
PNPCIRAS	Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
PTS	Phosphotransferase (Fosfotransferase)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição)
RNA	Ácido Ribonucleico
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA (DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso)
REP	Repetitive Extragenic Palindromic (Palíndromos Extragênicos Repetitivos)
ST	Sequence Type (Tipo de Sequência)
Tn	Transposon
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (Método de Agrupamento de Pares Não Ponderado com Média Aritmética)
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VRE	Vancomycin-Resistant Enterococci (<i>Enterococcus</i> Resistentes à Vancomicina)
VRE _f	Vancomycin-Resistant <i>Enterococcus faecium</i> (<i>Enterococcus faecium</i> Resistente à Vancomicina)

SUMÁRIO

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 O GÊNERO <i>ENTEROCOCCUS</i>	14
2.2 EVOLUÇÃO DO <i>ENTEROCOCCUS FAECIUM</i> COMO PATÓGENO ADAPTADO AO AMBIENTE HOSPITALAR.....	16
2.2.1 Fatores de Virulência.....	17
2.3 PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	18
2.4 VANCOMICINA.....	22
2.4.1 Mecanismo de Ação.....	23
2.4.2 Mecanismos de Resistência Antimicrobiana à Vancomicina.....	24
2.4.3 Abordagens Terapêuticas em Infecções por VRE.....	29
2.5 <i>ENTEROCOCCUS</i> RESISTENTE À VANCOMICINA: PATOGENICIDADE, EPIDEMIOLOGIA E IMPACTO CLÍNICO.....	30
2.6 DISSEMINAÇÃO CLONAL.....	36
2.7 FERRAMENTAS MOLECULARES PARA AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO GENÉTICA BACTERIANA.....	36
2.7.1 ERIC-PCR.....	38
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 OBJETIVO GERAL.....	39
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4 METODOLOGIA.....	39
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	39
4.2 OBTENÇÃO DE DADOS.....	40
4.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE À VANCOMICINA.....	40
4.4 REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS.....	41
4.5 EXTRAÇÃO DE DNA.....	41
4.6 ERIC PCR.....	42
4.7 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	42
5 RESULTADOS.....	43
5.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	43
5.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE À VANCOMICINA.....	44
5.4 ANÁLISE ERIC-PCR.....	45
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÃO.....	53

8 REFERÊNCIAS.....	54
---------------------------	-----------

1 Introdução

A disseminação clonal de isolados clínicos multirresistentes aos antimicrobianos é um processo de transmissão que proporciona alta incidência de infecções pela mesma linhagem bacteriana resultando em surtos e até mesmo epidemias. Em ambientes hospitalares estas cepas geneticamente idênticas são frequentemente relacionadas aos elevados índices de morbidade e mortalidade provocadas pelas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) (Cattoir, 2022, p.03; OMS, 2016, p.28).

Definidas como qualquer infecção relacionada ao cuidado com o paciente, compreendendo procedimentos para prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças, o termo IRAS substituiu o antigo conceito de infecção hospitalar. Influenciada por fatores como: idade, desnutrição, diabetes, tabagismo, tempo de permanência nos serviços de saúde (quanto maior o tempo, maior o risco de adquirir infecções), a necessidade de procedimentos invasivos (como o uso de sondas, cateter e cirurgias) e o uso excessivo de antibióticos, destacam-se por causarem infecções relevantes em sítios cirúrgicos, trato urinário, trato respiratório, corrente sanguínea e também por frequentemente serem provocadas por isolados Gram-positivos multirresistentes aos antimicrobianos de rotina (ANVISA, 2022, p.05).

No Estado de Pernambuco, as espécies comumente relacionadas às IRAS são: *Staphylococcus* coagulase negativa (CoNS), *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, sendo estas duas últimas as principais responsáveis pelo desenvolvimento e propagação da resistência à vancomicina, um importante antimicrobiano intravenoso pertencente à classe dos glicopeptídeos e amplamente utilizado no tratamento de infecções invasivas, cujo mecanismo de ação está associado à inibição dos precursores da parede celular bacteriana (ANVISA, 2021, p.05; Willems et al., 2011, p.03).

A resistência à vancomicina representa uma das maiores ameaças à Saúde Pública na atualidade. Diretamente relacionada ao aumento do tempo de internação, elevação dos custos hospitalares e mortalidade, tem sido frequentemente identificada em isolados de *Enterococcus* spp desde 1988 (Leclercq et al., 1988, p.). Os principais mecanismos moleculares associados ao processo de

resistência à vancomicina envolvem a disseminação de genes *vanA* e *vanB* através de plasmídeos e transposons.

Após a identificação do primeiro caso de *Enterococcus* spp. resistente a vancomicina (VRE) em 1986 na Europa, houve uma rápida disseminação do gênero nas Américas, envolvendo as espécies *E. faecalis* e *E. faecium*. Atualmente estima-se que 70% dos isolados de *E. faecium* são resistentes à vancomicina. A taxa de mortalidade em pacientes com bacteremia provocada por VRE pode chegar a 56%, tornando este gênero um dos mais associados às IRAS (Almuzara, 2013, p.04; OMS, 2015, p.38; Willems et al., 2005, p.01) Por isso, programas como o PNPCIRAS (Programa Nacional de Prevenção e Controles de IRAS) ressaltam a importância do rastreio e monitoramento das resistências microbianas como prevenção a surtos hospitalares, diminuição dos riscos relacionados às IRAS, promovendo aumento na qualidade assistencial e na proteção do paciente com o objetivo de gerenciar riscos e aprimorar os serviços de saúde (ANVISA, 2022, p.10). No Brasil, a cultura de vigilância, especialmente a coleta de swab retal, é o método adotado pelos hospitais de cuidado terciário desde os anos 2000 para identificação e monitoramento da incidência epidemiológica do *Enterococcus* spp. resistente a vancomicina (Bissoli, 2018, p.04; Furtado et al., 2005, p.03).

Nesse sentido, a utilização de métodos moleculares tem sido cada vez mais frequente para monitorar a disseminação clonal de isolados clínicos multirresistentes, permitindo a análise do real panorama de aquisição e circulação de novos mecanismos de resistência antimicrobiana antes mesmo que os surtos em grande escala apareçam, conferindo vantagem primordial aos programas de controle de IRAS para aplicabilidade de estratégias de contenção e avaliação da eficácia dos protocolos institucionalizados para esta finalidade (Leavis et al., 2003, p.05; Willems et al., 2005, p.05).

Ao longo das últimas décadas algumas técnicas se destacaram para estas análises, tais como o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) e o ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction*), esta última destaca-se por possibilitar a caracterização da relação genética de espécies e cepas, em poucas

horas, utilizando picogramas de DNA, É uma tecnologia de genotipagem simples, resolutive e econômica para discriminar diferentes tipos de cepas. (Versalovic; Koeuth; Lupski, 1991, p.02).

Estas técnicas moleculares têm grande impacto clínico e epidemiológico pelo seu papel frente a técnicas bioquímicas e sorológicas, tradicionalmente utilizadas na identificação de *Enterococcus* e outros microrganismos, através de perfis bioquímicos, análise de proteínas e testes de susceptibilidade a antibióticos. No entanto, a limitação na capacidade discriminatórias destas técnicas em acompanhar o processo evolutivo e fornecer informações precisas levou a exploração de métodos moleculares baseados na análise dos ácidos nucleicos (Ahamdi; Siasi Torbati; Amini, 2023, p.02).

Visando o aumento na necessidade de estudos epidemiológicos para avaliação de pacientes colonizados e surtos hospitalares, especialmente em hospitais de cuidados especializados, foi avaliado a capacidade discriminatória do ERIC-PCR, ao determinar a relação genética de *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina, isolados durante 2021-2023.

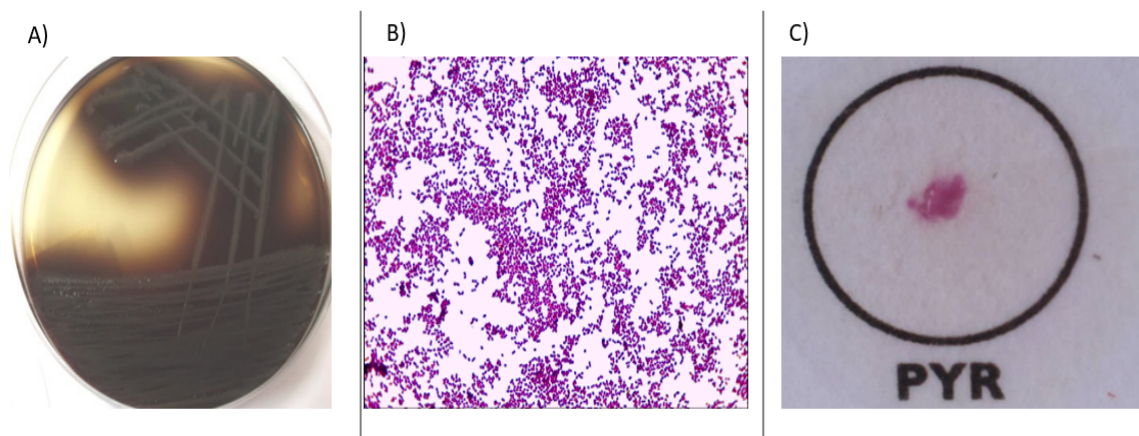
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O GÊNERO *ENTEROCOCCUS*

O gênero *Enterococcus* foi descrito primeiramente em 1899 por Thiercelin, como bactérias gram-positivas com morfologia de diplococos. Em 1906, espécies deste grupo classificadas como “enterocoque” foram classificadas como um dos quatro grupos dos *Streptococcus* spp. por Andrewes e Harder pela sua similaridade em formar cadeias; “*Streptococcus faecium*”, “*Streptococcus faecalis*” e mais 17 espécies que voltaram a pertencer aos *Enterococcus* spp. apenas em 1984. Em 1933, foram classificados no grupo sorológico D de Lancefield junto ao *Streptococcus bovis* e *Sreptococcus equinus*. Em 1970, Karina e colaboradores conferem nomenclatura às espécies mais destacadas deste gênero: *E.faecalis* e *E. faecium*. Posteriormente, em 1978, houve a mudança de “Enterococcus” para “faecal”. O gênero só ressurgiu em 1984 pelos estudos quimiotaxonômicos e filogenéticos de Schleifer e Kilpper-Balz, baseados na catalogação do rRNA, DNA-DNA e DNA-rRNA dos microrganismos (Devriese, Pot, 1995, p.327-328).

Os microrganismos pertencentes a este gênero demonstram notáveis habilidades adaptativas, incluindo a capacidade de crescerem em meios de cultura incubados a temperaturas que variam entre 10 °C a 45 °C e suplementados com até 6,5% de cloreto de sódio (NaCl). Além disso, resistem a condições extremas, sobrevivendo a temperaturas de 60 °C por um período de 30 minutos e mantendo sua viabilidade a um pH de 9,6. Esses microrganismos são anaeróbios facultativos, não produzem a enzima catalase, não expressam citocromos oxidase, apresentam atividade de hidrólise da Pirrolidonil Arilamidase (PYR), produzem leucinas aminopeptidase e demonstram a capacidade de hidrolisar bile esculina em bile esculina + glicose (conforme ilustrado na Figura 01) (Murray, 1990, p. 02).

Figura 01- Características bioquímicas e morfológicas dos *Enterococcus*.



Fonte: Extraído e adaptado (Fayed, 2012).

Nota: A) Crescimento por esgotamento no Ágar bile esculina azida, *Enterococcus* hidrolisa bile esculina em bile esculina que ao reagir com Fe_{3+} torna o meio enegrecido;
 B) *Enterococcus* em coloração de gram, cocos gram positivos (roxos), arranjados em cadeia;
 C) hidrolisam o Pirrolidonil Arilamidase (PYR), a positividade do teste pode ser observada pela formação da cor arroxeadada ao redor das colônias testadas.

O gênero *Enterococcus* pertence à Família *Enterococcaceae* e ao filo Firmicutes e abrange 83 espécies (BONAPARTE; KLEIN, 2012), são em sua maioria bactérias comensais e colonizam o trato gastrointestinal de humanos, outros mamíferos, répteis e insetos. Existem aproximadamente 10^6 - 10^7 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) *Enterococcus* no intestino humano, estes também colonizam a cavidade oral e o trato genitourinário, podendo ser encontradas espécies como: *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus raffinosus*, sendo as espécies *Enterococcus faecium* e o *Enterococcus faecalis* as mais importantes desse gênero devido aos fatores de virulência e de resistência aos antimicrobianos expressos por esses isolados (Cattoir, 2022, p.01). *E. faecium* e *E. faecalis* possuem alta plasticidade genética. Essas bactérias possuem genomas curtos, mas com uma proporção de material genético acessório, correspondendo a 38% e 25%, respectivamente (Krawczyk et al., 2021, p.02).

A capacidade de adquirir genes por meio da transmissão horizontal é uma característica destacada dessas bactérias. Esse processo permite a fácil aquisição de genes, principalmente aqueles relacionados à resistência à

vancomicina, por meio de componentes móveis, tais como plasmídeos e transposons. Isso está diretamente relacionado com o surgimento e a rápida disseminação da resistência a esse antimicrobiano (Paulsen et al., 2003, p.02).

2.2 EVOLUÇÃO DO ENTEROCOCCUS FAECIUM COMO PATÓGENO ADAPTADO AO AMBIENTE HOSPITALAR

O primeiro caso relatado sobre VRE, ocorreu em 1986 na Europa e rapidamente se espalhou, principalmente em pacientes imunossuprimidos, com altas taxas endêmicas nos Estados Unidos (EUA), a transmissão ocorria através de transmissão cruzada, as primeiras epidemias foram causadas pelos mesmos um ou dois clones da espécie, o que evoluiu rapidamente para uma endemia policlonal, em sua maioria as cepas isoladas nos EUA apresentavam resistência a ampicilina e vancomicina, enquanto na Europa a resistência a vancomicina se espalhou mais lentamente e a maioria dos isolados apresentavam apenas resistência a ampicilina (Frieden et al., 1993, p.03; Willems; Van Schaik, 2009, p.02)

Estudos de genética de populações de *E. faecium* através da tipagem de sequências multilocus (MLST) revelaram que existem duas subpopulações distintas dessa bactéria: o Clado A, dividido em A1 (Isolados clínicos de infecções hospitalares), onde se encontra o complexo clonal CC17, considerado ancestral do clado, desde então a maioria dos *E. faecium* de infecções nosocomiais foram associados ao CC17. Há também o A2 onde estão agrupadas as cepas derivadas de animais e o Clado B, composto pelos isolados de infecções comunitárias (Arias; Murray, 2012, p.04, Zhou et al., 2020, p.02).

O clado A1 é caracterizado pelo acúmulo de genes de resistência a antibióticos, um de grande relevância é o sistema fosfotransferase (PTS), são proteínas transmembrana que fosforilam açúcares como glicose, manose e manitol, transportando-os para dentro da membrana bacteriana (ZHANG et al., 2013). O PTS, em estudos, apresentou sensibilidade à exposição a daptomicina (Sinel et al., 2017, p.02).

2.2.1 Fatores de Virulência

O *E. faecium* pode apresentar fatores de virulência que justificam sua maior capacidade patogênica em relação a outras espécies do gênero, especialmente nas cepas hospitalares (Clado A1) (Quadro 01)

Quadro 01 - Fatores de virulência de isolados *E. faecium* do clado A1.

Fatores de virulência		Referências
Fatores de adesão: Componentes na superfície celular microbiana que reconhecem moléculas adesivas de matriz (MSCRAMM).	LP x TG: Acm, Scm, SgrA, EcbA. PGCs: PilA (Fms20-Fms21), PilB (EmpA-EmpB-EmpC), Fms14-Fms17-Fms13 (PGC-2 proteins) e Fms11- Fms19-Fms16.	GAO; HOWDEN; STINEAR, 2018.
Substâncias de agregação: diretamente relacionadas ao aumento do processo de adesão, são formadas por uma classe de adesinas.	Esp: O fator de virulência mais disseminado, relacionado a formação de biofilme e agregação à superfície celular.	SHANKAR et al., 2001
Exoenzimas: Enzimas produzidas pelo microrganismo que são excretadas externamente e causam ativação da cascata inflamatória nos tecidos do hospedeiro.	Gelatinase: Codificada pela gelE, ativa a autolisina e degrada substratos teciduais como, insulina, caseína, hemoglobina, fibrinogênio, colágeno e gelatina Hialuronidase: Degrada o ácido hialurônico Citolisina: Ataca eritrócitos, macrófagos e os polimorfonucleares.	LEE et al., 2019; LOPES et al., 2006.
Outras enzimas	Fosfotransferases (PTS): proteínas transmembrana que fosforizam carboidratos específicos, transportando-os para dentro da membrana bacteriana BepA: PTS observada na fisiopatologia da endocardite.	PAGANELLI et al., 2016; ZHANG et al., 2013.

Fonte: O autor.

Legenda: Fatores de virulência relacionados a manutenção e fixação do *E. faecium* no ambiente hospitalar

São estes: fatores de adesão, formado por matriz de moléculas adesivas (MSCRAMM) e os genes Acm, Scm, SgrA e EcbA que compõe as proteínas de agregação de superfície LPxTG, Esp contribuí para adesão inicial a membrana celular e sua patogênese é observada na endocardite, que influenciam a

patogenicidade da espécie pela formação de biofilme. Existem aproximadamente 24 proteínas de agregação de superfície LPxTG, além das adesinas e onze PGCs: PilA (Fms20-Fms21), PilB (EmpA-EmpB-EmpC), Fms14-Fms17-Fms13 (PGC-2 proteins) e Fms11- Fms19-Fms16 codificados pelo gene PGC-4 (Gao; Howden; Stinear, 2018). BepA também é um gene que contribui para formação de biofilme, além de agir no metabolismo de carboidratos como PTS, sua ação é descrita na fisiopatologia da endocardite. (Paganelli et al., 2016, p.03)

A exoenzima gelatinase codificada pelo gene *gelE* é capaz de degradar vários substratos do hospedeiro contaminado, tais como, insulina, caseína, hemoglobina, fibrinogênio, colágeno e gelatina. *gelE* também é capaz de ativar autolisina. Há também a hialuronidase capaz de causar dano tecidual ao catalisar a hidrólise do ácido hialurônico. Outra exoenzima é a citolisina, esta é codificada por 8 genes, através de plasmídeo ou cromossomo, seus alvos são eritrócitos, macrófagos e os leucócitos polimorfonuclear, desencadeando a cascata inflamatória, além das células do hospedeiro a citolisina também pode causar danos a outras bactérias gram positivas (Lee et al., 2019, p.04).

2.3 PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A resistência aos antimicrobianos pode ser intrínseca ou natural, que em sua maioria é mediada pela ausência ou modificação do alvo terapêutico do fármaco, muitas vezes de origem cromossomal e adquirida por transmissão vertical, não apresentando risco terapêutico; e adquirida, cujo desenvolvimento pode acontecer por pressão evolutiva devido ao uso indiscriminado de antibióticos, mutagênese ou transferência horizontal de genes através de componentes móveis (Culyba; Mo; Kohli, 2015, p.02) O *E. faecium* e o *E. faecalis* podem apresentar resistência intrínseca a uma diversidade terapêutica como as cefalosporinas, lincosaminas, e aminoglicosídeos (quadro 02), estas cepas ao adquirirem resistência a vancomicina se tornam multidroga resistente (MDR) e até mesmo panresistentes, limitando o controle e tratamento dessas infecções em ambiente hospitalar (González-Abad; Alonso Sanz, 2019, p.01).

Quadro 02 - *E. faecium* Mecanismos de resistência

Antibiótico	Mecanismo de resistência	Enzima associada	Fenótipo	Intrínseca, esporádica ou associada
Aminoglicosídeos	Mutação ribossômica	-	Resistência com CIM>128.000 mg/mL	Esporádica
	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos	Aac(6')-Ii, Aph(3')-IIIa, Ant(4'')-Ia, Aph(2'')-Ia-Aac(6')Ie, Aph(2'')-Ib, Aph(2'')-Ic, Aph(2'')-Id, Ant(6')-Ia, Ant(3'')-Ia,	Baixos níveis de resistência a tobramicina canamicina, ampicacina e neomicina. Altos níveis de resistência a gentamicina e estreptomicina.	Intrínseca, pJH1, pIP810, Tn5281, pYN134, Tn1546, Inc.18, Tn5382, pR538-1.
	Metiltransferas e Ribossomo-modificadora	EfmM	Resistência à tobramicina e canamicina	Intrínseca
β -lactâmicos	Produção de PBP4/5	-	Baixos níveis de resistência à penicilina. Moderada a alta resistência a cefalosporinas	Intrínseca
	Mutações pontuais em PBP4/5	-	Alta resistência a ampicilina e imipenem	Esporádica
	Alteração na parede celular	L,D-transpeptidase	Resistência aos β -lactâmicos	Intrínseca
	Destruição do anel β -lactâmico	β -lactamases (gene <i>bla</i>)	Resistência aos β -lactâmicos	Tn552
Glicopeptídeos	Síntese de parede celular alternativa	VanA, VanH, VanY, VanX, VanR, VanS	Resistência a vancomicina e teicoplanina	Tn1546, Inc.18
Lincosamidas	Bomba de efluxo		Intrínseca	
	Acetiltransferas e	VatD (SatA), VatH, VgbA, VatE	Resistência a estreptograminas A e B	Transposon
	Alteração no ribossomo	ErmA	MLS _A , MLS _B	Tn554, Tn917, Tn1545
Linezolida	Mutações pontuais no RNAr	G2576T, G2505A, L4(F101L)	Resistência à linezolida	Esporádica

	Metilação do RNAr	Cfr	Resistência à linezolida, lincosamidas e estreptogramina A	pEF-01
Daptomicina	Alteração na ligação em proteínas de membrana	Cardiolipina sintetase, GdpD, LiaF	Resistência a daptomicina, ampliada quando GdpD + LiaF e LiaF + GdpD	Esporádica

Fonte: Adaptado de (Galimad et al., 2011).

Legenda: Perfil de resistência geral dos *E. faecium*, resistências intrínsecas e adquiridas, esporádicas ou mediadas por plasmídeos e transposons.

Tanto o *E. faecium* quanto o *E. faecalis* apresentam resistência intrínseca a doses clínicas de aminoglicosídeos, estes agem inibindo a síntese de proteínas ribossomais, entretanto não conseguem penetrar eficientemente a parede celular dos gram positivos. Além disso, o *E. faecium* produz uma enzima de origem cromossomal responsável pelo aumento do MIC de alguns fármacos, a aminoglicosídeo 6' acetiltransferase [AAC(6')-II], além de possuir uma metiltransferase (efmM) que também confere resistência em a canamicina e seu derivado dibecacina e a tobramicina (Galimand et al., 2011, p.02).

O Sulfametoxazol-trimetoprima inibe a produção de ácidos nucléicos pelos microrganismos, pela inibição da síntese do tetrahydrofolato, entretanto como os *Enterococcus* conseguem adquirir folatos do meio, ultrapassando os efeitos do antibiótico. Em testes *in vitro* os *Enterococcus spp.* apresentam sensibilidade ao fármaco, entretanto é ineficiente no tratamento *in vivo* (Zervos; Schaberg, 1985, p.02).

Os Agentes β -lactâmicos agem através da inibição da síntese da parede celular, inibindo a formação de peptidoglicanos, estrutura formada por pentapeptídeos essencial para manutenção da integridade celular bacteriana. As enzimas responsáveis pelas reações de ligação cruzada entre os peptidoglicanos são denominadas proteínas de ligação à penicilina (PBPs). Os β -lactâmicos são análogos estruturais das moléculas precursoras de pentapeptídeos e se unem de maneira covalente, interrompendo o crescimento normal da parede celular (Zapun; Contreras-Martel; Vernet, 2008, p.01).

Os *Enterococcus* possuem PBPs de baixa afinidade (PBP5 em *E. faecium*, PBP4 em *E. faecalis*) que fazem ligações fracas com os antibióticos β -lactâmicos. Como consequência, as concentrações inibitórias mínimas (CIMs)

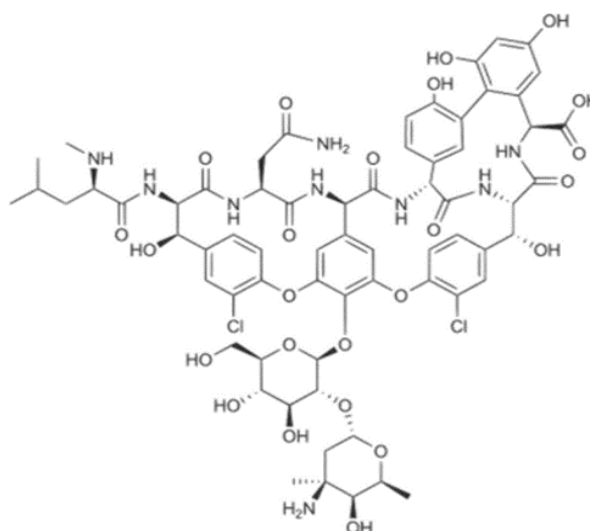
para penicilinas normalmente variam entre 2–8 mg/ml para *E. faecalis* e 8–16 mg/ml para *E. faecium*, valores muito superiores às CIMs observadas nos *Streptococcus spp.* e outros gram-positivos (Zapun; Contreras-Martel; Vernet, 2008, p.03)

De forma adquirida, *Enterococcus* pode desenvolver uma resistência maior às penicilinas por meio da aquisição de β -lactamases, mesmo que raro, ou mutações em PBP4/5. Em 1985, foi descrito a aquisição de β -lactamase por *E. faecalis* através do gene mediado por plasmídeo *bla*, idêntico no *Staphylococcus aureus*, são codificados por transposon Tn552 (Murray, 1992, p.01; Murray; Mederski Samaroj, 1983, p.03).

2.4 VANCOMICINA

Vancomicina é um glicopeptídeo tricíclico formado por sete membros de cadeias peptídicas associado aos dissacarídeos: vancosamina e glicose (figura 02), com peso molecular de 1485 Da, sendo mais pesado que os β -lactâmicos. Desde 1956, este antimicrobiano é aplicado na clínica para tratar infecções causadas por bactérias Gram-positivas, tais como: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *Streptococcus viridans*, *Enterococcus spp.*, algumas espécies de *Bacillus* e *Actinomyces* (Bruniera et al., 2015, p.02; Gupta; Biyani; Khaira, 2011, p.02; Rubinstein; Keynan, 2014, p.01).

Figura 02 - Estrutura química da vancomicina



Fonte: Rubinstein e Keynan (2014).

Legenda : A vancomicina é uma molécula complexa e possui uma estrutura química caracterizada por anéis químicos e diversas funções orgânicas. Sua estrutura inclui três componentes principais: uma cadeia peptídica, uma cadeia dissacarídica e um grupo lipofílico.

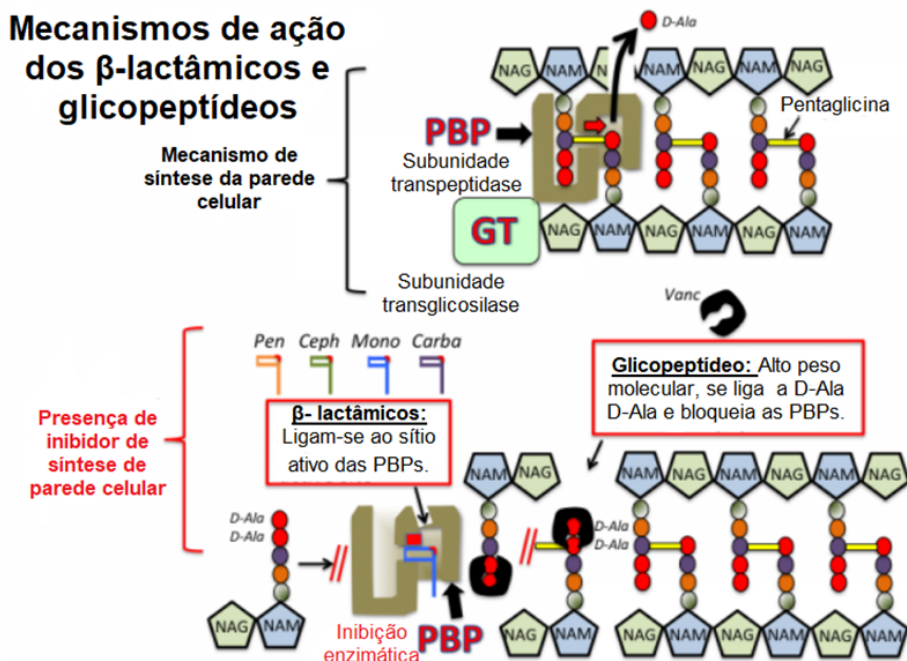
Desenvolvida em 1952 por Edmund Kornfeld, da empresa Eli Lilly, a partir de uma bactéria Gram positiva, isolada de amostras de solo, chamada *Amycolatopsis orientalis*; rapidamente foi adotada como forma de tratamento para infecções por gram positivos resistentes aos β -lactâmicos, como o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *S. epidermidis* metilina resistente (MRSE) e infecções pneumocócicas resistente às penicilinas, que emergiram nesta época (Gould, 2016, p.02).

O medicamento é aplicado por infusão intravenosa, aproximadamente 5% da dose é metabolizada, em maior parte é excretado majoritariamente por filtração glomerular. Até a década de 70', a nefrotoxicidade e ototoxicidade, eram um fator limitante ao uso do fármaco no ambiente hospitalar, entretanto após mudanças na sua formulação estes efeitos colaterais se tornaram raros e o antibiótico até os dias atuais é utilizado no tratamento de infecções por bactérias Gram positivas (Bruniera et al., 2015, p.05). Também é possível identificar em alguns pacientes uma reação de hipersensibilidade à vancomicina, especialmente quando utilizada com outras drogas, chamada de síndrome do homem vermelho (Neto et al., 2021, p.03).

2.4.1 Mecanismo de Ação

A vancomicina liga-se a porção terminal D-Ala-D-Ala (undecaprenil-difosfo-N-acetilmuramoil-[N-acetilglicosamina]-L-alanil- γ -D-glutamil-L-lysyl-D-alanil-D-alanina), um intermediário no processo de maturação da do peptidoglicano, inibindo a ação das proteínas de ligação a penicilina (PBPs) e consequentemente a síntese da parede celular (Stogios; Savchenko, 2020, p.02). Enquanto os β -lactâmicos se ligam aos sítios ativos da transpeptidase, a vancomicina impede a ligação das PBPs ao substrato (Figura 03)(Clarkson, 2022, p.02).

Figura 03 - mecanismo de ação dos fármacos β -lactâmicos e glicopeptídeos



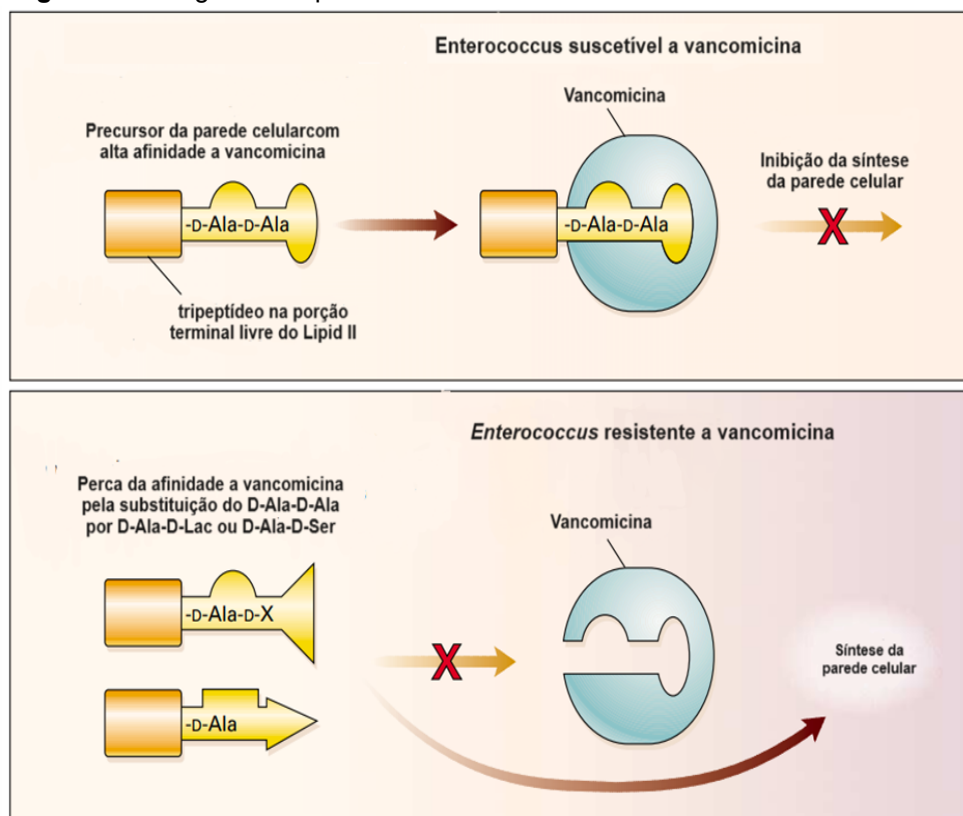
Fonte: extraído e adaptado de Clarkson, 2022.

Nota: Na ausência da ação de fármacos a síntese da parede celular segue pela ação dos PBPs catalisando ligações cruzadas entre cadeias adjacentes, o que envolve a remoção de um resíduo terminal de D-alanina de um dos precursores de peptidoglicano. Glicosiltransferases (GT), que existem como subunidades separadas ou estão fortemente associadas às transpeptidases. Na presença de um inibidor glicopeptídico, a síntese da parede celular é interrompida pelo bloqueio do sítio de ligação dos PBPs.

2.4.2 Mecanismos de Resistência Antimicrobiana à Vancomicina

O gênero *Enterococcus* adquiriu a resistência aos glicopeptídeos, vancomicina e teicoplanina, através de modificações na síntese dos peptidoglicanos pela substituição da estrutura D-Alanina-D-Alanina (D-Ala-D-Ala) por D-Alanina-D-Lactato (D-Ala-D-Lac) ou D-Alanina-D-Serina (D-Ala-D-Ser) na porção terminal livre do Lipid II, diminuindo em baixos ou altos níveis a afinidade da vancomicina e outros glicopeptídeos a porção terminal (figura 04). Atualmente, nove fenótipos estão envolvidos na resistência à vancomicina (Arthur; Quintiliani R., 2001, p.01).

Figura 04 - Diagrama esquemático do mecanismo de resistência à vancomicina.



Fonte: Extraído e adaptado de Murray, 2000.

Legenda: *Enterococcus* suscetível a vancomicina sintetiza precursor da parede celular com a porção terminal D-Ala-D-Ala, após a translocação do citoplasma para a superfície celular, esses precursores se ligam à vancomicina com alta afinidade; uma vez ligados, não conseguem participar da síntese da parede celular. *Enterococcus* resistentes à vancomicina, geram precursores com terminações diferentes (D-Ala-D-Lac, D-Ala ou D-Ala-D-Ser), que têm baixa afinidade pela vancomicina e, portanto, podem continuar, em grande parte, a serem usados na síntese da parede celular.

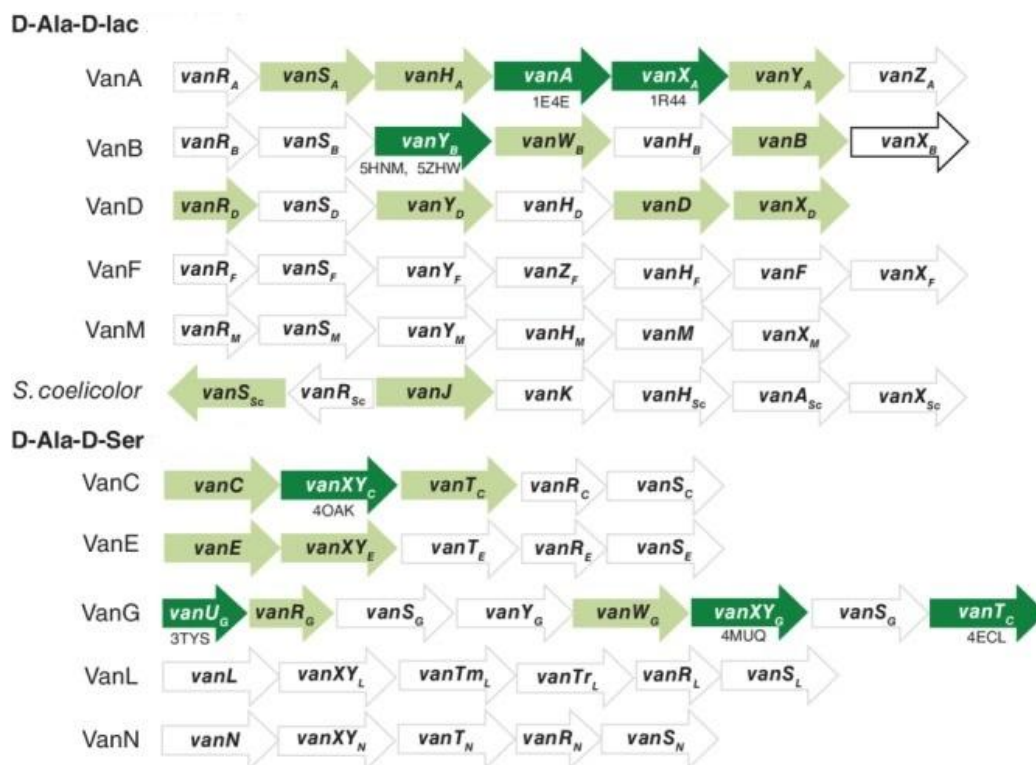
Nota: "D-Ala-D-X"; D-Ala-D-Lac (Lactato) ou D-Ala-D-Ser (Serina); Ala - Alanina.

O fenótipo de resistência denominado *vanA* e seus homólogos (*vanB*, *vanD*, *vanF*, *vanM*) estão relacionados ao mecanismo onde ocorre a substituição de D-Ala-D-Ala por D-Ala-D-Lac, configurando resistência à vancomicina ao atingir CIM iguais ou superiores a 64 mg/L nos testes de susceptibilidade antimicrobiana de rotina (BrCAST, 2023).

O fenótipo ocorre através da perda de uma ligação de hidrogênio, os genes *vanS*, *vanR* e o cluster *vanHAX* são essenciais para regulação dessa resistência, os genes *vanX* e *vanY* são identificados como genes acessórios (Stogios; Savchenko, 2020, p.02). A mudança de aminoácidos D-Ala-D-Ala para D-Ala-D-Ser configura o fenótipo *vanC* e seus homólogos (*vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanN*) que através da adição de um grupo hidroxila ao peptideoglicano (figura 05), conferem níveis baixos de resistência a vancomicina (CIM 4-32 mg/L). Seu cassete é

formado pelos genes *vanR* e *vanS*, uma ligase que vai ser codificada dependente do genótipo por *vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* ou *vanN*. E os genes *vanT* e *vanXY* (figura 05) exclusivos deste fenótipo (Stogios; Savchenko, 2020, p.09).

Figura 05 - Operons relacionados a resistência a vancomicina



Fonte: Extraído e adaptado de STOGIOS; SAVCHENKO, 2020.

Nota: Cassetes de resistência a vancomicina organizados pelo seu mecanismo, D-Ala-Lac ou D-Ala-Ser.

Legenda: Setas brancas: proteínas descritas como insolúveis pelo centro estrutural de genomas de doenças infecciosas (CSGID). Setas verde claro: Proteínas purificadas pelo CSGID. Setas verde escuro: estruturas cristalinas descritas.

Os genótipos com maior prevalência clínica são *vanA* e *vanB* e seus subtipos *vanB1-3* e *vanB2*, associados às espécies *E.faecium* e *E.faecalis* (Simonsen et al., 2000, p.01). O operon *vanA* é majoritariamente associado ao transposon *Tn1546*, que corresponde a dois genes responsáveis pela transposição do elemento (*orf1* e *orf2*) (Open Reading Frames), e um gene relacionado à resistência à teicoplanina (*vanZ*). A transferência dos alelos de resistência *vanB* ocorre através da aquisição e/ou troca de transposons, tais como *Tn1547*, *Tn5382* e o *Tn1549*, sendo este último comumente identificado em isolados *vanB*. Esse transposon é principalmente cromossômico e é encontrado menos frequentemente em plasmídeos (Ahmed; Baptiste, 2018, p.03).

Os genes *vanA* e *vanB* tem uma organização genética semelhante,

ambos contêm 2 regiões promotoras, que transcrevem 7 fases de leitura aberta (ORFs) (figura 05), se diferenciam por um sistema de sinalização de dois componentes, *vanRB* e *vanSB* e de homólogos do *vanH* e da D-Ala-D-Ala ligase, e das peptidases, *vanX* e *vanY*, codificados através do gene *VanB*. Este não codifica um homólogo do *vanZ* e, em vez disso, codifica uma proteína chamada *vanW*, cujo papel na resistência não é completamente compreendido (Kristich; Rice; Arias, 2014, p.04).

O operon *vanC* é dividido nos subtipos *vanC*, *vanC-1*, *vanC-2* e *vanC-3* sendo encontrado, respectivamente, nas espécies, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus flavescens* (Tabela 01), espécies menos virulentas e com menor incidência clínica que o *E.faecium* e *E.faecalis* (Reynolds; Courvalin, 2005, p.01).

O gene *vanD*, similar ao *vanA*, é constituído de diversas mutações em seus reguladores e não é transferível por conjugação, resultando numa grande diversidade de fenótipos, *vanD*; *vanD1*, *D2*, *D3*, *D4*, *D5*. A sua notificação é limitada, porém, esse gene é normalmente associado ao *E.faecium* (Tabela 01) e pode ser carregado pelo *E.gallinarum VanC* (Boyd; Miller; Mulvey, 2006, p.03; Depardieu et al., 2009, p.01).

O gene *vanE* (homólogo ao *vanC1*) é encontrado na América do Norte e Austrália, adquiridos por um *Cluster* do *Enterococcus faecalis* (Tabela 01) (ABADÍA-PATÍÑO et al., 2004; BOYD et al., 2002). Outro homólogo do *vanC*, o gene *vanG* encontrado no *E.faecalis* ao contrário de seus similares (*VanE*, *VanL* e *VanN*) é transferível, através de plasmídeo conjugado (BOYD et al., 2006).

Os genes *vanL* (similar ao *vanA*) identificado no *E.faecalis*; *vanM* e *vanN* (similares ao *vanC*), identificados no *E.faecium*, são particularmente novos sendo o *VanN* transferível através de plasmídeo (Tabela 01) (Boyd et al., 2008, p.01; Lebreton et al., 2011, p.01).

Tabela 01 - Características dos fenótipos VRE

Van-Ope ron	Espécie relacionada	Resistência a vancomicina/teicoplanina	Expressão do fenótipo	Local e mobilidade
vanA	<i>E.faecium</i> <i>E.faecalis</i>	Altos CIMs para ambos	Induzível	Cromossomo transferível
vanB; vanB1, B2, B3	<i>E.faecium</i> <i>E.faecalis</i>	Alto/intermediário para vancomicina Suscetível a teicoplanina	Induzível	Cromossomo transferível
vanC; vanC1, C2, C3, C4	<i>E.gallinarum</i> <i>E.casseliflavus</i> <i>E.flavescens</i>	Baixa para vancomicina Suscetível a teicoplanina	Constitutiva induzível	Cromossomo
vanD; vanD1, D2, D3, D4, D5	<i>E.faecium</i>	Baixos a altos níveis de resistência para ambos	Constitutiva induzível	Cromossomo
vanE	<i>E. faecalis</i>	Baixo/intermediário para vancomicina Suscetível a teicoplanina	Induzível	Cromossomo
vanG; vanG1, G2	<i>E. faecalis</i>	Baixos níveis para vancomicina Suscetível a teicoplanina	Induzível	Cromossomo transferível
vanL	<i>E. faecalis</i>	Baixos níveis para vancomicina Suscetível a teicoplanina	Induzível	Cromossomo
vanM	<i>E. faecium</i>	Altos CIMs para ambos	Induzível	Desconhecida transferível
vanN	<i>E. faecium</i>	Baixos níveis para vancomicina Suscetível a teicoplanina	Constitutiva	Plasmídeo transferível

Fonte: Extraído e adaptado de AHMED; BAPTISTE, 2018.

Legenda: fenótipos de resistência a vancomicina e suas características genéticas, suas espécies mais associadas e perfil de resistência relacionado.

2.4.3 Abordagens Terapêuticas em Infecções por VRE

O tratamento de infecções bacterianas depende de vários fatores como local de isolamento, perfil de resistência, quadro clínico e associação medicamentosa (Hollenbeck; Rice, 2012, p.09). A terapêutica para diferentes infecções por *Enterococcus spp.* apresenta abordagens bastante distintas, sendo o *E.faecalis* comumente relacionado aos isolados clínicos de ampla susceptibilidade e o *E.faecium* comumente isolado em infecções multidroga-resistente (Kristich; Rice; Arias, 2014, p.23).

O tratamento consiste no controle da fonte primária da infecção. As indicações terapêuticas utilizadas no tratamento de VRE são as oxazolidinonas, linezolida e tedizolida, lipopeptídeo, a daptomicina, quinupristina/dalfopristina (Q/D) que possui ação limitada ao *E.faecium*; nitrofurantoína e fosfomicina, para ITUs (infecções do trato urinário) sem complicações (quadro 3). O tratamento também pode ser beneficiado pela utilização de sinergismo como β -lactâmicos + aminoglicosídeos ou daptomicina. Outros agentes ainda pouco explorados podem se tornar escolhas de impacto no tratamento de VRE, como a tigeciclina, que ainda não apresenta histórico de resistência entre os *Enterococcus* e alguns lipoglicopeptídeos como telavancina, dalbavancina e oritavancina, ativos contra VanB (O'Driscoll; Crank, 2015).

Quadro 03 - Tratamento sugerido para infecções por *Enterococcus* multidroga resistente.

Tipo de infecção	Antibióticos
Bacteremia	Primeira escolha: Linezolida, Daptomicina. Alternativa: Q/D, Daptomicina combinada com Ampicilina, Ceftarolina, Ceftobiprole ou Tigeciclina.
Endocardite	Primeira escolha: Daptomicina. Alternativa: Linezolida ou Daptomicina combinada com Ampicilina, Ceftarolina, Ceftobiprole ou Tigeciclina.
Sistema nervoso central	Primeira escolha: Linezolida, Daptomicina. Alternativa: Q/D, Q/D + Daptomicina.
Intra-abdominal	Primeira escolha: Linezolida, Daptomicina, Tigeciclina. Alternativa: Q/D
Pele e estruturas relacionadas	Primeira escolha: Linezolida, Daptomicina. Alternativa: Tedizolida, Oritavancina, Dalbavancina, Telavancina.
Trato urinário	Primeira escolha: Nitrofurantoína, Fosfomicina, Linezolida Alternativa: Daptomicina + altas doses de Ampicilina, Amoxicilina + Q/D.

Fonte: O autor.

2.5 ENTEROCOCCUS RESISTENTE À VANCOMICINA: PATOGENICIDADE, EPIDEMIOLOGIA E IMPACTO CLÍNICO

Na França, em 1986, foi descrito, por Leclercq *et al.* o primeiro caso de resistência a vancomicina e teicoplanina, mediada por plasmídeos em *Enterococcus faecium*, os microrganismos foram isolados de fezes de dois pacientes diagnosticados com leucemia aguda, que realizaram tratamento seletivo para descontaminação do trato gastrointestinal com canamicina, colistina, nitrofuranos e sisomicina, para realização de transplante de medula, posteriormente os pacientes foram hospitalizados com febre e neutropenia, e foram tratados empiricamente com vancomicina (Leclercq et al., 1988, p.01).

No mesmo ano no Reino Unido, foi reportado por Uttley *et al.* 41 pacientes com nefropatias, que estavam colonizados ou com infecções em diferentes sítios, infecção do trato biliar, intra-abdominal, osteomielite, infecção no sítio do acesso intravascular, pneumonia, infecção do trato geniturinário e peritonite; causado por *E. faecium* ou *E. faecalis* com CIMs >2000 mg/L para vancomicina (Uttley et al., 1989, p.03).

Em 2002, foi identificado o primeiro caso de transferência de resistência pelo *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE) em um paciente de Michigan, EUA. Foi isolado uma cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA) contendo gene *VanA-Tn1546* idêntico ao VRE isolado no mesmo paciente (Chang et al., 2003, p.02), o que levou a um grande impacto no uso clínico da vancomicina, pois esta era uma das primeiras escolhas terapêuticas para tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), outro fator limitante as estratégias terapêuticas é a capacidade de colonização de pacientes por isolados VRE e MRSA simultaneamente (Wang et al., 2020, p.07). Sendo a Austrália com maior incidência de infecções por VRE, entre 39% e 46,8% (Australian Commission on Safety and Quality in Health Care, 2019, p.65). O Estados Unidos destaca-se sendo o segundo país com maior taxa (30%) de isolados clínicos em infecções nosocomiais por VRE, com mais de 50.000 casos reportados por ano e gastos acima de 500 milhões de dólares, associados a alta taxa de mortalidade (23-46%) (CDC, 2019, p.95).

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) categorizou os microrganismos multirresistentes de acordo com sua relevância epidemiológica, sendo prioridade em ações de vigilância, pesquisa e desenvolvimento. Nessa classificação, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e membros da família *Enterobacteriaceae* que são resistentes aos carbapenêmicos foram designados como de prioridade crítica. Enquanto isso, *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, ou com sensibilidade intermediária/resistência à vancomicina, foram classificados como de alta prioridade (OPA/OMS, 2017).

No Brasil, o primeiro caso reportado de VRE estava relacionado a uma infecção por *E. faecium* de fenótipo *VanA*, a paciente de 9 anos de idade, com diagnóstico de anemia aplástica, faleceu ao desenvolver sepse bacteriana. Durante os anos 2000 começaram a ser identificados casos de VRE em diferentes lugares do Brasil, como São Paulo, Rio de Janeiro e Porto Alegre (Ribaset al., 2007, p.01). Nos dias atuais estima-se que 8,7% das infecções relacionadas às instituições de saúde são causadas por VRE e 4,3% de bacteremias, entretanto existe uma notória subnotificação pela falta de estudos sistemáticos relacionados (ANVISA, 2021, p.18).

As infecções por VRE têm grande impacto nas IRAS (Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde), destacando-se o aumento da taxa de mortalidade e o prolongamento da internação hospitalar, resultando em custos mais elevados para o sistema de saúde, o custo diário de um paciente com IRAS é 55% superior ao dos outros pacientes internados (Kiffer et al., 2015, p.01).

Do ponto de vista epidemiológico, a presença de VRE está associada a infecção endógena, originada na própria microbiota do paciente, fenômeno que afeta essencialmente pacientes imunodeprimidos e que apresentam comorbidades. Também está associado a infecção exógena, onde a existência de reservatórios e as vias de transmissão desempenham um papel crítico (CDC, 2019).

As mãos dos profissionais de saúde e as superfícies contaminadas são as principais fontes de transmissão, uma vez que o VRE pode permanecer viável por até 60 minutos nas mãos e até 4 meses nas superfícies. Quando uma

pessoa entra em contato direto com outra pessoa infectada ou com objetos contaminados, ela pode se tornar colonizada por VRE, tornando-se assim um reservatório importante para a disseminação desse microrganismo. O tempo de internação é um fator determinante para o controle da colonização e posterior desenvolvimento sintomático, já que *Enterococcus* resistente a vancomicina consegue colonizar o organismo por longos períodos, em média são necessários 6 meses para não ser mais considerado portador de VRE (ANVISA, 2021, p.19).

A pressão seletiva exerce papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da colonização e infecção por VRE. A utilização da vancomicina foi essencial para que instituições de cuidados terciários se tornassem os principais ambientes de emergência e disseminação desses microrganismos (O'driscoll; Crank, 2015, p.03). A utilização de aminoglicosídeos, clindamicina, metronidazol e carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração, também influenciaram através da supressão da microbiota intestinal, pacientes imunodeprimidos e grupos pediátricos especialmente da hematologia e oncologia estão mais suscetíveis a este processo. Na Europa a pressão seletiva se deu pelo uso da avoparcina (análogo da vancomicina) na pecuária, sendo responsável pela seleção das cepas resistentes e posteriormente sua disseminação no ambiente hospitalar (Flokas et al., 2017, p.02; Joshi; Shallal; Zervos, 2021, p.05).

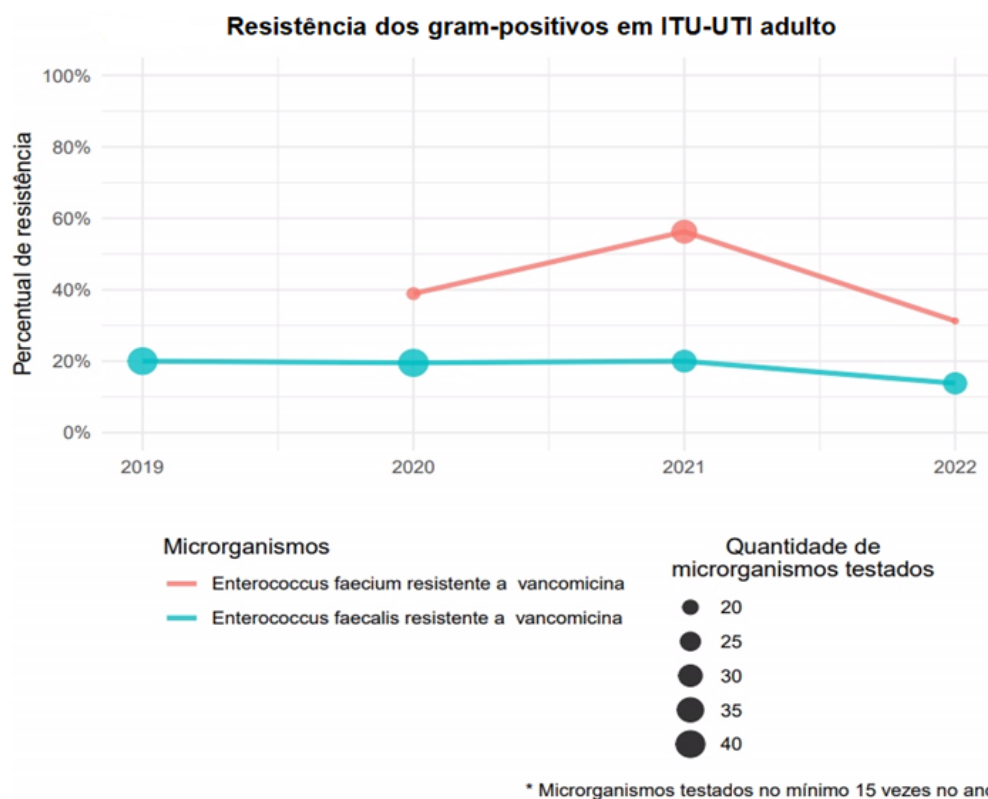
Enterococcus faecium resistente a vancomicina (VREf) é um dos principais microrganismos gram positivos presentes nas IRAS, adquiridas através de internação ou procedimento clínico, pode-se observar uma quantidade maior de isolados identificados resistentes a vancomicina, em comparação ao *E. faecalis*, mesmo estes sendo os mais isolados em amostras clínicas, o *E. faecium* apresenta um perfil de resistência mais amplo, também é observado uma maior frequência dos genes *VanA* e *VanB* nos isolados hospitalares (ANVISA, 2022, p.05; Figueiredo et al., 2012, p.03).

Os grupos de riscos incluem: transplantados, doenças malignas hematológicas, hospitalização prolongada, internação em unidade com alta prevalência de VRE e, também, comorbidades, tais como diabetes, insuficiência renal ou índice APACHE II, elevado especialmente pacientes expostos a longos períodos de internação em UTIs (ANVISA, 2021, p.18).

Pode-se citar também como alguns fatores de risco para bacteremia por VRE, hemodiálise, uso de corticosteróides, agentes antineoplásicos, nutrição parenteral, cirurgia, cateteres de bexiga, neutropenia, mucosite, além do uso inadequado dos antimicrobianos. O tempo de internamento em UTI (unidade de tratamento intensivo) também é um fator crucial para a colonização e surgimento de sintomas. Para o controle destes fatores as instituições de saúde, essencialmente os hospitais terciários realizam notificações compulsórias para programas como o PNPCIRAS (Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde), o diagnóstico epidemiológico nacional também é realizado com auxílio técnico da Comissão Nacional de Prevenção e Controle das IRAS (CNCIRAS), Câmara técnica de Resistência microbiana (CATREM) e CECIHs/CMCIHs, (ANVISA, 2017, p.01; Patel, 2003, p.05).

O PNPCIRAS traz a notificação de dados relacionados a infecção primária da corrente sanguínea associada a cateter venoso central, infecção do trato urinário (ITU) associada a cateter vesical (IPCSL), pneumonia associada à ventilação (PAV) mecânica, infecção relacionada a ferida de sítio cirúrgico (partos cirúrgicos, implantes mamários, artroplastias totais de quadril primárias, artroplastias de joelho primárias e taxas de infecção e bacteremia associada a diálise. de todos os hospitais com leitos de UTIs (adulto, pediátrica e neonatal) (ANVISA, 2021, p.01). Em Pernambuco, o *E. faecium* e *E. faecalis* estão entre as bactérias Gram-positivas mais notificadas em IPCSL, PAV e são as únicas relatadas em infecções do trato urinário em UTIs (adulto), onde VREf apresenta entre 40%-60% de percentual de resistência entre o período de 2020-2022. Pode-se observar a influência do advento da pandemia do COVID-19, nas taxas de notificação de VREf, enquanto o *E. faecalis* manteve a média do seu percentual de resistência em 20% (Figura 06) (ANVISA, 2021).

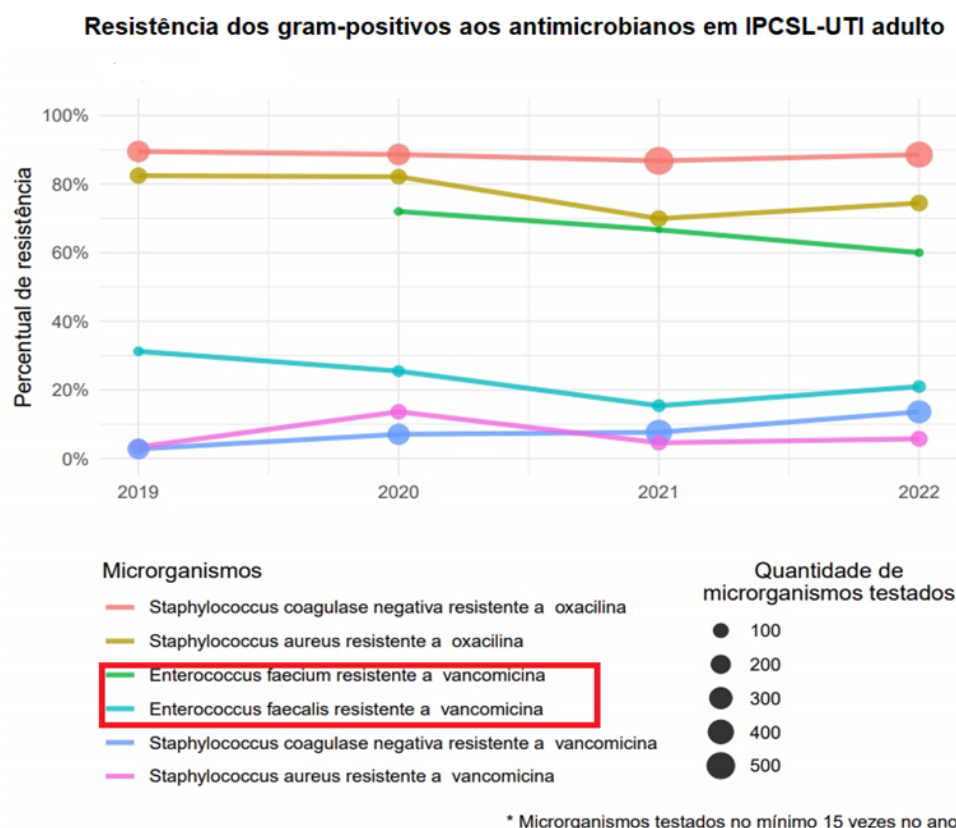
Figura 06 - Percentual de resistência dos isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* notificados entre 2019 e 2022 de infecções do trato urinário (ITU) em UTIs adulto no Estado de Pernambuco.



Fonte: (ANVISA, 2021)

Em infecções primárias da corrente sanguínea relacionadas a cateter (IPSCCL) o *E. faecium* apresentou percentuais de resistência entre 60% e 70%, tendo seu ápice em 2020, enquanto o *E. faecalis* mantém um percentual de resistência estável entre 20%-30% (Figura 07) (ANVISA, 2021, p.06).

Figura 07- Percentual de resistência dos Gram-positivos isolados entre 2019 e 2022 em infecções primárias da corrente sanguínea (IPCSL) em UTIs adulto no Estado de Pernambuco.



Fonte: (ANVISA, 2021)

A pandemia de COVID-19, durante 2020-2022 trouxe a tona um aumento considerável na utilização de antibióticos, pacientes tinham um perfil específico marcado pela necessidade de passar períodos longos internados, além de receberem terapia empírica com antibióticos para o quadro sintomático da fase aguda de do COVID-19. Nos Estados Unidos as infecções hospitalares resistentes e as mortes aumentaram pelo menos 15% durante o primeiro ano da pandemia. A taxa de casos de VRE aumentou 16% entre 2019 e 2020, revertendo substancialmente a diminuição dessas taxas que ocorriam desde 2012 (CDC, 2022).

2.6 DISSEMINAÇÃO CLONAL

Clones são cepas bacterianas pertencentes à mesma linhagem, células idênticas. O *Enterococcus faecium* destaca-se em relação às outras espécies do gênero por suas linhagens genéticas presentes em surtos hospitalares,

pertencentes ao clado A1. Atualmente, de acordo com o PubMLST a espécie possui aproximadamente 2000 tipagens por MLST do ST1 ao ST2.410 (Jolley; Bray; Maiden, 2018).

A primeira linhagem clonal relacionada a surtos hospitalares identificada foi a ST17, correlacionada a resistência a ampicilina e forte expressão do gene *esp*. Esta assimilou os genes de resistência *vanA* e *vanB* e atualmente, denominada complexo cc17, abrange a maior parte das linhagens clonais de infecções nosocomiais. Uma das sequências mais pertinentes é o ST80, frequentemente associado às IRAS, e o ST796, este último se tornou uma cepa endêmica para o gene *VanB*, através da aquisição dos Tn1549 e Tn916, juntamente com plasmídeos, ilhas genômicas etc. Outra tipagem ST1421 participa da manutenção da maior concentração de *VanA* em relação a *VanB* no ambiente hospitalar (O'Toole *et al.*, 2023, p. 05).

Na América do Sul, a cepa mais comumente relacionada a prevalência de *E. faecium* no ambiente hospitalar é a ST412, no Brasil as cepas relacionadas ao complexo CC17 estão normalmente associadas a casos esporádicos, a ST50, ST115, ST97 e ST164, enquanto a cepa ST114 que não faz parte do complexo CC17 é a mais relacionada a surtos hospitalares (Palazzo *et al.*, 2011, p.04). Nesse sentido, a investigação da diversidade clonal de *Enterococcus faecium* através da tipagem molecular destes isolados podem rapidamente ajudar no rastreio de surtos, adaptar estratégias terapêuticas e no manuseio da internação de pacientes (Pearce *et al.*, 1998, p.05).

2.7 FERRAMENTAS MOLECULARES PARA AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO GENÉTICA BACTERIANA

Técnicas moleculares são essenciais para definição de novos estudos e conceitos epidemiológicos, a maior vantagem das técnicas de identificação baseadas em DNA é que os métodos se concentram na composição única de ácidos nucleicos dos microrganismos, em vez da expressão fenotípica dos produtos codificados pelo respectivo gene. A taxonomia polifásica, por exemplo, se

beneficia combinando informações fenotípicas e genotípicas e forma a base para a bacteriologia sistemática atual (Domig; Mayer; Kneifel, 2003, p.02).

Novas técnicas são desenvolvidas e aperfeiçoadas anualmente, pode-se citar a análise de plasmídeo que rapidamente chegou ao desuso pela sua baixa reprodutibilidade, uma vez que, os plasmídeos são componentes móveis facilmente adquiridos e perdidos. Metodologias baseadas em Southern blot de DNA cromossomal como Ribotipagem, RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição), o polimorfismo é identificado dentro e adjacente aos genes cromossomais que carregam a sequência utilizada. Técnicas baseadas em PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) como RAPD (Amplificação aleatória de DNA polimórfico), REP (Sequências extragênicas repetitivas de palíndromos), ERIC (Região de consenso intergênica de Enterobactérias) e várias outras que se beneficiam da ampliação de regiões conservadas através de pouca quantidade de material genético. Além disso, há análise de macrorestrição. As técnicas mais empregadas são o PFGE (eletroforese em gel de campo pulsado), considerado um dos melhores métodos de tipagem, pela alta taxa de reprodutibilidade e poder discriminatório e a Tipagem de Sequência Multilocus (MLST) que não é muito utilizada para dados epidemiológicos entre laboratórios, suas amostras são dificilmente transportadas (Stefani; Agodi, 2000).

No entanto, no cotidiano clínico, para a grande maioria dos patógenos bacterianos, a cultura ainda permanece o padrão-ouro do diagnóstico, geralmente fornecendo um diagnóstico microbiológico em 1 a 3 dias, seguido dos resultados de susceptibilidade aos antibióticos, porque o acesso a essas tecnologias e mão de obra especializada ainda é limitado até mesmo em hospitais de cuidados terciários, (Krishna; Cunnion, 2012, p.03).

2.7.1 ERIC-PCR

Genomas bacterianos são simplificados, no entanto, várias famílias de sequências curtas, repetitivas e intercaladas (30-150 pb) foram descritas em bactérias (Lupski e Weinstock 1992; Bachellier et al. 1996; Tobes e Ramos 2005). As sequências ERIC, semelhantes às regiões REP (sequência palindrômica extragênica repetitiva), foram primeiramente descritas em *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* sorovar *typhimurium* e outros membros da Família *Enterobacteriaceae*, bem como

em *Vibrio cholerae*. São formados por sequências intergênicas, conservadas, regiões não codificantes. A maioria das sequências curtas repetitivas bacterianas são palíndromos (apresentam simetria dupla na sequência de ácidos nucleicos) incompletos de 127 pb (Ahamdi; Siasi Torbati; Amini, 2023, p.01; Hulton; Higgins; Sharp, 1991, p.06).

Essas sequências, atualmente, são reconhecidas em muitos genomas bacterianos, além da Família *Enterobacteriaceae*, atualmente, também são descritas em microrganismos Gram positivos incluindo *Enterococcus faecium*. Essa diversidade evoca os processos de evolução entre cepas bacterianas dentro de uma espécie. A variabilidade clonal é avaliada por primers homólogos a sequências ERIC, em que os padrões encontrados através da reação em cadeia da polimerase (PCR), avalia a proximidade filogenética com o auxílio de diferentes tipos de software, como o GelClust (Ranjbar et al., 2017, p.06) É uma tecnologia de genotipagem simples, resolutive e econômica para discriminar diferentes tipos de cepas em estudos epidemiológicos, que pode ser aplicada de forma mais rápida e fácil comparada a PFGE (Shangkuan et al., 2000, p.02).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a relação genética entre cepas de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina, a partir de amostras clínicas de pacientes assistidos em hospital terciário do Recife.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana à vancomicina dos isolados selecionados para esta pesquisa;
- Analisar a variabilidade clonal entre os isolados de *Enterococcus faecium*. estudados;
- Correlacionar características epidemiológicas dos isolados avaliados à diversidade genética identificada.

4 METODOLOGIA

Trata-se de um estudo epidemiológico retrospectivo, baseado em dados secundários obtidos de um hospital terciário do Recife, fornecidos pelo Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE). Foram analisadas de forma quantitativa e qualitativa a relação clonal entre isolados selecionados pertencentes a espécie *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina.

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo utilizou dados secundários de pacientes e seguiu as recomendações da Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (BRASIL, 2012). Este trabalho está vinculado ao Programa de Vigilância e Estudo de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos, em andamento com a participação do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE) e do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital das Clínicas da UFPE para o estudo da epidemiologia de resistência local entre amostras de espécies de importância clínica.

A proposta foi apreciada pelo Comitê de Ética, em Pesquisa do IAM, com o título “Acervo Microbiológico para Implantação de Programa de Vigilância e Estudo da Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos: Estudo genético dos Determinantes de Resistência Antimicrobiana entre Isolados Clínicos Bacterianos”, sendo sua execução aprovada (número CAAE 45080915.0.0000.5190; parecer número: 1.190.837).

4.2 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Para obtenção e identificação dos isolados desejados, foi criado um banco de dados em formato de planilha do Microsoft Excel® com as seguintes informações: sítio de isolamento, tipo de cultura, data do exame, clínica de origem, microrganismo e o fenótipo de resistência, sendo possível correlacionar epidemiologicamente a diversidade clonal identificada nos isolados selecionados para este estudo. Foram selecionados por conveniência entre 180 isolados pertencentes ao acervo do IAM, 46 isolados identificados como *Enterococcus*

faecium e caracterizados entre setembro de 2021 e janeiro de 2023 que apresentaram fenótipo de resistência a vancomicina (CIM>4 mg/L).

4.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE À VANCOMICINA

Os isolados ao chegarem na rotina laboratorial, foram identificados e realizado a técnica de microdiluição em caldo, padrão ouro para avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos utilizando uma placa de 96 poços contendo um volume de 50 µL de diluições seriadas de vancomicina em cada poço com concentrações compreendidas entre 0,5 µg/mL e 256 µg/mL e preparadas em meio de cultura Caldo Müller-Hinton Cátion Ajustado (CMHCA). Foi adicionado também em cada poço, um volume de 50 µL de uma suspensão bacteriana após ajuste a 0,5 de turbidez na escala nefelométrica de McFarland e diluição de 1000 vezes em solução salina 0,9%, perfazendo um volume final de 100 µL para cada microdiluição avaliada. Este teste utilizou como controle positivo uma cepa ATCC, e, como controle negativo, solução salina.

Após 24h de incubação a 35 ± 2 °C foi possível determinar o perfil de resistência à vancomicina pela avaliação da concentração inibitória mínima (MIC). Os dados foram analisados seguindo as recomendações do BrCAST (Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos).

4.4 REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS

As amostras, conservadas em criotubos TSB/Glicerol 15%, foram semeadas por esgotamento em meio ágar sangue e cultivadas a 37°C durante 24h-48h para obtenção de massa biológica suficiente para o desenvolvimento das etapas posteriores.

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA

Após o período de inoculação, foi coletado com alça estéril de 10 µL toda massa celular presente nas placas de petri, estas adicionadas em microtubos de 1,5 mL contendo 500 µL de tampão tris-EDTA, em proporção 1/10, EDTA/tris a

pH 8,0 foi centrifugada a 6000 rpm por 5 minutos como etapa de lavagem. O sedimento foi ressuspendido por pipetagem, em 200 µL de Tris-EDTA contendo 1% de Triton X-100. As células foram lisadas aquecendo os eppendorfs em banho maria a 100°C por 10 minutos. Após os tubos voltarem a temperatura ambiente, estes foram centrifugados a 13000 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi coletado em novos microtubos e o sedimento desprezado. Após, foi utilizado 50µL de NaCl a 5M e 950 µL de álcool etílico absoluto, as amostras foram homogeneizadas por inversão (10x) e por seguinte foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado. Foi realizada mais uma lavagem com 1mL de álcool etílico a 70% nas amostras seguidas por centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos. Os tubos foram colocados para secar, para remoção do álcool. As amostras foram ressuspendidas com 100 µL de tampão Tris-EDTA, sendo armazenadas a -4 °C, após quantificação espectrofotométrica por meio do aparelho NanoDrop Microvolume Spectrophotometers da ThermoFisher Scientific.

4.6 ERIC PCR

As reações foram realizadas em um volume total de 50µl contendo 18µl de água livre de RNase, 3µl de MgCl₂, 25µl de mix dNTPs (10 mM de cada), 1µl de iniciador ERIC1-R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') e 3µl de DNA molde. As amplificações foram realizadas utilizando termociclador com um programa de ciclagem que consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 48°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final de 72°C por 7 minutos. Todos os produtos foram analisados por eletroforese em géis de agarose 1,5% a 70 V por 70 minutos em tampão TAE 1x (Tris-acetato 40 mM, pH 8,3) e revelados em *DNA Loading dye*. Foi utilizado uma cepa ATCC como controle. Os géis foram visualizados e fotografados sob transiluminador UV.

4.7 ANÁLISE FILOGENÉTICA

A análise filogenética foi realizada com base no padrão de bandamento das diferentes cepas de *Enterococcus* spp. usando o *Phylogenetic Inference Package*, PHYLIP-3.68, após ERIC-PCR. Os dados foram calculados usando

parcimônia. Foi gerado um dendograma baseado no método UPGMA (Método de Grupo de Pares Não Ponderados com Média Aritmética), com tolerabilidade de 1% entre as distâncias detectadas. Os grupos geneticamente relacionados foram agrupados por médias de dissimilaridade baseadas no método interpretativo de Tenover (1995) pelo qual, isolados que apresentaram similaridade $\geq 80\%$ (dissimilaridade $\leq 20\%$) devem ser considerados geneticamente relacionados.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

A amostragem aborda um intervalo de tempo entre exames realizados entre 2021 e 2023, sendo a amostra mais antiga de setembro de 2021 e a mais recente, janeiro de 2023. As espécies de *Enterococcus faecium* foram confirmadas pelo serviço de origem das amostras por rotina clínica de automação (VITEK), análises bioquímicas e antibiograma.

Das 46 amostras analisadas, 27 (58,7%) foram isoladas de pacientes idosos (>60 anos), 12 (27,9%) foram obtidas de pacientes entre 30-60 anos e 7 (15,2%) foram isoladas de pacientes com idade inferior a 30 anos (Tabela 02).

Tabela 02 - Relação entre idade dos pacientes e a amostragem de isolados.

Idade (anos)	Total (n)	%
<30	07	15,2
30-60	12	26,1
>60	27	58,7

Dados obtidos de um hospital terciário do Recife entre 2021-2023.

Fonte: O autor.

Legenda: Isolados catalogados pela respectiva idade dos pacientes, sendo dividido em 3 grupos, jovens <30 anos, idade entre 30-60 anos e idosos com idade superior a 60 anos.

Em relação a clínica de origem 26 (56,5%) isolados pertenciam a clínica médica, 03 (6,5%) foram de UTI e 17 (37%) estavam distribuídos em diferentes enfermarias: DIP (Enfermaria de Doenças Infecto-Parasitárias)(4,3%; n=02), ortopedia (6,5%; n=03), vascular (21,7%; n=10) e urologia (4,3%; n=02) do hospital (Tabela 02).

Tabela 03 – Isolados bancados por clínicas de origem.

Clínica de origem	Total	%
UTI (Unidade de Terapia Intensiva)	3	6,5
Urologia	2	4,3
Ortopedia	3	6,5
DIP (Doenças Infecto-Parasitárias)	2	4,6
Clínica vascular	10	21,7
Clínica médica	26	56,5

Dados obtidos de um hospital terciário do Recife entre 2021-2023.

Fonte: O autor.

Legenda: Relação entre isolados bancados e a clínica de origem dos pacientes.

Com relação ao sítio de isolamento, apenas 01 (2,2%) amostra foi isolada a partir de cultura de secreções (amostra de tecido); 02 (4,3%) amostras foram isoladas através de urocultura (cultura de urina); 01 (2,2%) amostra foi isolada através de hemocultura (cultura de amostras de sangue) e 42 (91,3%) amostras foram obtidas através de cultura de vigilância (Swab retal) (Tabela 03).

Tabela 04 – Sítio de isolamento.

Sítio de isolamento	Total (n)	%
Sangue	01	2,2
Tecidos/partes moles	01	2,2
Urina	02	4,3
Swab retal	42	91,3

Dados obtidos de um hospital terciário do Recife entre 2021-2023.

Fonte: O autor.

Legenda: Relação entre isolados e seus sítios de isolamento, advindos respectivamente de hemocultura, cultura de secreção, urocultura e cultura de vigilância.

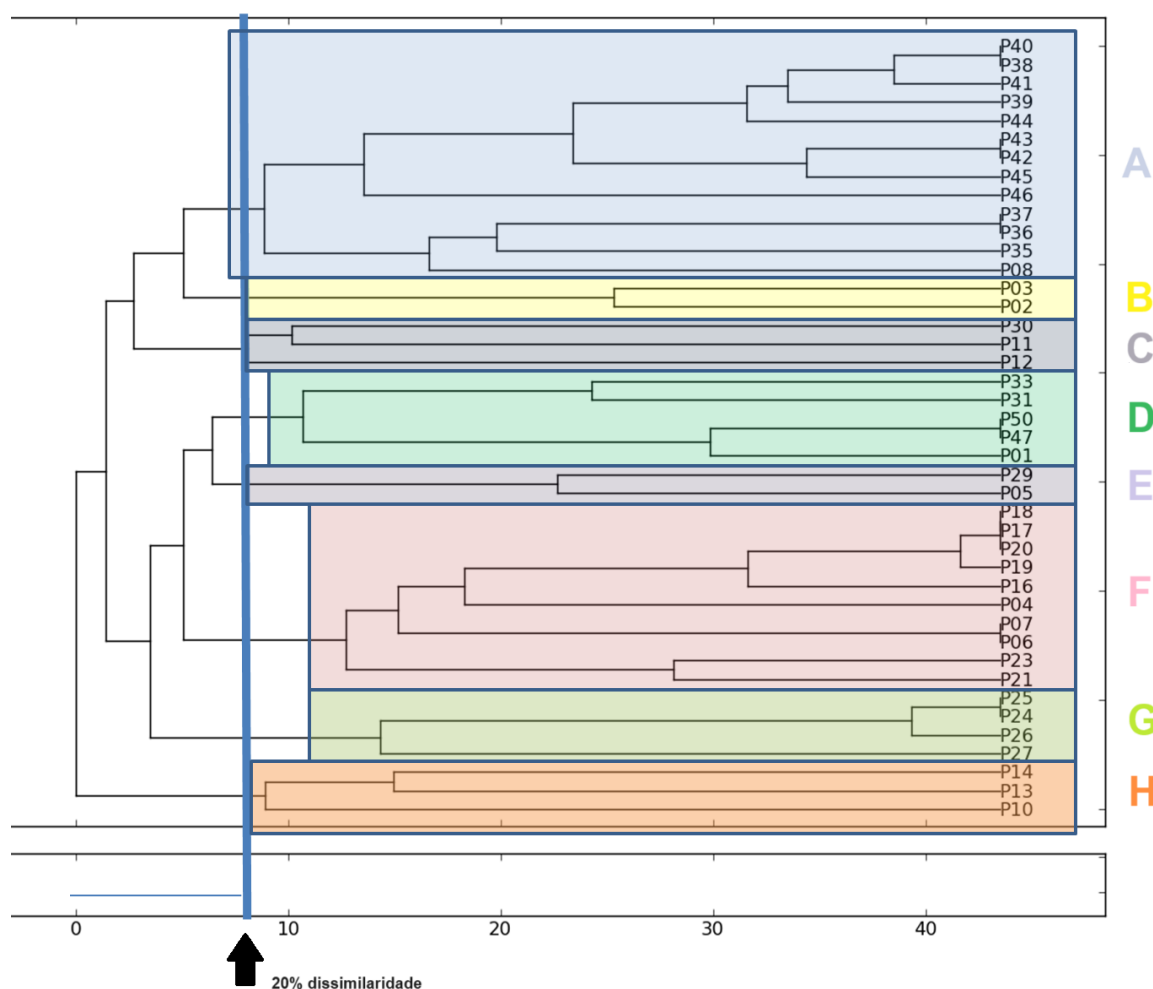
5.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE À VANCOMICINA

Todas as 46 amostras (100%), apresentaram o mesmo perfil de resistência a vancomicina com CIMs acima de 256 µg/mL e genótipos positivos para o gene de resistência *vanA* (conforme dados do banco de cepas de origem).

5.4 ANÁLISE ERIC-PCR

O padrão obtido da análise por ERIC-PCR das 46 amostras pode ser observado na Figura 09. O dendrograma gerado pelo método UPGMA (Método de Grupo de Pares Não Ponderados com Média Aritmética) agrupou os isolados baseados na distância média entre os pares, que variaram de 0 (células idênticas) a 40, observando o critério de interpretação de Tenover (1995), que classifica como isolados geneticamente relacionados aqueles que possuem índice de dissimilaridade até 20%. A tolerância utilizada para a construção do dendrograma foi de 1%.

Figura 08 - Dendrograma dos padrões de ERIC-PCR dos 46 isolados.



Fonte: O autor.

Legenda: Perfis ERIC-PCR em um padrão UPGMA, distinguidos por sua dissimilaridade.
Eixo horizontal: diferenças. Eixo vertical: similaridade

A diversidade genética analisada revelou ainda padrões de bandejamento entre 100 pares de base (pb) e 2 quilobases (kb). Oito clusters

distintos foram identificados. O grupo A englobou o maior número de isolados, com 13 amostras agrupadas (28,3%). Dentro desse grupo, notou-se a presença de 06 clones com similaridade de 100% entre si, incluindo os isolados dos pacientes P38, P40, P42, P43, P36 e P37. O cluster F foi o segundo maior grupo identificado, contendo 10 clones (21,7%), com P17, P18 e P20 apresentando 100% de similaridade genética entre si. Os cluster A e F agruparam 50% dos isolados analisados. Os 23 isolados restantes foram distribuídos entre os seguintes clusters menores: D (10,9%, n=05), G (8,7%; n=04), H e C, ambos com 6,5% dos isolados (n=03), E e B, com 4,3% das amostras tipadas (n=02) cada. Entre quatro isolados (8,7%), não foi obtida qualidade necessária de DNA e foram classificados como não tipáveis (NT), (Tabela 04) .

Tabela 05 – Clusters identificados pelo ERIC-PCR.

Clusters	Total (n)	%
A	13	28,3
F	10	21,7
D	05	10,9
G	04	8,7
H	03	6,5
C	03	6,5
E	02	4,3
B	02	4,3
NT	04	8,7

Fonte: O autor.

Legenda: Isolados divididos em 8 clusters e um grupo NT.

Em relação ao sítio de isolamento, todos os 13 isolados pertencentes ao cluster A foram provenientes de culturas de vigilância (sítio de colonização). Em relação ao grupo F, dos 10 isolados agrupados, um foi proveniente de amostra infecciosa, sendo identificado em uma urocultura e 09 foram obtidos a partir de culturas de vigilância. As demais amostras clínicas também foram agrupadas em clusters distintos: urocultura (clusters B, C e H, com um isolado cada), secreções (um isolado relacionado ao cluster D) e hemocultura (um isolado relacionado ao clusters H). Dessa maneira, não houve predominância clonal em relação às amostras isoladas de sítios infecciosos (Quadro 04).

Quadro 04: Relação entre os dados epidemiológicos e clusters obtidos.

Perfil ERIC-PCR	amostra	idade	Clínica de origem	Data do exame	genótipo	Tipo de cultura
A	P08	70	Clínica médica	4/5/2022	vanA	vigilância
A	P35	17	Vascular	28/12/2021	vanA	vigilância
A	P36	33	Ortopedia	16/12/2021	vanA	vigilância
A	P37	58	DIP	18/10/2021	vanA	vigilância
A	P38	16	Vascular	27/10/2021	vanA	vigilância
A	P39	64	clínica médica	3/11/2021	vanA	vigilância
A	P40	23	clínica médica	10/12/2021	vanA	vigilância
A	P41	85	UTI	21/10/2021	vanA	vigilância
A	P42	68	Vascular	13/9/2021	vanA	vigilância
A	P43	65	Vascular	25/8/2021	vanA	vigilância
A	P44	71	Urologia	16/11/2021	vanA	vigilância
A	P45	65	Vascular	15/10/2021	vanA	vigilância
A	P46	34	Clínica médica	29/10/2021	vanA	vigilância
B	P02	93	Clínica médica	20/7/2021	vanA	urocultura
B	P03	85	Clínica médica	11/8/2021	vanA	vigilância
C	P11	70	Clínica médica	11/5/2022	vanA	urocultura
C	P12	73	Clínica médica	5/8/2022	vanA	vigilância
C	P30	41	UTI	20/11/2021	vanA	vigilância
D	P01	51	Ortopedia	8/7/2021	vanA	secreções
D	P31	71	Urologia	16/11/2021	vanA	vigilância
D	P33	65	Vascular	7/12/2021	vanA	vigilância
D	P47	17	Vascular	NI	vanA	vigilância
D	P50	85	Vascular	NI	vanA	vigilância
E	P05	65	Ortopedia	1/6/2022	vanA	vigilância
E	P29	60	Clínica médica	2/12/2022	vanA	vigilância
F	P04	65	Vascular	11/8/2021	vanA	vigilância
F	P06	70	Vascular	29/4/2022	vanA	vigilância
F	P07	62	Vascular	2/5/2022	vanA	vigilância
F	P16	53	Clínica médica	28/9/2022	vanA	vigilância
F	P17	19	Clínica médica	23/9/2022	vanA	urocultura
F	P18	42	Clínica médica	7/10/2022	vanA	vigilância
F	P19	81	Clínica médica	7/10/2022	vanA	vigilância
F	P20	63	Clínica médica	22/11/2022	vanA	vigilância
F	P21	31	Clínica médica	28/12/2022	vanA	vigilância
F	P23	34	DIP	30/12/2021	vanA	vigilância
G	P26	73	Clínica médica	5/8/2022	vanA	vigilância
G	P27	16	Clínica médica	5/9/2022	vanA	vigilância
G	P24	60	Clínica médica	9/1/2023	vanA	vigilância
G	P25	37	Clínica médica	9/12/2021	vanA	vigilância
H	P10	68	UTI	22/3/2022	vanA	urocultura
H	P13	19	Clínica médica	4/8/2022	vanA	hemocultura
H	P14	31	Clínica médica	6/9/2022	vanA	vigilância
NT	P09	62	Vascular	2/5/2022	vanA	vigilância
NT	P15	31	Clínica médica	30/9/2022	vanA	vigilância
NT	P28	36	Clínica médica	21/11/2022	vanA	vigilância
NT	P22	79	Vascular	5/1/2022	vanA	vigilância

Fonte: O autor.**Legenda:** NT: Não tipados; NI: Não informado; DIP: Doenças Infecto-Parasitárias. UTI: Unidade de terapia Intensiva

6 DISCUSSÃO

Enterococcus faecium resistente a vancomicina (VREf) é um dos patógenos mais predominantes nas infecções hospitalares, estando presente em aproximadamente 40% de todas as infecções por *Enterococcus* spp, graças aos seus fatores de virulência, capacidade de colonizar indivíduos por longos períodos e, através do genoma flexível, adaptou-se ao ambiente hospitalar (Gao; Howden; Stinear, 2018, p.01), onde existe uma linha tênue entre a passagem de colonização para infecção e surtos endêmicos e pandêmicos pela mesma linhagem clonal adaptada àquele ambiente (Thierfelder et al., 2012, p.01).

Entre os grupos de risco, os idosos (>60 anos) , estavam presentes em mais da metade dos casos avaliados (58,7%), sendo esse grupo distribuído em diferentes enfermarias, mostra a fragilidade da exposição destes pacientes, a relação entre idade e infecção por VRE pode ser influenciada por diversos fatores, pacientes já debilitados por outras enfermidades, expostos a longos períodos de internação e a tratamentos prévios debilitantes, desta maneira a infecção hospitalar por VRE ocorre de maneira oportunista em pacientes idosos, que podem frequentemente estar associados a outras infecções por bactérias multirresistentes (Silva et al., 2021, p.02; MAGIORAKOS et al., 2012, p.02). Estes pacientes infectados com VRE estão expostos a altas taxas de mortalidade, que variam entre 32%-66%, além disso estudos demonstram que infecções associadas a VRE-*faecium*, apresentam maiores riscos de mortalidade em relação ao VRE-*faecalis* (Hemapapairoa et al., 2021).

No presente estudo, todos os isolados VREf analisados foram positivos para o gene *vanA*. Resultado semelhante ao encontrado na literatura, considerando que este gene é o principal mecanismo associado ao fenótipo de resistência à vancomicina no ambiente hospitalar (Kang et al., 2014, p.01). Nos isolados investigados, esse fenótipo demonstrou altos níveis de resistência à vancomicina, com concentrações inibitórias mínimas acima de 256 µg/mL, associado também a altos níveis de resistência à teicoplanina. Este cenário contribui cada vez mais para a utilização dos chamados antimicrobianos de reserva, antibióticos considerados como a última linha para o tratamento de infecções multirresistentes. Esses antibióticos são extremamente caros e a sua utilização está

associada a diversos efeitos colaterais. Estudos apontam que a utilização desses antimicrobianos pode elevar em até R\$ 760 mil as despesas hospitalares com o tratamento, podendo comprometer significativamente os recursos destinados à Saúde Pública (Stagliano, 2021, p.05).

A presença do gene *vanA* foi detectada em nove complexos clonais distintos, abrangendo diversas clínicas, incluindo UTIs, enfermarias e unidades de clínica médica. É importante notar que nenhum desses complexos clonais permaneceu exclusivamente associado a uma única clínica de origem. Isso aponta para uma notável disseminação do mesmo elemento genético de resistência no ambiente hospitalar.

A dispersão dos grupos clonais, em oito distintos clados, corroboram com pesquisas que mostram que surtos de VREf no Brasil são causados por cepas que não compartilham uma história evolutiva comum, enquanto na Europa e Estados Unidos a uma predominância descrita do complexo clonal CC17 qual a maioria dos isolados em surtos hospitalares são seus derivados. A detecção precoce de pacientes colonizados ou infectados com VRE é essencial para que um hospital evite a transmissão nosocomial de VREf (Palazzo et al., 2011, p.04). uma vez que a colonização por esses isolados precede a infecção. Essa colonização pode persistir por até 25 semanas (Shenoy et al., 2014). Campos (2013), observou que o tempo médio para o desenvolvimento de infecção por VREf após a colonização é de 37 dias.

Nesse contexto, o Brasil apresenta uma subnotificação de estudos epidemiológicos moleculares sobre a incidência de surtos causados por cepas de VREf, sendo menor em comparação a países Europeus e nos Estados Unidos (Almeida et al., 2006, p.04). O uso de técnicas moleculares pode auxiliar diretamente na avaliação retrospectiva das infecções por microrganismos multirresistentes e panresistentes. Pode-se citar a identificação dos fenótipos de resistência e de virulência, e a capacidade de rastrear surtos hospitalares, como dados pertinentes para a manutenção dos índices de resistência bacteriana, e para utilização no monitoramento e controle das infecções hospitalares por VRE (Saengsuwan et al., 2021, p.02). Ferramentas como o MLST e o sequenciamento de genoma completo podem descrever detalhadamente a estrutura populacional grande coleção de *E. faecium* de diferentes regiões geográficas e origens (Homan et al., 2002, p.01),

enquanto o PFGE pode ser aplicado para investigação epidemiológica de surtos hospitalares em curtos períodos de tempo pela sua alta capacidade descritiva e de similaridade (Pinholt et al., 2015, p.07). O ERIC-PCR apresentou de forma efetiva a capacidade de agrupar cepas clonais durante um intervalo de tempo significativo (2019-2021).

A maioria dos clones foi isolada de amostras de cultura de vigilância por swab retal, o que reforça o impacto da cultura de vigilância na incidência epidemiológica da disseminação de VREf. Todos os clones identificados pertencentes ao grupo “A”(aproximadamente 28% de todos isolados estudados), por exemplo, foram provenientes de sítios de colonização, podendo este provavelmente ser mais relevante em pacientes colonizados, demonstrando uma possível maior capacidade de virulência.

A cultura de vigilância é uma medida de controle recomendada pela CDC e adotada pela ANVISA, realizada em UTI, unidades com altas taxas de MDR, pacientes com histórico de exposição a antibióticos, internação prolongada, onco-hematológicos, transplantados, contato com 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. Alguns hospitais utilizam-se desta para a identificação precoce de pacientes colonizados, entretanto como sua utilização é associada ao diagnóstico bioquímico e antibiograma, sua aplicação ainda representa um custo relativamente elevado para a realidade de muitos serviços de saúde no Brasil (ANVISA, 2021, p.40).

Três amostras isoladas de paciente assistidos na UTI (uma isolada através de urocultura e duas através de vigilância) compartilhavam clones em outras clínicas de origem, como clínica médica e diversas enfermarias, o que indica que as medidas de prevenção e contenção recomendadas; higienização das mãos, utilização de luvas e batas, alocação dos pacientes em quarto privativo, aventais exclusivos e descartáveis, coorte de pacientes e profissionais, devem ser reforçadas, uma vez que essas medidas combatem de maneira eficaz a disseminação de mecanismos de resistência antimicrobiana no ambiente hospitalar. Dados apresentados pela CDC e ANVISA, incentivam e corroboram a melhor

implementação destas medidas e de acordo com o European Centre for Disease Prevention and Control, aproximadamente 20% a 30% das IRAS são consideradas preveníveis por meio de programas de controle e higiene intensivos (ECDC, 2016; Boyce, 2002; Tacconelli, 2014; ANVISA, 2015).

A atual metodologia laboratorial baseia-se em métodos bioquímicos e sorológicos que podem demorar em torno de 24h-48h para que sejam observados resultados, especialmente em *Enterococcus* que são organismos de crescimento lento (Day et al., 2001, p.03). A realização de estudos epidemiológicos moleculares utilizando ácidos nucleicos podem resumir em horas a escolha terapêutica e abordagem de isolamento, prevenindo e controlando a disseminação clonal e contaminações nosocomiais. A utilização do ERIC-PCR, foi eficiente para determinar a relação genética dos isolados testados, por possuir menor poder discriminatório em relação a outras técnicas como o PFGE e o MLST (Casarez *et al.*, 2007, p.02), seu uso em isolados selecionados em um longo período de tempo 2021-2023, conseguiu correlacionar com precisão a relação genética entre os isolados testados sem haver a distinção de cepas por mutações esporádicas que podem ter surgido neste período.

Neste cenário, especialmente pacientes transferidos de outras unidades hospitalares que carecem de programas de monitoramento microbiológico, enfrentam desafios importantes. Muitas vezes, esses pacientes são encaminhados para atendimentos em hospitais terciários e, nessas circunstâncias, podem servir como potenciais vetores de transmissão desses clones, ampliando o risco de exposição para outros pacientes.

7 CONCLUSÃO

A presente pesquisa revelou resultados significativos relacionados à presença do gene *vanA* em todos os nove clusters de *E.faecium* identificados, dos quais, A e F destacaram-se como os mais frequentes, contribuindo com 50% dos casos analisados. É relevante notar que a maior parte dos pacientes colonizados/infectados foram identificados em pacientes com mais de 60 anos e em clínicas associadas a processos patológicos crônicos. Essa associação entre a idade dos pacientes e a presença de VRE pode ter implicações importantes para a saúde pública, uma vez que os pacientes idosos muitas vezes apresentam condições médicas subjacentes, sistema imunológico enfraquecido e maior exposição a tratamentos antimicrobianos, tornando-os mais susceptíveis a infecções por bactérias resistentes.

Esses resultados ressaltam a necessidade contínua de vigilância e controle de infecções em ambientes de assistência à saúde, especialmente em pacientes hospitalizados. Além disso, a diversidade clonal observada sugere a possibilidade de transmissão intra-hospitalar dessas cepas, reforçando a importância de medidas de prevenção de infecções e a adoção de estratégias para limitar a disseminação de VRE.

Os achados reforçam a necessidade da implementação de ferramentas moleculares no cotidiano clínico, especialmente em um ambiente hospitalar que atende casos de alta complexidade, como pacientes de oncologia e transplantados, para a prevenção e rastreamento de surtos hospitalares, controle de colonização por bactérias multirresistentes e diminuição do surgimento de novos perfis de resistência antimicrobiana.

8 REFERÊNCIAS

ABADÍA-PATÍÑO, L. et al. VanE-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* clinical isolates from Australia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 12, 2004.

ANVISA, programa nacional de prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência de saúde 2021 a 2025, **Agência Nacional De Vigilância Sanitária**, 2022. Disponível em <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/pnpciras_2021_2025.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2023.

ANVISA, 2019, Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde no 20: Incidentes Relacionados à Assistência à Saúde - 2018, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 550, 2018.

ANVISA, Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde no 15: Incidentes Relacionados à Assistência à Saúde - 2016, **Agência Nacional De Vigilância Sanitária**, 2017. Disponível em <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/boletim-seguranca-do-paciente/boletim-seguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude-no-15.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2023.

AHAMDI, F.; SIAZI TORBATI, E.; AMINI, K. A Comparative Study of ERIC-PCR and BOX-PCR Methods for Evaluation of Genomic Polymorphism among Multidrug-Resistant *Enterococcus faecium* Clinical Isolates. **mljgoums**, v. 17, n. 1, p. 13–19, 1 jan. 2023.

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**, 2018.

ALMUZARA, M. *Enterococcus* spp.: Resistencia antimicrobiana en infecciones intrahospitalarias. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, 1 jan. 2013.

ANVISA. Prevenção de infecções por microrganismos multirresistentes em serviços de saúde. Boletim Informativo, **Agência Nacional De Vigilância Sanitária**, 2021. Disponível em <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/manual-prevencao-de-multirresistentes7.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2023.

ANVISA, A. N. D. V. S. Relatório: Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e resistência microbiana (RM) em serviços de saúde UF: Pernambuco, **Agência Nacional De Vigilância Sanitária**, 2021 Disponível em https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/servicosdesaude/prevencao-e-controle-de-infeccao-e-resistencia-microbiana/copy_of_infeccao-relacionada-a-assistencia-a-saude>. Acesso em: 20 abr. 2023.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the Enterococcus: Beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, 2012.

ARTHUR, M.; QUINTILIANI R., J. Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide resistance in enterococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2001.

BISSOLI, A. Z. **Importância da cultura de vigilância na segurança de pacientes hospitalizados**. [s.l: s.n.].

BONAPARTE, C.; KLEIN, G. **International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of Bifidobacterium, Lactobacillus and related organisms**. Minutes of the meetings, 31 August 2011, Egmond aan Zee, The Netherlands. International journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 62, n. Pt 10, p. 2546–2548, 2012.

BOYD, D. A. et al. Molecular characterization of the vanE gene cluster in vancomycin-resistant Enterococcus faecalis N00-410 isolated in Canada. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, 2002.

BOYD, D. A. et al. VanG-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strains isolated in Canada. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 6, 2006.

BOYD, D. A. et al. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, 2008.

BOYD, D. A.; MILLER, M. A.; MULVEY, M. R. *Enterococcus gallinarum* N04-0414 harbors a VanD-type vancomycin resistance operon and does not contain a D-alanine:D-alanine 2 (ddl2) gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 3, 2006.

BOYCE, J. M., & Pittet, D, Guideline for hand hygiene in health-care settings: Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. **In American Journal of Infection Control** (Vol. 30, Issue 8), 2002

BRUNIERA, F. R. et al. The use of vancomycin with its therapeutic and adverse effects: A review. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 4, 2015.

CAMPOS, Paola Amaral de. Perfil epidemiológico de infecção por enterococos resistentes à vancomicina em hospital universitário com alta prevalência de pacientes colonizados. 2013. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - **Universidade Federal de Uberlândia**, Uberlândia, 2013.

CASAREZ, Elizabeth A.; PILLAI, Suresh D.; DI GIOVANNI, George D. Genotype diversity of *Escherichia coli* isolates in natural waters determined by PFGE and ERIC-PCR. **Water research**, v. 41, n. 16, p. 3643-3648, 2007.

CATTOIR, V. The multifaceted lifestyle of enterococci: genetic diversity, ecology and risks for public health. **Current Opinion in Microbiology**, v. 65, p. 73–80, 1 fev.

2022.

CDC, Antibiotic resistance threats in the United States, 2019, Atlanta, **GA: U.S. Department of Health and Human Services**. Disponível em <<https://www.cdc.gov/drugresistance/Biggest-Threats.html>>. Acesso em: 3 set. 2023.

CDC, COVID-19: U.S. Impact on Antimicrobial Resistance, Special Report 2022 Atlanta, **GA: U.S. Department of Health and Human Services**, 2022, Disponível em <<https://www.cdc.gov/drugresistance/covid19.html>>. Acesso em: 20 abr. 2023.

CHANG, S. et al. Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the vanA Resistance Gene. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 14, 2003.

CHOW, J. W. Aminoglycoside resistance in enterococci. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 2, 2000.

CLARKSON, W. C. **Why Glycopeptides Are Ineffective Against Gram-negative Bacteria**. Disponível em: <https://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/glycopeptide_pharm>. Acesso em: 3 set. 2023.

COMMISSION ON SAFETY, A.; IN HEALTH CARE, Q. **AURA 2019: Third Australian report on antimicrobial use and resistance in human health**, 2019, Disponível em <<https://www.safetyandquality.gov.au/antimicrobial-use-and-resistance-in-australia/>>. Acesso em: 3 set. 2023. Acesso em: 20 abr. 2023.

CULYBA, M. J.; MO, C. Y.; KOHLI, R. M. Targets for Combating the Evolution of Acquired Antibiotic Resistance. **Biochemistry**, v. 54, n. 23, 2015.

SILVA, Natalia CZ et al. The impact of ageing on the incidence and mortality rate of bloodstream infection: A hospital-based case-cohort study in a tertiary public

hospital of Brazil. **Tropical Medicine & International Health**, v. 26, n. 10, p. 1276-1284, 2021.

DAY, A. M. et al. Evaluation of a biochemical test scheme for identifying clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 5, 2001.

DEPARDIEU, F. et al. New combinations of mutations in VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus avium* strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, 2009.

DEVRIESE L. A. AND POT, B. The genus *Enterococcus*. Em: WOOD B. J. B. AND HOLZAPFEL, W. H. (Ed.). **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Boston, MA: Springer US, 1995. p. 327–367.

DOMIG, K. J.; MAYER, H. K.; KNEIFEL, W. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp.: 1. Media for isolation and enumeration. **International Journal of Food Microbiology**. Anais...2003.

FLOKAS, M. E. et al. Vancomycin-resistant enterococci colonisation, risk factors and risk for infection among hospitalised paediatric patients: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2017.

FORREST, G. N. et al. Single center experience of a vancomycin resistant enterococcal endocarditis cohort. **Journal of Infection**, v. 63, n. 6, 2011.

FRIEDEN, T. R. et al. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in New York City. **The Lancet**, v. 342, n. 8863, 1993.

FURTADO, G. H. C. et al. Incidência de *Enterococcus* resistente à vancomicina em hospital universitário no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 1, p. 41–46, jan. 2005.

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, 2011.

GAO, W.; HOWDEN, B. P.; STINEAR, T. P. Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. **Current Opinion in Microbiology**, 2018.

GARRISON, R. N. et al. Enterococcal bacteremia: Clinical implications and determinants of death. **Annals of Surgery**, v. 196, n. 1, 1982.

GONZÁLEZ-ABAD, M. J.; ALONSO SANZ, M. Surveillance of multiresistance: vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. **Anales de Pediatría**, v. 91, n. 4, 2019.

GOULD, K. Antibiotics: From prehistory to the present day. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2016.

GUPTA, A.; BIYANI, M.; KHAIRA, A. Vancomycin nephrotoxicity: Myths and facts. **Netherlands Journal of Medicine**, 2011.

GUPTA, K.; BHADLIA, N. Management of urinary tract infections from multidrug-resistant organisms. **Infectious Disease Clinics of North America**, 2014.

HEMAPANPAIROA, J., et al. Does vancomycin resistance increase mortality? Clinical outcomes and predictive factors for mortality in patients with *Enterococcus faecium* infections. **Antibiotics**, 10(2), 2021

HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. **Virulence**, 2012.

HOMAN, W. L. et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, 2002.

HULTON, C. S. J.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v. 5, n. 4, 1991.

JOLLEY, K. A.; BRAY, J. E.; MAIDEN, M. C. J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications [version 1; referees: 2 approved]. **Wellcome Open Research**, v. 3, 2018, Disponível em: <<https://pubmlst.org/>>. Acesso em: 3 set. 2023.

JOSHI, S.; SHALLAL, A.; ZERVOS, M. Vancomycin-Resistant Enterococci: Epidemiology, Infection Prevention, and Control. **Infectious Disease Clinics of North America**, 2021.

KANG, M. et al. Molecular characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from a tertiary care hospital in Chengdu, China molecular characteristics of VRE in China. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 6, 2014.

KIFFER, C. R. V et al. Exploratory model for estimating occupation-day costs associated to Hospital Related Infections based on data from national prevalence project: IRAS Brasil Project. **Official Journal of the Brazilian Association of Infection Control and Hospital Epidemiology Professionals Infect Control**, v. 4, n. 1, 2015.

KRAWCZYK, B. et al. The many faces of *enterococcus* spp.—commensal, probiotic and opportunistic pathogen. **Microorganisms**, 2021.

KRISHNA, N. K.; CUNNION, K. M. Role of molecular diagnostics in the management of infectious disease emergencies. **Medical Clinics of North America**, 2012.

KRISTICH, C. J.; RICE, L. B.; ARIAS, C. A. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. [s.l: s.n.].

LEAVIS, H. L. et al. Epidemic and nonepidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 9, 2003.

LEAVIS, H. L., Bonten, M. J., & Willems, R. J., Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. In **Current Opinion in Microbiology** (Vol. 9, Issue 5), 2016.

LEBRETON, F. et al. D-Ala-D-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 10, 2011.

LECLERCQ, R. et al. Plasmid-Mediated Resistance to Vancomycin and Teicoplanin in *Enterococcus Faecium*. **New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 3, 1988.

LEE, T. et al. Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: The past, the present and the future. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 16, p. 36–47, 1 mar. 2019.

LEVINE, D. P. Vancomycin: A history. *Clinical Infectious Diseases*, v. 42, n. **SUPPL.** 1, 2006.

LINDEN, P. K. Optimizing therapy for vancomycin-resistant enterococci (VRE). **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, 2007.

LOPES, M. DE F. S. et al. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, n. 3, 2006.

MAGIORAKOS, A.-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

MIRANDA FIGUEIREDO, R. A. et al. Enterococcus resistente à vancomicina: uma preocupação em expansão no ambiente hospitalar. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 2, 2012.

MURRAY, B. E. The life and times of the *enterococcus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 1, 1990.

MURRAY, B. E. Vancomycin-Resistant Enterococcal Infections. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 10, p. 710–721, 2000.

NETO, A. A. F. M. et al. Síndrome do Homem Vermelho / Red Man Syndrome. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 5, 2021.

O'DRISCOLL, T.; CRANK, C. W. Vancomycin-resistant enterococcal infections: Epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. **Infection and Drug Resistance**, v. 8, 2015.

OPAS, OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente. **Organização Pan-Americana Da Saúde**, 2017. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/27-2-2017-oms-publica-lista-bacterias-para-quais-s-e-necessitam-novos-antibioticos>>. Acesso em: 3 set. 2023.

OMS, Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance Summary, **Organização Mundial da Saúde**, 2015. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/file/54913/download?token=sBDXkDUk>>. Acesso em: 3 set. 2023.

OMS, Guidelines on Core Components of Infection Prevention and Control Programmes at the National and Acute Health Care Facility Level, **Organização Mundial da Saúde**, 2016. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789241549929>>. Acesso em: 3 set. 2023.

O'TOOLE, R. F. et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and the emergence of new sequence types associated with hospital infection. **Research in Microbiology**, 2023.

PAGANELLI, F. L. et al. Genome-wide Screening Identifies Phosphotransferase System Permease BepA to Be Involved in *Enterococcus faecium* Endocarditis and Biofilm Formation. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 2, 2016.

PALAZZO, I. C. V. et al. Changes in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing outbreaks in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, v. 79, n. 1, 2011.

PATEL, R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2003.

PAULSEN, I. T. et al. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Science**, v. 299, n. 5615, p. 2071–2074, 28 mar. 2003.

PEARCE, C. L. et al. Clonal diversity of vancomycin-resistant enterococci from an outbreak in a tertiary care university hospital. **American Journal of Infection Control**, v. 26, n. 6, 1998.

PINHOLT, M. et al. Multiple hospital outbreaks of vanA *Enterococcus faecium* in Denmark, 2012-13, investigated by WGS, MLST and PFGE. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 9, 2015.

RANJBAR, R. et al. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR) Genotyping of *Escherichia coli* Strains Isolated from Different Animal Stool Specimens. **Iranian Journal of Pathology**, v. 12, n. 1, p. 25–34, 2017.

REYNOLDS, P. E.; COURVALIN, P. Vancomycin resistance in enterococci due to synthesis of precursors terminating in D-Alanyl-D-Serine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2005.

RIBAS, R. M. et al. Vancomycin-resistant van a phenotype *Enterococcus faecalis*: First case in Minas Gerais state and epidemiological considerations. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 4, 2007.

RICE, L. B. et al. Impact of specific pbp5 mutations on expression of β -lactam resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 8, 2004.

RUBINSTEIN, E.; KEYNAN, Y. Vancomycin revisited - 60 years later. **Frontiers in Public Health**, 2014.

SAENGSUWAN, P. et al. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* clinical isolates in a tertiary care hospital in southern Thailand: A retrospective study. **PeerJ**, v. 9, 1 maio 2021.

SHANGKUAN, Y. H. et al. Comparison of PCR-RFLP, ribotyping and ERIC-PCR for typing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 3, p. 452–462, 2000.

SHANKAR, N. et al. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 7, 2001.

SIMONSEN, G. S. et al. Typeability of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant enterococci using long-range PCRs and specific analysis of polymorphic regions. **Microbial Drug Resistance**, v. 6, n. 1, 2000.

SINEL, C. et al. Small RNAs in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* involved in daptomycin response and resistance. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

STAGLIANO et al., Epidemiology and Outcomes of Vancomycin-Resistant Enterococcus Infections in the U.S. Military Health System. **Military Medicine**, 186,

2021.

STEFANI, S.; AGODI, A. Molecular epidemiology of antibiotic resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2000.

STOGIOS, P. J.; SAVCHENKO, A. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. **Protein Science**, 2020.

TACCONELLI *et al.*, ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients, **Clinical Microbiology and Infection**, 2014.

THIERFELDER, C. *et al.* Vancomycin-resistant *Enterococcus*: A multiple-strain outbreak of eight weeks duration at a Swiss tertiary care hospital. **Swiss Medical Weekly**, v. 142, n. MAY, 2012.

TITZE-DE-ALMEIDA, R. *et al.* Multilocus sequence typing of hospital-associated *Enterococcus faecium* from Brazil reveals their unique evolutionary history. **Microbial Drug Resistance**, v. 12, n. 2, 2006.

TRIEU-CUOT, P.; COURVALIN, P. Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'5"-aminoglycoside phosphotransferase type III. **Gene**, v. 23, n. 3, 1983.

TENOVER, F. C., *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. **In Journal of Clinical Microbiology**, cVol. 33, n. 9, 1995.

UTTLEY, A. H. C. *et al.* High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections. **Epidemiology and Infection**, v. 103, n. 1, 1989.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to *fingerpriting* of bacterial genomes. **Nucleic Acids**

Research, v. 19, n. 24, 1991.

WANG, J. S. et al. Central nervous system infections due to vancomycin-resistant enterococci: Case series and review of the literature. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 25, 2014.

WANG, Y. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant Enterococci co-colonization in patients: A meta-analysis. **American Journal of Infection Control**, 2020.

WILLEMS, R. J. L. et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 821–828, 2005.

WILLEMS, R. J. L. et al. Population biology of Gram-positive pathogens: High-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 5, p. 872–900, set. 2011.

WILLEMS, R. J. L.; VAN SCHAİK, W. Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. **Future Microbiology**, 2009.

ZAPUN, A.; CONTRERAS-MARTEL, C.; VERNET, T. Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, 2008.

ZERVOS, M. J.; SCHABERG, D. R. Reversal of the in vitro susceptibility of enterococci to trimethoprim-sulfamethoxazole by folinic acid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 28, n. 3, 1985.

ZHANG, X. et al. Identification of a genetic determinant in clinical *enterococcus faecium* strains that contributes to intestinal colonization during antibiotic treatment. *Journal of Infectious Diseases*, v. 207, n. 11, 2013a.

ZHANG, X. et al. Identification of a genetic determinant in clinical *enterococcus*

faecium strains that contributes to intestinal colonization during antibiotic treatment. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 11, 2013.

ZHOU, X., *et al.* *Enterococcus faecium*: From microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. **In Antimicrobial Resistance and Infection Control** (Vol. 9, Issue 1).