



Universidade Federal Fluminense

Amanda Seabra Cabral

**Prevalência das principais espécies patogênicas de enterococos isoladas
do trato respiratório superior de pacientes e profissionais de saúde de
Niterói, RJ**

Orientador: Dr. Felipe Piedade Gonçalves Neves

Niterói, RJ

2022

AMANDA SEABRA CABRAL

**Prevalência das principais espécies patogênicas de enterococos isoladas
do trato respiratório superior de pacientes e profissionais de saúde de
Niterói, RJ**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade
Federal Fluminense, como parte
das exigências do curso de
Biomedicina para obtenção do
grau de Bacharel em Biomedicina
– Habilitação em Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Piedade Gonçalves Neves

Niterói, RJ

2022

Ficha catalográfica automática - SDC/BIB
Gerada com informações fornecidas pelo autor

C117p Cabral, Amanda Seabra
Prevalência das principais espécies patogênicas de enterococos isoladas do trato respiratório superior de pacientes e profissionais de saúde de Niterói, RJ / Amanda Seabra Cabral. - 2022.
34 f.

Orientador: Felipe Piedade Gonçalves Neves.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação)-Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Niterói, 2022.

1. Enterococcus spp. 2. Colonização. 3. PCR. 4. Produção intelectual. I. Neves, Felipe Piedade Gonçalves, orientador. II. Universidade Federal Fluminense. Instituto Biomédico. III. Título.

CDD - XXX

AMANDA SEABRA CABRAL

Prevalência das principais espécies patogênicas de enterococos isoladas do trato respiratório superior de pacientes e profissionais de saúde de Niterói, RJ

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal Fluminense, como parte das exigências do curso de Biomedicina para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina – Habilitação em Análises Clínicas.

Aprovado em de de 2022.

Prof. Dr. Felipe Piedade Gonçalves Neves – UFF (Orientador)

(Titular)

(Titular)

(Suplente)

RESUMO

O gênero *Enterococcus* é composto por cocos Gram-positivos que fazem parte da microbiota humana e de outros animais. As principais espécies oportunistas entre os seres humanos são *E. faecalis* e *E. faecium*, comumente relacionadas a infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), sobretudo no ambiente hospitalar. Para o diagnóstico laboratorial, podem ser empregados testes bioquímicos ou técnicas moleculares, como MALDI-TOF e PCR. O presente estudou teve como objetivo pesquisar a prevalência de *E. faecalis* e *E. faecium* por meio da técnica de PCR em pacientes adultos e profissionais de saúde de um hospital público (HMON) e de clínicas odontológicas da UFF em Niterói, RJ, comparando espécimes da orofaringe, nasofaringe e saliva. Foram recrutados 180 participantes, dos quais foram obtidos três espécimes distintos: “swab” de nasofaringe, “swab” de orofaringe e saliva. Um paciente não foi capaz de fornecer saliva e, portanto, obtivemos, no total, 539 espécimes. O DNA de cada espécime foi obtido por lise térmica e foi realizado PCR para os genes *ddl* para *E. faecalis* e *soda* para *E. faecium*. Espécimes com diagnóstico presuntivo para enterococos na técnica molecular foram isoladas em meio ágar bile esculina. A colonização por *Enterococcus* spp. foi detectada em 38 (21,1%) participantes, entre os quais *E. faecalis* foi prevalente (26/180; 14,4%). A frequência total de *Enterococcus* spp. nos espécimes foi de 8,7% (47/539). Foi obtida uma frequência de 7,8% (n=14) na nasofaringe, 5% (n=9) na orofaringe e 13,4% (n=24) na saliva. A frequência de isolamento de *E. faecalis* foi maior na saliva (11,7%) e de *E. faecium* na nasofaringe (5%). A prevalência de colonização por subpopulação do estudo foi de 41,2%, 14,9%, 13,6% e 7,9% para pacientes do HMON, pacientes da UFF, profissionais de saúde da UFF e profissionais de saúde do HMON, respectivamente. Para *E. faecalis*, 20/34 (58,8%) dos espécimes positivos na PCR apresentaram escurecimento no ágar bile esculina e, para *E. faecium*, 3/13 (23,1%) apresentaram esse resultado. A colonização por *Enterococcus* spp. foi maior em pacientes hospitalizados, sobretudo pela espécie *E. faecalis*. O sítio de isolamento de *Enterococcus* spp. mais comum foi a saliva. O isolamento em meio seletivo não se mostrou tão sensível quanto à técnica de PCR.

Palavras-chave: *Enterococcus* spp., colonização, PCR

ABSTRACT

The *Enterococcus* genus is composed of Gram-positive cocci that are part of the human and other animal microbiota. The main opportunistic species among humans are *E. faecalis* and *E. faecium*, commonly related to healthcare-associated infections (HAI), especially in the hospital environment. For laboratory diagnosis, biochemical tests or molecular techniques such as MALDI-TOF and PCR can be used. The present study aimed to investigate the prevalence of *E. faecalis* and *E. faecium* through the PCR technique in adult patients and health professionals from a public hospital (HMON) and dental clinics at UFF in Niterói, RJ, comparing specimens oropharynx, nasopharynx and saliva. A total of 180 participants were recruited, from which three different specimens were obtained: nasopharyngeal swab, oropharyngeal swab and saliva. One patient was unable to provide saliva and therefore we obtained a total of 539 specimens. The DNA of each specimen was obtained by thermal lysis and PCR was performed for the genes *ddl* for *E. faecalis* and *soda* for *E. faecium*. Especimens with a presumptive diagnosis of enterococci using the molecular technique were isolated on bile esculin agar. Colonization by *Enterococcus* spp. was detected in 38 (21.1%) participants, among whom *E. faecalis* was prevalent (26/180; 14.4%). The total frequency of *Enterococcus* spp. in specimens was 8.7% (47/539). A frequency of 7.8% (n=14) in the nasopharynx, 5% (n=9) in the oropharynx and 13.4% (n=24) in the saliva was obtained. The frequency of isolation of *E. faecalis* was higher in saliva (11.7%) and of *E. faecium* in the nasopharynx (5%). The prevalence of colonization per study subpopulation was 41.2%, 14.9%, 13.6%, and 7.9% for HMON patients, UFF patients, UFF health professionals, and HMON health professionals, respectively. For *E. faecalis*, 20/34 (58.8%) of the PCR positive specimens showed darkening on bile esculin agar, and for *E. faecium*, 3/13 (23.1%) showed this result. Colonization by *Enterococcus* spp. was higher in hospitalized patients, especially for the *E. faecalis* species. The most common isolation site of *Enterococcus* spp. was saliva. Isolation in selective media was not as sensitive as the PCR technique.

Keywords: *Enterococcus* spp., colonization, PCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da população de estudo.....	19
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores utilizados para identificação das espécies enterocócicas.....	17
Tabela 2. Distribuição de <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> entre as subpopulações do estudo.	20
Tabela 3. Prevalência de detecção de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Enterococcus faecium</i> por espécime clínico.	21
Tabela 4. Detecção de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Enterococcus faecium</i> em nasofaringe, orofaringe e saliva de acordo com as subpopulações do estudo.	21

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CDC – do inglês, *Centers of Disease Control*

FO – Faculdade de Odontologia

HMON – Hospital Municipal Oceânico de Niterói

MALDI-TOF - do inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight*

MSCRAMMs - do inglês, *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*

PCR - do inglês, *polymerase chain reaction*

UFF – Universidade Federal Fluminense

UV - Ultravioleta

VRE - Enterococos resistentes à vancomicina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. O gênero <i>Enterococcus</i>	8
1.2. Doenças enterocócicas.....	9
1.3. Diagnóstico	9
1.4. Tratamento e resistência.....	11
1.5. Epidemiologia	12
2. OBJETIVO	15
2.1. Objetivo geral.....	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. METODOLOGIA	16
3.1. População do estudo e coleta dos espécimes clínicos.....	16
3.2. Obtenção de DNA.....	16
3.3. Pesquisa de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Enterococcus faecium</i> por PCR.....	17
3.4. Isolamento das amostras bacterianas.....	18
3.5. Aspectos éticos.....	18
4. RESULTADOS	19
4.1. Análise da população do estudo	19
4.2. Pesquisa de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Enterococcus faecium</i> por PCR.....	19
4.3. Isolamento das amostras bacterianas a partir de espécimes clínicos positivos para <i>E. faecalis</i> e/ou <i>E. faecium</i> por PCR	22
5. DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÃO	27
7. ANEXOS	28
8. BIBLIOGRAFIA	29

1. INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Enterococcus*

Microrganismos do gênero *Enterococcus*, que caracteristicamente apresentam o antígeno do grupo D de Lancefield, eram, até meados da década de 1980, pertencentes ao gênero *Streptococcus*. São bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos, com morfologia de cocos e dispostas aos pares ou em cadeias curtas (BROOKS *et al.*, 2014; MURRAY *et al.*, 2014).

Os enterococos são comensais do trato gastrointestinal humano, mas podem causar infecções oportunistas. Apresentam uma grande variedade de hospedeiros, incluindo invertebrados, insetos e mamíferos, o que justifica a abordagem “One Health” (Saúde Única) empregada no estudo desse gênero (FIORE; VAN TYNE; GILMORE, 2019). Há espécies saprofíticas e ubíquas na natureza, sendo encontradas em solos, sedimentos, água doce, água marinha, areia de praia e uma variedade de plantas. Podem ser liberadas em fezes humanas e de outros animais, podendo ser utilizadas para vigilância de contaminação fecal (ZAHEER *et al.*, 2020).

O gênero *Enterococcus* compreende mais de 60 espécies, dentre elas, as prevalentes em seres humanos são *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, principais causadoras das infecções nosocomiais. Dentre as espécies encontradas no ambiente, estão *Enterococcus hirae*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus villorum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum*, entre outras (FIORE *et al.*, 2019).

Esses patógenos são capazes de formar biofilme, se aderir a tecidos e objetos inertes, como dispositivos hospitalares, e evadir o sistema imune, representando fatores fundamentais de virulência destes microrganismos. Além disso, são resistentes a antimicrobianos, antissépticos e desinfetantes comumente utilizados, radiação UV e dessecação, o que torna facilitada sua disseminação na população, podendo sobreviver em meios com poucos nutrientes (FIORE *et al.*, 2019).

Enterococcus spp. também apresentam elementos em sua superfície (MSCRAMMs, do inglês, *microbial surface components recognizing adhesive matrix*

molecules) que permitem a adesão no hospedeiro, facilitando a infecção. As MSCRAMMs são comuns principalmente em cepas clínicas de *E. faecium*. Pili e citolisina também são importantes fatores de virulência presentes tanto em *E. faecium*, quanto em *E. faecalis* (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

1.2. Doenças enterocócicas

Algumas espécies enterocócicas fazem parte da microbiota humana e, para serem capazes de causar doenças, necessitam migrar para a corrente sanguínea. Dessa forma, com um desequilíbrio da microbiota e um aumento na quantidade de enterococos no intestino, se torna possível a disseminação da bactéria no sangue e em outros locais do corpo humano (FIORE *et al*, 2019). Os sítios mais comuns de infecção em seres humanos são as vias urinárias, feridas, trato biliar e sangue, canal dental e outros (GARCÍA-SOLACHE *et al.*, 2019).

As infecções de corrente sanguínea, como a bacteremia, estão associadas a altos índices de mortalidade, principalmente associados a pacientes de idade avançada, e que faz uso de cefalosporinas de terceira geração e metronidazol. Muitos casos ocorrem a partir da translocação dos enterococos do intestino para a corrente sanguínea. As vias intravenosas, endocardite, infecções do trato urinário e abscessos também são consideradas rotas de infecção da bactéria. Além disso, esse gênero bacteriano é o mais frequentemente isolado de infecções do trato urinário associadas a cateteres causadas por patógenos Gram-positivos, podendo causa também endocardite, infecções em sítio cirúrgico, em canal dental, cáries e periodontite (FIORE *et al*, 2019).

Por ser um patógeno associado a infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), *Enterococcus* spp. são comumente encontrados em ambientes hospitalares, principalmente em unidades de tratamento intensivo. Esses patógenos são selecionados principalmente pelo uso de cefalosporinas e outros antimicrobianos no tratamento do paciente contra diversas doenças. Transmitidos entre os pacientes por meio da equipe hospitalar, os enterococos podem também ser encontrados aderidos à superfície de dispositivos médicos, sendo uma das principais causas de infecções de sítio cirúrgico (BROOKS *et al.*, 2014).

1.3. Diagnóstico

Com crescimento ótimo entre 35°C e 37°C, mas podendo crescer na faixa entre 10 e 45 °C. Os enterococos, quando semeados em ágar sangue, podem ser alfa-hemolíticos, beta-hemolíticos ou não apresentar hemólise. Formam colônias de 1 a 2 mm com uma aparência molhada. Existem alguns meios seletivos para espécies clínicas, como o Enterococcosel, que costumam apresentar sais biliares, azida de sódio, antibióticos e sais de esculina ou tetrazólio (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

Quando submetidos ao teste de PYR – que examina a atividade da enzima pirrolidonil arilamidase – apresentam um resultado positivo, assim como a espécie beta-hemolítica *Streptococcus pyogenes*, principal espécie para a qual é empregado este teste. São positivos também para o teste da bile-esculina, uma vez que são capazes de crescer em presença de bile e hidrolisar a esculina em esculetina. Os enterococos apresentam um resultado negativo no teste da catalase e oxidase. Kits comerciais também já foram produzidos, mas devido a uma necessidade de preparação prévia das amostras, podem atrasar o diagnóstico (BROOKS *et al.*, 2014).

Técnicas moleculares têm sido muito empregadas para diagnóstico, facilitando e agilizando a identificação das espécies. O MALDI-TOF (do inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight*) é uma técnica molecular fenotípica que apresenta um bom poder discriminatório para a identificação das espécies enterocócicas. Por sua vez, a PCR (do inglês, *polymerase chain reaction*) pode ser utilizada para a detecção de um ou mais genes de interesse que possibilitem a identificação das espécies. Por PCR, também é possível detectar a existência de genes que conferem resistência a importantes drogas antimicrobianas. O sequenciamento de genes, ou até mesmo do genoma, também pode ser utilizado para fins diagnósticos (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

A técnica de PCR consiste na amplificação de sequências curtas de DNA e RNA que são definidas a partir dos iniciadores de oligonucleotídeos adicionados na reação. É utilizada uma enzima de *Taq* DNA polimerase para realizar o processo, que é capaz de manter sua função durante toda sua decorrência. O processo apresenta três fases que ocorrem em diferentes temperaturas durante o ciclo. Na etapa da desnaturação, ocorre o rompimento das pontes de hidrogênio entre as bases complementares do DNA. No anelamento, os iniciadores se ligam aos sítios

complementares na sequência alvo. Já na fase de extensão, a *Taq* DNA polimerase começa a sintetizar a nova fita de DNA no sentido 5'-3' a partir da região ligada ao iniciador. Para análise dos resultados da PCR, é necessário realizar uma eletroforese em gel, em geral de agarose (WATERS; SHAPTER, 2014).

1.4. Tratamento e resistência

Geralmente, em casos de doenças enterocócicas, são administrados os fármacos da classe dos beta-lactâmicos, principalmente ampicilina, mas também penicilina e piperacilina. Em casos de enterococcias graves, como a endocardite, a associação entre um beta-lactâmico (ampicilina) e um aminoglicosídeo (gentamicina) é recomendada para se obter um efeito sinérgico bactericida. Em casos de resistência a aminoglicosídeos, a vancomicina é o principal fármaco alternativo (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

Entretanto, o uso indiscriminado de antimicrobianos pela população obteve como resultado a emergência da resistência a diversos antimicrobianos nos enterococos, sendo enquadrados como um dos microrganismos que fazem parte do grupo ESKAPE, que reúne os principais patógenos associados à multirresistência (MULANI, 2019). Este grupo, composto por *E. faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp., compreende as principais bactérias causadoras de infecções em humanos capazes de “escapar” da ação antimicrobiana dos fármacos comumente empregados no tratamento dessas doenças. Em *E. faecium*, é possível encontrar uma grande prevalência de resistência a beta-lactâmicos, principalmente a imipenem e ampicilina, além da resistência ao glicopeptídeo vancomicina (PENDLETON *et al.*, 2013).

Ademais, em uma lista publicada em 2017 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), *E. faecium* resistente à vancomicina foi reconhecido como um dos patógenos que representam uma das maiores ameaças à saúde humana, afirmando a necessidade de desenvolvimento de novos mecanismos para o combate às infecções provocadas por estes microrganismos (WHO, 2017). Reforçando esse cenário, o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) dos EUA incluiu, em 2019, em sua lista

de ameaças sérias à saúde humana os enterococos resistentes à vancomicina (VRE), independente da espécie, pois, em 2017, foram estimados 54.500 casos de infecções por VRE em pacientes hospitalizados somente nos EUA, resultando em aproximadamente 5.400 mortes (<https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>, acesso em 24 ago 2022).

A pressão seletiva provocada por esse intenso uso de antimicrobianos fez com que os enterococos se adaptassem para garantir sua sobrevivência, adquirindo resistência a diferentes agentes antimicrobianos. O gênero *Enterococcus* apresenta resistência intrínseca a algumas classes de antimicrobianos, como as cefalosporinas e sulfametoxazol-trimetoprim e resistência a baixos níveis de beta-lactâmicos e aminoglicosídeos. Algumas espécies, como *E. Casseliflavus* e *E. gallinarum*, apresentam resistência intrínseca a baixos níveis de glicopeptídeos. A multirresistência também tem sido descrita envolvendo os fármacos macrolídeos, tetraciclina, estreptograminas e glicopeptídeos (ZAHEER *et al.*, 2020). Além disso, os enterococos são capazes de atuar por meio de elementos genéticos móveis (EGMs) disseminando resistência entre outras espécies Gram positivas e negativas, como *S. aureus* e alguns estreptococos (LERMINIAUX; CAMERON, 2019).

Uma das cepas multirresistentes mais importantes é conhecida como VRE, cuja resistência é codificada por genes organizados nos operons *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM*, *vanN* ou *vanP* (XAVIER *et al.*, 2021). Tal fármaco da classe dos glicopeptídeos apresenta como mecanismo de ação a ligação ao terminal D-Ala-D-Ala de precursores de peptidoglicanos inibindo a síntese de parede celular (MILLER; MUNITA; ARIAS, 2014). Com a expressão de algum desses genes, ocorre uma substituição dos terminais D-Ala-D-Ala por D-Ala-D-Lac ou D-Ala-D-Ser, o que diminui a afinidade da droga pelo seu sítio-alvo (HOLLENBECK; RICE, 2012). Linezolida, daptomicina e tigeciclina costumam ser administrados para casos de infecção por VRE (ZAHEER *et al.*, 2020).

1.5. Epidemiologia

Por serem parte da microbiota de seres humanos e diversos animais, a distribuição de enterococos entre essas espécies varia. A espécie enterocócica mais comum entre humanos é a *E. faecalis*, enquanto em animais de produção é a *E. faecium* e em plantas, *Enterococcus mundtii* e *E. casseliflavus* são as mais encontradas. Em relação à diversidade de espécies, as amostras clínicas são bem menos diversas quando comparadas às amostras ambientais (FISHER *et al.*, 2009).

A emergência de cepas VRE tem sido uma das principais causas de infecções nosocomiais pelo mundo. No Brasil, têm sido reportados vários casos de VRE em hospitais de diferentes regiões do país, desde seu primeiro relato em 1996 em Curitiba (PR) de *E. faecium* com o genótipo *vanD* (DA SILVA *et al.*, 2012). Nos EUA, aproximadamente 35,5% de toda infecção nosocomial enterocócica reportada no CDC é resistente à vancomicina. Além disso, cepas de VRE apresentam uma propensão para colonizar a pele, o que promove um maior risco para infecções associadas a cateterismo e para transmissão a profissionais da saúde (JACKSON *et al.*, 2019).

Especialmente após a pandemia de COVID-19, cresceram relatos de coinfeção causada por diferentes microrganismos em pacientes críticos, como aqueles que se encontram em unidades de tratamento intensivo. Estudos demonstram uma alta prevalência de infecção por *Enterococcus* spp., com uma grande presença de VRE, em pacientes internados com SARS-CoV-2, demonstrando uma alta frequência de bacteremia causada por esse gênero. Tal situação pode ser explicada devido ao envolvimento entérico em pacientes graves, a pressão de colonização pelo uso de antimicrobianos, a limitação no controle da transmissão a pacientes, além do intenso uso de fármacos que alteram a microbiota (GIANNITSIOTI *et al.*, 2022).

Embora o trato gastrointestinal seja o principal reservatório de enterococos, outros sítios podem atuar como reservatórios dessas espécies, inclusive de cepas com perfil de multirresistência. Esses potenciais reservatórios podem facilitar a transmissão dos microrganismos para outros indivíduos e também a transferência de genes de resistência para outras espécies e gêneros bacterianos. A detecção molecular de enterococos diretamente dos espécimes clínicos também pode representar uma nova estratégia, sensível e específica, para fins diagnósticos.

Portanto, com a emergência de resistência a diversos antimicrobianos em *Enterococcus* spp., faz-se necessário o constante monitoramento dos casos. Além disso, estudos de vigilância são necessários para que seja facilitado o entendimento do problema como um todo no país.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo pesquisar a prevalência das principais espécies de enterococos em pacientes adultos e profissionais de saúde de um hospital público e de clínicas odontológicas da UFF em Niterói, RJ, comparando espécimes obtidos do trato respiratório superior e da cavidade oral: orofaringe, nasofaringe e saliva.

2.2. Objetivos específicos

- Usar uma ferramenta de diagnóstico baseada em PCR para determinar a prevalência de colonização por *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* na população do estudo;
- Determinar, entre as subpopulações investigadas, aquela(s) que apresentavam maior frequência de colonização por *E. faecalis* e *E. faecium*;
- Identificar o(s) sítio(s) de detecção por espécies enterocócicas mais comum na população investigada;
- Empregar meio seletivo indicador para isolar as amostras de enterococos a partir dos espécimes cuja PCR detectou a presença de *E. faecium* e/ou *E. faecalis*.

3. METODOLOGIA

3.1. População do estudo e coleta dos espécimes clínicos

Entre os dias 3 de fevereiro e 23 de maio de 2022, foi realizado o recrutamento e a coleta dos espécimes clínicos utilizados para análise neste estudo. Foram coletados espécimes de indivíduos adultos (idade igual ou superior a 18 anos), incluindo pacientes internados e profissionais da saúde do Hospital Municipal Oceânico de Niterói (HMON) e das clínicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense (FO - UFF). Pacientes gestantes, em sedação, ou intubados não foram incluídos no estudo.

De cada paciente, foram coletados três espécimes clínicos distintos. A partir da utilização de “swabs” estéreis, foram coletadas amostras a partir de secreção da nasofaringe e da orofaringe. Já a saliva foi coletada a partir de sua excreção pelo próprio paciente. No dia da coleta, as amostras foram mantidas refrigeradas em isopor por no máximo 5 h até serem levadas para o Laboratório de Cocos Gram Positivos no Instituto Biomédico (UFF). Os espécimes provenientes da nasofaringe e orofaringe foram armazenados em criotubo contendo 1 mL de meio STGG (leite desnatado, triptona, glicose e glicerina) e a saliva em tubo Falcon estéril. Todas as amostras foram acondicionadas em freezer a - 80°C.

3.2. Obtenção de DNA

O processo de obtenção de DNA foi realizado a partir do protocolo de Rodrigues e colaboradores (2017) com modificações. Primeiramente, foi realizada a ativação das amostras, as quais foram homogeneizadas com auxílio de vórtex e 200 µL das amostras de nasofaringe e orofaringe e entre 100 µL das amostras de saliva foram semeados em 1 mL de meio THY (caldo Todd-Hewitt suplementado com 0,5% de extrato de leveduras e 0,4 mL de soro de coelho) e levados à incubação a 36±1°C por 18-24h em estufa. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 3.000 RPM por 1 minuto e seus sobrenadantes, descartados. As colônias foram suspensas em 300 µL de tampão de eluição - TE (10 mM Tris-HCl, 1,0 mM EDTA, pH 8,0) e o DNA foi obtido por lise bacteriana por fervura ao submeter a solução a aquecimento

a 100 °C por 10 min. Por fim, a solução foi novamente centrifugada a 3.000 rpm por 1 min e armazenada a – 20 °C.

3.3. Pesquisa de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* por PCR

Para a identificação das espécies de enterococos, foi realizado um ensaio de PCR duplex das amostras de cada sítio utilizando iniciadores espécie-específicos. Para *E. faecalis*, foi utilizado um par de iniciadores que detecta o gene *ddl*, que codifica a D-Ala:D-Ala ligase (DEPARDIEU *et al.*, 2004). Por sua vez, para *E. faecium* foi empregado um par de iniciadores específicos para o gene *sodA*, que codifica a enzima superóxido dismutase (JACKSON *et al.*, 2004) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Iniciadores utilizados para identificação das espécies enterocócicas.

Iniciadores	Sequência (5' → 3')	Gene	Tamanho (pb)	Referência
DD13	CACCTGAAGAAACAGGC	<i>ddl</i> (<i>E. faecalis</i>)	475	Depardieu <i>et al.</i> (2004)
DD3-2	ATGGCTACTTCAATTTTCACG			
FM1	GAAAAACAATAGAAGAATTAT	<i>sodA</i> (<i>E. faecium</i>)	215	Jackson <i>et al.</i> (2004)
FM2	TGCTTTTTTGAATTCTTCTTTA			

O ensaio de PCR foi realizado com volume final de 25 µL, contendo 0,5 µM de cada iniciador, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase, 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dNTP), 2,5 µM de MgCl₂ e de solução tampão 1x (Sinapse Inc.), além de 2,5 µL da preparação de DNA.

A reação foi submetida à amplificação em termociclador (Veriti 96-Well Thermal Cycler; Applied Biosystems), nas etapas: 95°C por 5 min seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 min; 55°C por 1 min; 72°C por 1 min e, por fim, 72 °C por 5 min.

Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,5% com o corante de DNA Safedye Nucleic Acid Stain (Cellco Biotec do Brasil) para a revelação do resultado. A corrida do gel foi feita em tampão TBE (Tris base 0,89M, Ácido Bórico 0,45M, EDTA 1mM, pH 8,4), utilizando como marcador de padrão molecular de 100 pb DNA Ladder (Promega) e posteriormente visualizada em luz UV sendo fotografado utilizando o

sistema de fotodocumentação L-PIX (Loccus do Brasil). Foi utilizado como controle positivo para *E. faecalis* a cepa 96E e para *E. faecium* a cepa IE110. Os produtos de amplificação dos iniciadora gerados para *E. faecalis* e *E. faecium* são, respectivamente, de 215 pb e 475 pb.

3.4. Isolamento das amostras bacterianas

Para a confirmação do diagnóstico por PCR, os espécimes positivos para a presença de *E. faecalis* e/ou *E. faecium* na técnica molecular foram submetidos ao isolamento em meio seletivo para *Enterococcus* spp.. Os espécimes foram semeados em meio de cultura THY e incubados a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ em estufa por 18h-24h. Posteriormente, foi realizada uma semeadura em meio seletivo ágar bile-esculina em tubo (PlastLabor) e incubação a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$. Os resultados foram lidos em 24h e 48h e só foram considerados negativos após incubação por 7 dias.

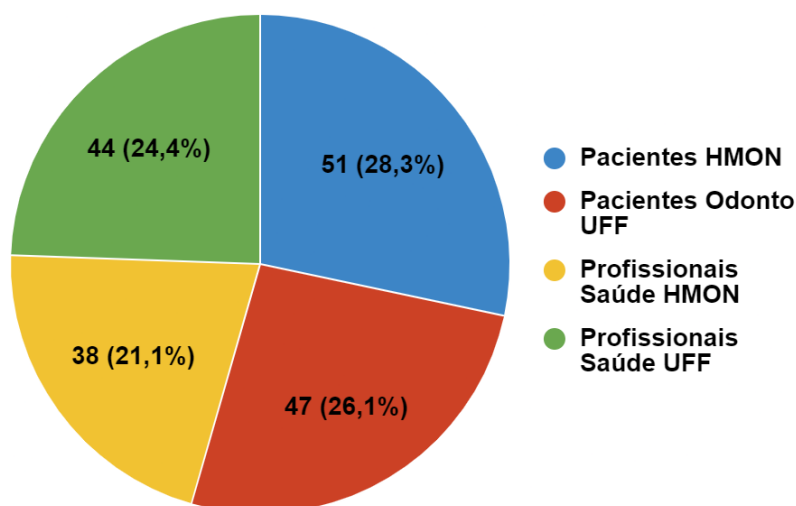
3.5. Aspectos éticos

O estudo obteve aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UFF (CAAE 36592820.8.0000.5626 - Anexo 1).

4. RESULTADOS

4.1. Análise da população do estudo

A população do estudo foi composta por 51 pacientes provenientes do HMON, 47 pacientes das clínicas de odontologia da UFF, 38 profissionais de saúde do HMON e 44 profissionais de saúde da UFF. A distribuição da população do estudo pode ser observada na **figura 1**.



*HMON, Hospital Municipal Oceânico de Niterói; Odonto UFF, clínicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense

Figura 1. Distribuição da população de estudo.

No total, foram coletados 539 espécimes clínicos provenientes dos três sítios (nasofaringe, n=180; orofaringe, n=180; e saliva, n=179) de 180 indivíduos. Não foi possível coletar a amostra de saliva de um dos participantes da pesquisa (paciente do Hospital Municipal Oceânico de Niterói – HMON).

4.2. Pesquisa de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* por PCR

Dentre os 180 participantes da pesquisa, 38 (21,1%) apresentaram colonização por *Enterococcus* spp. em um ou mais sítios coletados. Ao todo, 26 (14,4%) participantes obtiveram resultado positivo na PCR para *E. faecalis* e 13 (7,2%) para *E. faecium*. Apenas um (0,6%) apresentou resultado positivo para ambas as espécies.

Dentre os 51 pacientes do HMON, 21 (41,2%) participantes foram positivos na PCR para *Enterococcus* spp. em um ou mais espécimes clínicos. Já entre os outros grupos, a prevalência foi de 14,9% (n=7) entre os 47 pacientes das clínicas de odontologia da UFF, 7,9% (n=3) entre os 38 profissionais de saúde do HMON e 13,6% (n=6) entre os 44 profissionais da saúde da UFF.

Dentre os 539 espécimes clínicos analisados, 47 (8,7%) apresentaram resultado positivo na PCR considerando ambas as espécies enterocócicas investigadas. Em relação às espécies, *E. faecalis* foi detectado em 34 (6,3%) espécimes clínicos e, por sua vez, *E. faecium* em 13 (2,4%) espécimes. Apenas um (0,2%) espécime de nasofaringe apresentou resultado positivo para ambas as espécies.

Ao comparar a detecção de *E. faecalis* e *E. faecium* entre as diferentes subpopulações do estudo, foi observada uma prevalência tanto de *E. faecalis* (n=23; 15%) quanto de *E. faecium* (n=6; 3,9%) entre os 152 espécimes coletados dos 51 pacientes do HMON. A menor prevalência de *E. faecalis* (n=2; 1,7%) e *E. faecium* (n=1; 0,9%) ocorreu dentre os 114 espécimes clínicos coletados dos 38 profissionais da saúde do HMON (**tabela 2**).

Tabela 2. Distribuição de *E. faecalis* e *E. faecium* entre as subpopulações do estudo.

Espécie	Pacientes HMON (n=51)	Pacientes Odonto UFF (n=47)	Profissionais Saúde HMON (n=38)	Profissionais Saúde UFF (n=44)
<i>E. faecalis</i>	23 (15%)	4 (2,8%)	2 (1,7%)	5 (3,8%)
<i>E. faecium</i>	6 (3,9%)	4 (2,8%)	1 (0,9%)	2 (1,5%)

*HMON, Hospital Municipal Oceânico de Niterói; Odonto UFF, clínicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense

Os 47 espécimes clínicos nos quais a presença de *E. faecalis* e/ou *E. faecium* foi detectada foram predominantemente provenientes de pacientes do HMON (61,7%, n=29), seguido por pacientes das clínicas de odontologia da UFF (17%, n=8), profissionais de saúde da UFF (14,9%, n=7) e profissionais da saúde do HMON (6,4%, n=3).

Ao analisar a prevalência de enterococos nos espécimes clínicos coletados, foi encontrada uma prevalência total de 7,8% (n=14) na nasofaringe, 5% (n=9) na orofaringe e 13,4% (n=24) na saliva. A distribuição das espécies de enterococos por espécimes coletados pode ser encontrada na **tabela 3**.

Tabela 3. Prevalência de detecção de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* por espécime clínico.

Espécie	Nº de espécimes clínicos (%)		
	Nasofaringe	Orofaringe	Saliva
<i>E. faecalis</i>	5 (2,8%)	8 (4,4%)	21 (11,7%)
<i>E. faecium</i>	9 (5,0%)	1 (0,6%)	3 (1,7%)

Na **tabela 4**, observa-se que a prevalência de *E. faecalis* no sítio da saliva e de *E. faecium* na nasofaringe se repetem em quase todas as subpopulações de estudo. A detecção de *Enterococcus* spp. foi mais comum em saliva, sendo as espécies encontradas em 24 (51,1%) dos 47 espécimes clínicos positivos para o patógeno, como observado na **figura 3**

Tabela 4. Detecção de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* em nasofaringe, orofaringe e saliva de acordo com as subpopulações do estudo.

Sítios de Coleta	Pacientes HMON (n=51)		Pacientes Odonto UFF (n=47)		Profissionais Saúde HMON (n=38)		Profissionais Saúde UFF (n=44)	
	<i>E. Faecalis</i>	<i>E. Faecium</i>	<i>E. Faecalis</i>	<i>E. Faecium</i>	<i>E. Faecalis</i>	<i>E. Faecium</i>	<i>E. Faecalis</i>	<i>E. Faecium</i>
Nasofaringe	3 (5,9%)	4 (7,8%)	-	3 (6,4%)	1 (2,6%)	1 (2,6%)	1 (2,3%)	1 (2,3%)
Orofaringe	7 (13,7%)	1 (2,0%)	-	-	-	-	1 (2,3%)	-
Saliva	13 (26,0%)	1 (2,0%)	4 (8,5%)	1 (2,1%)	1 (2,6%)	-	3 (6,8%)	1 (2,3%)

*HMON, Hospital Municipal Oceânico de Niterói; Odonto UFF, clínicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense

Sete (3,9%) participantes da pesquisa apresentaram resultado positivo na PCR para *E. faecalis* em mais de um sítio. Dentre estes, um (0,6%) se mostrou positivo

nos três sítios, cinco (2,8%) positivaram nos espécimes de orofaringe e saliva e um (0,6%) em saliva e nasofaringe. Nenhum participante obteve resultado positivo em mais de um sítio para *E. faecium*.

4.3. Isolamento das amostras bacterianas a partir de espécimes clínicos positivos para *E. faecalis* e/ou *E. faecium* por PCR

Dentre os 34 espécimes positivos para *E. faecalis* por PCR, cinco (14,7%) eram provenientes da nasofaringe; oito (23,5%), da orofaringe e 21 (61,8%), da saliva. Estes espécimes foram submetidos à semeadura em ágar bile-esculina resultando em 20 (58,8%) amostras apresentando meio escurecido, sugestivo da presença de enterococos. Dentre essas 20 amostras, uma (5%) era proveniente da nasofaringe, duas (10%) da orofaringe e 17 (85%) de saliva.

Já entre os 13 espécimes positivos para *E. faecium*, nove (69,2%) eram provenientes de nasofaringe, um (7,7%), da orofaringe e três (23,1%) da saliva. Após serem submetidos à semeadura em ágar bile esculina, foi observado crescimento sugestivo de *Enterococcus* spp. em três (23,1%) espécimes. Dentre as três amostras positivas, havia uma (33,3%) de cada espécime coletado.

Não foi possível observar o escurecimento do ágar bile esculina após cultivo a partir do único espécime clínico no qual foram detectadas ambas as espécies por PCR.

5. DISCUSSÃO

Os enterococos são considerados importantes causadores de infecções graves em ambiente hospitalar, especialmente aquelas causadas pelas espécies *E. faecalis* e *E. faecium*. Essa capacidade se dá, devido à sua eficiente colonização em seres humanos e resistência a estressores ambientais, características que remontam ao gênero desde o início de seu processo evolutivo (PÖNTINEN *et al.*, 2021). A intensa proliferação das linhagens bacterianas resistentes a antimicrobianos se tornou uma tendência mundial devido à pressão induzida pela extensiva utilização desses fármacos em ambientes hospitalares e comunitários, além de, muitas vezes, automedicação na comunidade (FIORE *et al.*, 2019).

Por esse motivo, cada vez mais a emergência e disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos, como ocorre com as cepas de VRE, tem se tornado uma questão crítica de saúde pública global. Dessa maneira, é imprescindível a vigilância da colonização por enterococos, bem como avaliar o seu perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, para que se possam delinear estratégias de controle.

No presente estudo, foi empregada uma técnica molecular simples, rápida e prática para detecção de portadores assintomáticos, entre pacientes adultos e profissionais de saúde, das duas principais espécies enterocócicas. Ao utilizar a técnica de PCR duplex, foi possível detectar uma prevalência de colonização por *Enterococcus* spp. de aproximadamente 21%, com predominância da espécie *E. faecalis* (14,4%) em comparação a *E. faecium* (7,2%). Essas espécies foram detectadas em 47 (8,7%) dos 539 espécimes clínicos avaliados. A espécie *E. faecalis* foi detectada em 34 (6,2%) espécimes e a espécie *E. faecium*, em 13 (2,4%). Este método molecular permite um diagnóstico facilitado e mais flexível, possibilitando uma identificação espécie-específica, quando comparado a outras técnicas de diagnóstico dependentes de cultura comumente utilizadas, como os testes bioquímicos. Além disso, com o uso de kits comerciais, como o API 20 STREP (bioMérieux), o sistema BD BBL Crystal (Becton Dickinson Cockeysville) e o identificação de enterococos (PROBAC® do Brasil), é necessário realizar uma identificação manual adicional, o que pode levar a erros no diagnóstico (JACKSON *et al.*, 2004).

Por ser um patógeno oportunista, a presença de *Enterococcus* spp. nos espécimes estudados, como nasofaringe, orofaringe e saliva, é preocupante, pela

maior facilidade de transmissão para outros indivíduos. Esse fato é particularmente especial para pacientes imunocomprometidos, que são mais suscetíveis ao estabelecimento de doenças infecciosas. Ao analisar os resultados dos pacientes incluídos no estudo, podemos observar essa relação principalmente naqueles que frequentavam o HMON, onde 41,2% (21/51) dos pacientes apresentavam enterococos em algum dos sítios coletados, enquanto nas clínicas de odontologia da UFF, 17% (8/47) pacientes apresentaram resultado positivo na PCR. Os pacientes hospitalizados, em geral, são submetidos a diferentes procedimentos, incluindo tratamento com antimicrobianos. O uso frequente de antimicrobianos por pacientes hospitalizados pode ajudar a explicar a maior prevalência nessa subpopulação do estudo, uma vez que os enterococos são intrinsecamente resistentes a diversos antimicrobianos empregados na prática clínica, bem como podem adquirir novos mecanismos de resistência a diferentes fármacos antimicrobianos.

Um estudo de 2019, realizado na fronteira entre o Laos e a Tailândia, examinou amostras de porcos advindos de açougues e mercados, bem como de humanos provenientes de hospitais e de trabalhadores dos açougues e mercados. Em ambos os países, considerando o total de amostras, *E. faecium* foi prevalente, com 47,1% (n=169) na Tailândia e 65,7% (n=190) no Laos, contra 24,2% (n=87) no primeiro país e 12,8% (n=37) no segundo para *E. faecalis*. Considerando apenas as amostras de origem humana, na Tailândia houve predominância de *E. faecalis* com 32,8% das amostras (n=39), contra 21% (n=25) amostras positivas para *E. faecium*. No Laos, a maior frequência foi de *E. faecium* em 82,5% (n=47), contra 12,3% (n=7) para *E. faecalis* (THU *et al.*, 2019). Em nosso estudo que continha apenas amostras humanas, foi encontrada uma menor prevalência para ambas as espécies com 6,3% (n=34) de *E. faecalis* e 2,4% (n=13) de *E. faecium*.

Por ser comumente encontrado em ambientes nosocomiais, microrganismos do gênero *Enterococcus* podem ser transmitidos por profissionais da saúde, que, em geral, são menos vulneráveis às doenças enterocócicas por apresentarem um rigoroso hábito de higiene das mãos, imunocompetência e por serem continuamente expostos a estes patógenos (ROSENTHAL *et al.*, 2013). No presente estudo, foram encontradas menores frequências de colonização por enterococos em trabalhadores da saúde, em ambos os cenários avaliados. Dentre os 44 profissionais da saúde da clínica da Faculdade de Odontologia da UFF, 13,6% apresentaram resultado positivo para ambas as espécies enterocócicas. Já entre os 38 profissionais de saúde do

HMON, hospital de referência para tratamento de pacientes com COVID-19 na cidade de Niterói, cerca de 8% dos participantes eram portadores de *E. faecalis* e/ou *E. faecium*.

A deflagração da pandemia de COVID-19 também parece contribuir para a disseminação de enterococos no ambiente hospitalar. Foi demonstrado que a presença desse gênero na microbiota intestinal é aumentada em casos graves de infecção por SARS-CoV-2 (O'TOOLE, 2021). Casos de bacteremia enterocócica também foram reportados em pacientes acometidos por essa infecção viral (HUGHES *et al.*, 2020).

Dentre os 47 espécimes positivos para *Enterococcus* spp., houve maior frequência da espécie *E. faecalis* (72,3%) em relação à espécie *E. faecium* (27,6%) amostras. Apenas um (2,1%) espécime, obtido da nasofaringe, obteve resultado positivo para ambas as espécies. Geralmente, essa prevalência de *E. faecalis* é observada principalmente em amostras clínicas, como podemos verificar em um estudo de 2016 realizado no Irã, no qual foram encontrados índices similares na identificação pelo método de PCR de amostras de diversos sítios de coleta tanto para *E. faecalis* (n=175; 72,3%), quanto para *E. faecium* (n=67; 27,6%) (NASAJ *et al.*, 2016).

Ao analisar a presença de enterococos por espécime clínico, foi encontrada uma maior frequência em saliva (13,4%), seguido por nasofaringe (7,8%) e orofaringe (5%). Assim, é possível sugerir que, dentre os sítios avaliados, o melhor espécime para a investigação do estado de portador de enterococos seria a saliva, uma vez que esse sítio permitiu uma melhor detecção nos participantes do estudo. Apesar disso, houve 14 (7,8%) participantes nos quais foi detectada a presença de *E. faecalis* e/ou *E. faecium* apenas nos outros sítios investigados (orofaringe e/ou nasofaringe). Dessa forma, a pesquisa combinada a partir dos três espécimes investigados aumentou a sensibilidade de detecção das principais espécies enterocócicas avaliadas no estudo.

Em relação à presença de *E. faecalis* em saliva, no presente estudo foi encontrada uma prevalência de 11,7%. Entretanto, em um estudo de 2008 realizado no Rio de Janeiro, utilizando também PCR como forma de detecção, foi encontrada uma frequência para a espécie de 35,1% (n=79) em 225 pacientes. Neste mesmo trabalho, muitos dos pacientes incluídos apresentavam periodontite, condição que

pode favorecer o aumento do número de micro-organismos na cavidade oral (SOUTO *et al.*, 2008).

Em relação à presença de *Enterococcus* spp. na nasofaringe, um estudo de 2018 realizado na Angola que buscou a presença de bactérias em 152 pacientes com perfuração da membrana timpânica e secreção auricular, encontrou 10 (3,4%) amostras nasofaríngeas positivas para o gênero. A detecção de enterococos nas 289 amostras foi realizada a partir de cultura em ágar sangue, a qual foi submetida à técnica de MALDI-TOF (UDDÉN *et al.*, 2018). Este resultado se mostrou inferior ao encontrado em nosso estudo, que detectou os enterococos em 14 (7,8%) dos 180 espécimes coletados da nasofaringe. Esta diferença pode ser explicada pelos métodos de diagnóstico usados nos dois estudos, uma vez que empregamos uma técnica molecular.

Considerando que a metodologia molecular baseada em PCR é, em tese, mais sensível que os métodos dependentes de cultura, nós voltamos aos espécimes positivos para *E. faecalis* e/ou *E. faecium* por PCR para tentar isolar as amostras de enterococos, empregando um meio seletivo indicador para o gênero, o ágar bile esculina. Como esperado, a sensibilidade do método de cultura foi menor. Analisando por espécimes, dos 47 positivos na PCR, apenas 23 (48,9%) se mostraram positivos por cultura, sendo 20 (58,8%) relacionados à espécie *E. faecalis* e três (23,1%) à *E. faecium*. Contudo, para confirmar o resultado referente ao isolamento das amostras bacterianas, será necessário realizar testes fenotípicos convencionais adicionais para a identificação do gênero, como coloração de Gram, produção da enzima catalase, crescimento em NaCl a 6,5% hidrólise do PYR e do LAP, bem como testes para a identificação das espécies enterocócicas, que incluem testes de fermentação de vários açúcares, descarboxilação da arginina, motilidade e produção de pigmento (ANVISA, 2013). Alternativamente, poderiam ser empregadas técnicas moleculares fenotípicas, como MALDI-TOF, ou genotípicas, como aquelas baseadas em PCR e sequenciamento (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

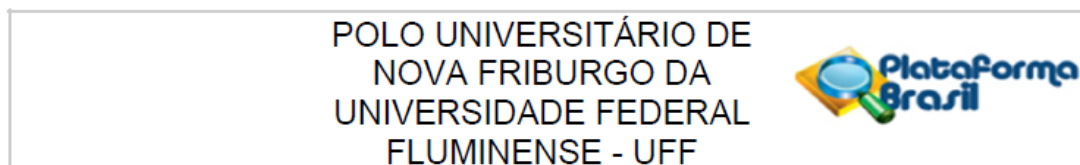
Nosso estudo teve algumas limitações. Não foi possível realizar a cultura em meio seletivo em todos os espécimes clínicos, porém empregamos uma técnica molecular, mais sensível, para detecção de enterococos. Além disso, investigamos apenas 2 espécies, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, mas que são as principais detectadas em seres humanos.

6. CONCLUSÃO

- A prevalência de colonização por *Enterococcus* spp. entre os 180 participantes da pesquisa foi de 21,1%. A espécie *E. faecalis* foi a prevalente (14,4%), com o dobro da frequência de *E. faecium* (7,2%);
- Entre as subpopulações do estudo, a detecção de *Enterococcus* spp. foi maior em pacientes do que em profissionais de saúde, com destaque para a maior prevalência em pacientes hospitalizados (41,2%) e a menor prevalência em profissionais de saúde do hospital (7,9%);
- A saliva foi o espécime clínico no qual houve maior detecção de *Enterococcus* spp. (13,4%). Por espécie, *E. faecalis* foi mais comumente detectado em saliva (11,7%) e *E. faecium*, em espécimes de nasofaringe (5%).
- Menos da metade (n=23; 48,9%) dos 47 espécimes positivos para *E. faecalis* e/ou *E. faecium* por PCR apresentaram crescimento sugestivo de enterococos em ágar bile esculina, embora ainda haja a necessidade de confirmação da identificação das amostras isoladas.

7. ANEXOS

ANEXO 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Prevalência de periodontopatógenos e infecção assintomática por SARS-CoV-2 e Streptococcus pneumoniae e características clínico-demográficas e socioeconômicas de indivíduos adultos de Niterói, RJ

Pesquisador: FELIPE PIEDADE GONÇALVES NEVES

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 36592820.8.0000.5626

Instituição Proponente: Instituto Biomédico

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.353.047

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante a área.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

NOVA FRIBURGO, 21 de Outubro de 2020

Assinado por:
WANTUIL RODRIGUES ARAUJO FILHO
(Coordenador(a))

8. BIBLIOGRAFIA

- ANVISA, B. M. da E. A. N. de V. em S. Módulo 5: Detecção e identificação de bactérias de importância médica. **Microbiologia Clínica para o controle da infecção relacionada à assistência em saúde**, [s. l.], p. 1–154, 2013.
- BROOKS, G. *et al.* **Jawetz, Melnick e Adelberg MICROBIOLOGIA MÉDICA**. [S. l.: s. n.], 2014.
- DA SILVA, L. P. P. *et al.* Genetic features and molecular epidemiology of *Enterococcus faecium* isolated in two university hospitals in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 267–271, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.07.012>.
- DEPARDIEU, F.; PERICHON, B.; COURVALIN, P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 42, n. 12, p. 5857–5860, 2004.
- IORE, E.; VAN TYNE, D.; GILMORE, M. S. Pathogenicity of enterococci. **Gram-Positive Pathogens**, [s. l.], v. 2007, n. 8, p. 378–397, 2019.
- FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, [s. l.], v. 155, n. 6, p. 1749–1757, 2009.
- GARCÍA-SOLACHE, M.; RICE, L. B. The *Enterococcus*: A model of adaptability to its environment. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 32, n. 2, 2019.
- GIANNITSIOTI, E. *et al.* Bloodstream Infections in a COVID-19 Non-ICU Department: Microbial Epidemiology, Resistance Profiles and Comparative Analysis of Risk Factors and Patients' Outcome. **Microorganisms**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1–12, 2022.
- HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. **Virulence**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 421–569, 2012.
- HUGHES, S. *et al.* Bacterial and fungal coinfection among hospitalised patients with COVID-19. **Clin Microbiol Infect.**, [s. l.], v. 26, n. January, p. 1395–1399, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32603803/>.
- JACKSON, S. S. *et al.* Bacterial burden is associated with increased transmission to health care workers from patients colonized with vancomycin-resistant *Enterococcus*. **American Journal of Infection Control**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 13–17, 2019.
- JACKSON, C. R.; FEDORKA-CRAY, P. J.; BARRETT, J. B. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 42, n. 8, p. 3558–3565, 2004.

LERMINIAUX, N. A.; CAMERON, A. D. S. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. **Canadian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 34–44, 2019.

MILLER, W. R.; MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, [s. l.], v. 6, n. 2 Suppl, p. 190–192, 2014.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia Médica 7^a edição. **Microbiologia Médica**, [s. l.], p. 1808, 2014.

NASAJ, M. *et al.* Prevalence of virulence factors and vancomycin-resistant genes among *Enterococcus faecalis* and *E. Faecium* isolated from clinical specimens. **Iranian Journal of Public Health**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 806–813, 2016.

O'TOOLE, R. F. O. The interface between COVID-19 and bacterial healthcare-associated infections. **Clinical Microbiology and Infection journal**, [s. l.], v. 27, n. January, p. 1772–1776, 2021.

PENDLETON, J. N.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 297–308, 2013.

PÖNTINEN, A. K. *et al.* Apparent nosocomial adaptation of *Enterococcus faecalis* predates the modern hospital era. **Nature Communications**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-21749-5>.

ROSENTHAL, M. *et al.* Healthcare workers' hand microbiome may mediate carriage of hospital pathogens. **Pathogens**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1–13, 2013.

SOUTO, R.; COLOMBO, A. P. V. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. **Archives of Oral Biology**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 155–160, 2008.

THU, W. P. *et al.* Prevalence, antimicrobial resistance, virulence gene, and class 1 integrons of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from pigs, pork and humans in Thai-Laos border provinces. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [s. l.], v. 18, p. 130–138, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.05.032>.

UDDÉN, F. *et al.* Aerobic bacteria associated with chronic suppurative otitis media in Angola. **Infectious Diseases of Poverty**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–10, 2018.

WATERS, D. L. E.; SHAPTER, F. M. The polymerase chain reaction (PCR): General methods. **Methods in Molecular Biology**, [s. l.], v. 1099, n. 1, p. 65–75, 2014.

XAVIER, B. B. *et al.* Novel vancomycin resistance gene cluster in. **Euro surveillance**, [s. l.], v. 1, n. June, p. 1–6, 2021.

ZAHEER, R. *et al.* Surveillance of *Enterococcus* spp. reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One-Health continuum. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–16, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-61002-5>.