

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO BIOMÉDICO
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA**

JÚLIA ASSIS DA SILVA NASCIMENTO

**IDENTIFICAÇÃO DE *ENTEROCOCCUS* SPP. ISOLADOS DE PACIENTES
CARDIOPATAS ATRAVÉS DO USO COMPLEMENTAR DE MALDI-TOF
MS E AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE AOS
ANTIMICROBIANOS**

Orientadora: PROF.^a DR.^a JÚLIA PEIXOTO DE ALBUQUERQUE

Niterói
2018

JÚLIA ASSIS DA SILVA NASCIMENTO

**IDENTIFICAÇÃO DE *ENTEROCOCCUS* SPP. ISOLADOS DE PACIENTES
CARDIOPATAS ATRAVÉS DO USO COMPLEMENTAR DE MALDI-TOF
MS E AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE AOS
ANTIMICROBIANOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de
Graduação em Biomedicina da
Universidade Federal
Fluminense, como requisito
parcial a obtenção do Grau de
Bacharel em Biomedicina com
habilitação em Análises Clínicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Júlia Peixoto de Albuquerque
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Marcia Soares Pinheiro

Niterói
2018

JÚLIA ASSIS DA SILVA NASCIMENTO

IDENTIFICAÇÃO DE *ENTEROCOCCUS* SPP. ISOLADOS DE PACIENTES
CARDIOPATAS ATRAVÉS DO USO COMPLEMENTAR DE MALDI-TOF MS E
AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Biomedicina da
Universidade Federal Fluminense, como
requisito parcial a obtenção do Grau de
Bacharel em Biomedicina com habilitação em
Análises Clínicas.

COMISSÃO EXAMINADORA

Aprovado em _12_ de dezembro de 2018

Prof.^a Dr.^a Júlia Peixoto de Albuquerque - Orientadora
Universidade Federal Fluminense - UFF

Prof.Dr. Felipe Piedade Gonçalves Neves
Universidade Federal Fluminense - UFF

Prof.^a Dr.^a Rachel Leite Ribeiro
Universidade Federal Fluminense - UFF

Niterói
2018

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais,
aos amigos de longe e de perto e
aos queridos professores que marcaram
minha trajetória acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos Céus e ao Criador por ter me permitido chegar ao fim de mais uma das muitas etapas da vida, seu cuidado expresso por cada uma das pessoas especiais, que fizeram parte desta etapa chamada graduação em Biomedicina na Universidade Federal Fluminense. Minha gratidão a cada um que contribuiu para que esse caminho fosse menos difícil, mais possível e, algumas vezes, mais divertido.

Aos incríveis senhor e senhora Nascimento e ao meu irmão Matheus, que acima de tudo sonharam junto comigo, confiaram em mim, quando nem mesmo, a moça aqui, já tinha forças para fazê-lo. Obrigada pelo apoio, pelos incentivos, pela paciência e força que me transmitiram em meio a todos os furacões de cada semestre. Obrigada por se fazerem presente mesmo com a distância e por não medirem esforços para minha permanência aqui na “cidade grande”.

À querida professora Júlia Peixoto, pela orientação e paciência no desenvolvimento deste trabalho e pela orientação ao longo dos trabalhos, congressos, monitoria, projetos e pelo compartilhar do tempo e da vida no decorrer desses quase 3 anos juntas. Foram muitas descobertas, inclusive a intensidade e emoção compartilhada!

Ao professor Felipe Piedade pelas “orientações e dicas de corredor” além dos reagentes para a realização das técnicas moleculares, ao professor Aloysio Cerqueira e André Barbosa pela ajuda na interpretação dos resultados moleculares e pelos conselhos pra vida.

À professora Márcia Pinheiro pela co-orientação e pela minha introdução ao incrível mundo das bactérias. Pela ajuda, conversas e abraços durante a execução deste trabalho e pela oportunidade de participar de tantas coisas relevantes à minha formação no decorrer desses 3 anos de convivência. Obrigada por partilhar seu conhecimento e experiência!

Ao meu querido e muito amado Renan Novaes, pela dádiva de conhecer seu coração e saber quanto amor cabe nele! Obrigada por ser quem você é, pela confiança e paz que me traz! Sou grata por todos os momentos que passamos, pois eles moldaram quem somos hoje. Obrigada pela paciência, pelo carinho, pelos ensinamentos, pelas horas no telefone, por dividir seus sonhos e me permitir sonhar junto!

À querida Tamara Marques pela alegria de poder compartilhar o tempo com você e dividir um pouquinho de tudo, até mesmo o quarto né!? Obrigada pela pessoa e amiga maravilhosa que é! Gratidão por todos os momentos e perrengues juntas! Ao meu querido Vitor Lima pelo carinho e pelas boas risadas compartilhadas, pelas ajudas nos rolês da vida e da IMUNO!

Aos queridos Gabriel Garcia e Luiz Boechat, amigos de longa data que me acompanham desde a Cidadezinha... Obrigada por serem tão importantes e por compartilhar o carinho e a amizade! Como costumo dizer, rumo ao infinito essa parceria vai!

Aos amigos Samuel Bandeira, Rosane Rebeca e Natalia Beraldi pelo privilégio da amizade e parceria e por todo apoio na concretização do sonho chamado Universidade Pública Federal. A querida Sally Andria pela amizade, experiências e exemplo de força e fé.

Gratidão à Liga Acadêmica de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia pelas experiências, desafios e aprendizados! Foi um grande prazer fazer parte desta equipe!

Ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia, do Instituto Biomédico.

À Universidade Federal Fluminense, na pessoa do magnífico Reitor Antônio Claudio Lucas da Nóbrega.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelos fomentos concedidos à Universidade Federal Fluminense e apoio institucional.

A todos que não foram citados, mas que tenham contribuído em algum momento ao longo desta jornada, muitíssimo obrigada.

Palavras de Fernando Anitelli: “Agora é assim, de um lado a poesia, o verbo a saudade. Do outro, a luta, a força e a coragem pra chegar ao fim”. Terminando dizendo que este é apenas o início dessa estrada.

EPÍGRAFE

“Fracassar é parte crucial do sucesso.
Toda vez que você fracassa e se recupera, exercita
a perseverança que é a chave da vida. Sua força
está na habilidade de se recompor”.

Michelle Obama

“Deixo a minha fé guiar
Sei que um dia chego lá
Porque Deus me fez assim
Dona de mim”

Iza

RESUMO

O gênero *Enterococcus* é constituído por cocos Gram positivos dispostos aos pares ou em cadeias curtas, sendo encontrados em microbiota de humanos e animais. Eles são ubíquos, capazes de sobreviver em diversos ambientes. Entretanto, esse gênero emergiu como um importante patógeno oportunista causador de infecções no ambiente hospitalar e na comunidade, principalmente em indivíduos imunocomprometidos ou com co-morbidades associadas. O presente estudo tem como objetivo identificar as espécies de *Enterococcus* sp. provenientes de fezes de pacientes cardiopatas e avaliar os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos. As amostras foram identificadas através de PCR Multiplex e Uniplex, além da metodologia de Espectrometria de Massa de Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz – tempo de voo (MALDI-TOF MS). Para avaliação do fenótipo de resistência antimicrobiana, foram utilizados cultivo em ágar cromogênico VRE e a técnica de disco-difusão. Das 132 amostras, 27 (20,5%) como *E. faecalis* e 21 (15,9%) foram identificadas como *E. faecium*. Além disso, 84 (63,6%) não foram identificadas por PCR. Já a partir da identificação por MALDI-TOF MS, das 140 amostras, 63 (45%) foram identificados como *Enterococcus faecalis*, 48 (34,3%) como *Enterococcus faecium*, 9 (6,4%) como *Enterococcus hirae*, 6 (4,3%) como *Enterococcus durans*, uma (0,7%) como *Enterococcus casseliflavus* e 13 cepas não foram identificadas no $score \geq 2,0$. Os perfis de multirresistência (MDR – Multidrug Resistance) foram exibidos por 4 (6,1%) das 65 amostras analisadas, e 10 (15,3%) foram resistentes ao menos a duas das drogas analisadas.

Palavras-chave: *Enterococcus* spp., MALDI-TOF MS, multirresistência

ABSTRACT

The genus *Enterococcus* is composed of Gram positive cocci disposed in pairs or in short chains, being found in microbiota of humans and other animals. They are ubiquitous, and survive in several environments. However, this genus has emerged as an important opportunistic pathogen causing infections in the hospital environment and in the community, mainly in immunocompromised individuals or with associated comorbidities. The present study aims to identify the species of *Enterococcus* species recovered from feces of patients with heart disease and to evaluate antimicrobial susceptibility profiles. Samples were identified by Multiplex and Uniplex PCR, in addition to the Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) methodology. To evaluate the antimicrobial resistance phenotype, we culture on VRE and disc-diffusion test. Of the 132 samples, 21 (15.9%) were identified as *E. faecium* and 27 (20.5%) were *E. faecalis*. In addition, 84 (63.6%) were not identified by PCR. On the other hand, the presence of *Enterococcus faecalis* was associated with the presence of *Enterococcus faecalis*, which was identified as *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecalis* (6). 4.3%) as *Enterococcus durans*, one (0.7%) as *Enterococcus casseliflavus* and 13 strains were not identified in the score ≥ 2.0 . Multidrug Resistance (MDR) profiles were shown by 4 (6.1%) of the 65 samples analyzed, and 10 (15.3%) were resistant to at least two of the drugs analyzed.

Keywords: *Enterococcus* spp., MALDI-TOF MS, multidrug-resistance

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES	
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1 O GÊNERO <i>ENTEROCOCCUS</i> SPP.....	21
3.2 IMPORTÂNCIA DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM <i>ENTEROCOCCUS</i> SPP.....	23
3.2.1 Resistência a Beta-Lactâmicos.....	24
3.2.2 Aminoglicosídeos.....	25
3.2.3 Estreptograminas.....	25
3.2.4 Trimetoprim-sulfametoxazol.....	26
3.2.5 Glicopeptídios.....	26
3.2.6 Macrolídeos.....	26
3.2.7 Tetraciclinas.....	27
3.2.8 Daptomicina.....	27
3.2.9 Quinolonas.....	27
3.3 DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA EM BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>ENTEROCOCCUS</i> SPP.....	28
3.3.1 Ágar Cromogênico VRE.....	28
3.3.2 Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (TSA).....	28
3.4 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>ENTEROCOCCUS</i> SPP.....	28
3.4.1 PCR.....	28
3.4.1.1 Princípio da técnica.....	29
3.4.1.2 Aplicações na identificação microbiana e Vantagens.....	30
3.4.2 MALDI TOF-MS.....	30
3.4.2.1 Princípio do método.....	31
3.4.2.2 Aplicações na identificação microbiana e Vantagens.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS DO ESTUDO.....	34
4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	34
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	34
4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	35
4.5 ISOLAMENTO.....	35
4.6 MANUTENÇÃO.....	35
4.7 CONGELAMENTO.....	36
4.8 DESCONGELAMENTO.....	36
4.9 AMOSTRAS ANALISADAS NO ESTUDO.....	37
4.10 IDENTIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	37
4.10.2 Obtenção de DNA.....	37
4.10.3 PCR.....	38
4.10.4 Eletroforese.....	39
4.11. IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DE IONIZAÇÃO POR DESSORÇÃO A LASER ASSISTIDA POR MATRIZ – TEMPO DE VÔO (MALDI TOF	

MS).....	39
4.12 TESTE TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS ATRAVES DO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO.....	40
4.12.1 <i>Técnica de difusão em ágar</i>	40
4.12.2 <i>Ágar cromogênico VRE</i>	41
5 RESULTADOS	42
5.1 IDENTIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES POR MÉTODO MOLECULAR.....	42
5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DE IONIZAÇÃO POR DESSORÇÃO A LASER ASSISTIDA POR MATRIZ – TEMPO DE VÔO (MALDI-TOF MS).....	42
5.3 COMPARAÇÃO AS METODOLOGIAS PARA IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DE <i>ENTEROCOCCUS FAECIUM</i> E <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i>	43
5.4 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS.....	47
5.4.1 <i>Deteccção da presença de VRE</i>	47
5.4.2 <i>Perfil de resistência a antimicrobianos</i>	47
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	56
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de amostras analisadas em cada uma das metodologias.....	37
Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose representando os fragmentos relacionados à PCR multiplex para a identificação de <i>Enterococcus</i> sp.....	42
Figura 3 - Identificação por MALDI-TOF MS dos micro-organismos isolados de amostras de fezes de pacientes cardiopatas atendidos pela Clínica Coração Valente em Niterói, Rio de Janeiro.....	43
Figura 4 - Cepa VRE positiva no Ágar Cromogênico.....	47
Figura 5 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos 65 isolados de <i>Enterococcus</i> spp. provenientes de fezes de pacientes cardiopatas, através da técnica de disco-difusão.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores empregados para a identificação do gênero e das principais espécies.....	38
Tabela 2 - Comparação das metodologias utilizadas.....	44
Tabela 3 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de 65 isolados de <i>Enterococcus</i> spp., provenientes de fezes de pacientes cardiopatas.....	47
Tabela 4 - Perfil de resistência dos 65 isolados.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES

CMI	Concentração Mínima Inibitória
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfatado
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EMAs	Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos
HLGR	Resistência a Altos Níveis de Gentamicina (do inglês <i>High Level Gentamicin Resistance</i>)
HLSR	Resistência a Altos Níveis de Estreptomicina (do inglês <i>High Level Streptomycin Resistance</i>)
HUAP	Hospital Universitário Antônio Pedro
ITUs	Infecções do Trato Urinário
LAP	L-leucina- β -naftilamida
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MGP	Metil- α -D-glicopiranosídeo
MDR	Multirresistência (do inglês <i>Multi-drug Resistance</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBP	Proteína Ligadora de Penicilina (do inglês <i>Penicillin Binding Protein</i>)
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PYR	L-pirrolidonil- β -naftilamida
RNAr	Ribonucleico Ribossômico

TBE	Tris, ácido bórico e EDTA
TGI	Trato Gastrointestinal
TSA	Àgar triptona de soja
TSB	Caldo triptona soja
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VRE	Enterococos resistentes à vancomicina

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* é constituído por microrganismos ubíquos que colonizam o trato gastrointestinal de humanos e animais, além de serem capazes de se desenvolver em outros ambientes como solo, água e alimentos (FISHER & PHILLIPS, 2009; FRACALANZZA et al., 2007). Esses patógenos têm emergido como oportunistas, sendo responsáveis por milhões de infecções anualmente (BYAPPANAHALLI et al., 2012).

As bactérias deste grupo foram originalmente descritas no final do século XIX como saprófitas isoladas a partir de amostras intestinais e, em seguida, como potencialmente patogênicas, quando isoladas a partir de um caso letal de endocardite infecciosa (THIERCELIN, M.E. & JOUHAUD L., 1903 apud LEBRETON, WILLEMS & GILMORE, 2014; MACCALLUM, W. G. & HASTINGS T.W.A., 1899 apud LEBRETON, WILLEMS & GILMORE, 2014). Desde então, os enterococos passaram a ser descritos como agentes etiológicos de uma série de infecções na comunidade - incluindo infecções pélvicas, infecções neonatais e infecções do trato urinário (ITUs), além da própria endocardite infecciosa. Assim, se comportam como patógenos oportunistas causadores de infecções no ambiente hospitalar e na comunidade (ARIAS, CONTRERAS & MURRAY, 2010; ARIAS & MURRAY, 2012).

Esses microrganismos estão associados a um grande número de infecções de difícil tratamento, porque têm adquirido genes que conferem resistência aos tratamentos convencionais, levando à piora do paciente e ao conseqüente agravamento do quadro (RICE, 2008; MADSEN et al., 2017). O crescente aumento da resistência aos antimicrobianos e a rápida disseminação de genes de virulência entre diferentes espécies bacterianas, principalmente em ambiente hospitalar, levam a um quadro emergencial que envolve o diagnóstico rápido e a concomitante detecção de resistência a antimicrobianos, aumentando a eficácia dos tratamentos. A identificação de pacientes portadores de Enterococos Resistentes à Vancomicina (VRE), bem como de outras bactérias resistentes, que conferem risco para o desenvolvimento de sepse bacteriana, ainda é um problema clínico crescente e, conseqüentemente, permanece um desafio.

Com a problemática da resistência, somado às dificuldades no diagnóstico baseado em provas bioquímicas, faz-se necessário o desenvolvimento de novas

metodologias de diagnóstico. Desta forma, a atividade laboratorial abordada neste estudo, foi de extrema importância para a prática clínica, visto que são técnicas e metodologias que vêm sendo amplamente utilizadas e que contribuem para o diagnóstico laboratorial de infecções bacterianas potencialmente resistentes. Além disso, destaca-se a importância da detecção e avaliação da resistência bacteriana em amostras da microbiota de pacientes cardiopatas do ambiente comunitário, visto que estes são candidatos a possíveis intervenções cirúrgicas e internações em ambiente hospitalar, sendo possíveis carreadores destes microrganismos.

Os métodos clássicos de diagnóstico, por mais que estejam bem consolidados, ainda apresentam demora na entrega dos resultados, em razão de serem baseados no crescimento do microrganismo. Surge, assim, a necessidade de técnicas que auxiliem nesta busca; nesse sentido, o uso do método de MALDI-TOF MS agrega sensibilidade e rapidez à identificação do agente, pois faz o reconhecimento por meio da detecção de proteínas e a comparação destas com uma base de dados, gerando um resultado em minutos.

Estudos têm mostrado que o desempenho desse tipo de identificação chega a 90% de concordância. Um estudo retrospectivo mostrou que das 1116 amostras de rotina representando os principais grupos bacterianos encontrados no laboratório de microbiologia clínica tiveram 95,2% de identificação correta por MALDI-TOF MS (EIGNER, U. et al., 2009). Seng e colaboradores (2009) mostraram que, de 1660 amostras bacterianas, representando 109 espécies diferentes, 84,1% foram corretamente identificados por MALDI-TOF MS em nível de espécie. As identificações ausentes ou errôneas apareceram em 11,3%, as quais foram atribuídas a entradas incorretas de banco de dados do *software* do equipamento. Em uma análise prospectiva de 980 amostras, abrangendo sangue, urina, líquido, secreções respiratórias, pus e amostras de ferida, foi encontrada uma concordância geral entre MALDI-TOF MS e métodos convencionais de 92% em nível de espécie e 6,8% em nível de gênero (VAN VEEN, CLAAS & KUIJPER; 2010). Bizini e Greub (2010) avaliaram 1278 amostras e houve discordância em 3% (39) e em 1,9% (24) em nível de gênero e espécie, respectivamente. Os resultados discordantes foram atribuídos a diferenças taxonômicas sistemáticas relacionadas ao banco de dados, à má discriminação dos espectros obtidos e a erros na identificação convencional inicial. Estes estudos mostraram que o método de MALDI-TOF MS tem uma alta precisão para a maioria

das identificações microbianas e foi realizada igualmente, ou melhor, do que as técnicas convencionais.

As diferenças mais marcantes entre o sistema de MALDI-TOF MS e os métodos de identificação convencionais são observadas no tempo estimado e nos custos necessários para a identificação da amostra. Comparado aos métodos de identificação convencionais, a identificação por MALDI-TOF MS mostrou conferir, na maioria dos casos, um ganho significativo tanto no tempo de trabalho do técnico (procedimento pré-analítico para preparar amostras), quanto no tempo de resposta (procedimento analítico automatizado para obter resultados).

Entendendo esta importância, as bactérias isoladas analisadas neste estudo foram identificadas por este método; tal ação pode diminuir o tempo de hospitalização e até mesmo os custos de uma intervenção, a partir da identificação precoce de um microrganismo (BEEKMANN et al. 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Identificar a presença de *Enterococcus* sp. e avaliar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos provenientes de fezes de pacientes cardiopatas.

2.2 ESPECÍFICOS

- Identificar as espécies de *Enterococcus* sp. por meio de análises moleculares – reação em cadeia da polimerase (PCR) e Espectrometria de Massa de Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz – tempo de voo (MALDI-TOF MS);
- Comparar as metodologias para identificação rápida de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*;
- Avaliar a presença de VRE entre as amostras a partir do Ágar cromogênico;
- Analisar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O GÊNERO *ENTEROCOCCUS* SPP.

As bactérias desse gênero são identificadas como cocos Gram-positivos, dispostos aos pares ou em cadeias de formato ovoides a cocobacilos. Em ágar sangue, as colônias podem ser alfa-hemolíticas ou não hemolíticas com tamanho médio de 1 a 2 mm de diâmetro. São catalase negativos, possuem capacidade de hidrolizar a esculina e crescer na presença de bile e em ambientes com elevadas concentrações de sal (6,5%), além de serem PYR positivos, características que comumente são usadas ao se realizar a identificação presuntiva do gênero *Enterococcus* (FACKLAM; CARVALHO & TEIXEIRA, 2002).

Os enterococos pertencem à família *Enterococcaceae* e são compostos por 56 espécies e duas subespécies já descritas (EUZÉBY, 2018). Foram observados pela primeira vez por Thiercelin e, por sua origem intestinal, foram chamados de “entérocoque” (THIERCELIN, M. E. & JOUHAUD L., 1903 apud LEBRETON, WILLEMS & GILMORE, 2014). Foram classificados genericamente como *Enterococcus*; porém, em 1906, Andrewes e Horder propuseram a nomenclatura *Streptococcus*, em razão de o microrganismo formar cadeias curtas ou longas dependendo das condições oferecidas (ANDREWES & HORDER, 1906 apud KALINA, 1970). Posteriormente, esses microrganismos foram incluídos no gênero *Streptococcus* com os demais estreptococos hemolíticos e outros de origem láctea. Na década de 30, o gênero *Streptococcus* foi dividido por Sherman em quatro classes: piogênicos, viridans, lácteos e enterococos (SHERMAN, 1937; FACKLAM, CARVALHO & TEIXEIRA, 2002; FOULQUIÉ MORENO et al., 2006). Somente em 1984, Schleifer e Kilpper-Bälz, utilizando-se de técnicas moleculares, conseguiram realizar a distinção do gênero *Enterococcus*, incluindo assim, *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium*, no novo gênero.

A caracterização do gênero é baseada em provas bioquímicas como o crescimento em meios contendo 6,5% de NaCl, hidrólise da esculina, na presença de bile positividade dos testes de PYR e LAP, além de testes que indicam a produção de ácidos a partir de manitol, sorbose e descarboxilação da arginina. Outras provas bioquímicas são capazes de fazer a diferenciação em nível das espécies como a fermentação de arabinose, metil-D-glicopiranosídeo (MGP), rafinose, sacarose, sorbitol, utilização do piruvato de sódio, da produção de pigmento e da motilidade (TEIXEIRA, SIQUEIRA-CARVALHO & FACKLAM, 2007).

Epidemiologia

Por serem capazes de se desenvolver em condições adversas, os enterococos colonizam vários ambientes como solo, água, comida, plantas e animais (FISHER & PHILLIPS, 2009; TEIXEIRA, SIQUEIRA-CARVALHO & FACKLAM, 2007). Essa capacidade se deve à versatilidade metabólica e à resistência intrínseca a condições inóspitas; mesmo não sendo formadores de esporos, esses microrganismos são altamente tolerantes e podem persistir por meses em superfícies secas. Essas características, somadas aos mecanismos de resistência adquirida, favorecem a emergência desses microrganismos como patógenos resistentes.

No entanto, apesar do potencial patogênico, os enterococos geralmente apresentam baixos níveis de virulência, como evidenciado por sua presença como colonizadores naturais do trato gastrointestinal (TGI) de diversos animais, desde insetos ao homem. Além disso, apresenta-se o fato de que eles têm sido usados com segurança por décadas como probióticos em humanos e animais de fazenda, bem como na indústria de alimentos. A maioria das infecções por *Enterococcus* spp. origina-se da microbiota do paciente e, em menor proporção, pode ser transmitida por contato ou mesmo através do consumo de alimentos contaminados (WINN et al, 2014).

As espécies do gênero que geralmente estão associadas a doenças infecciosas são *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* e, além dessas, outras como *E. durans*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. dispar* e *E. raffinosus* são responsáveis por causar infecção ocasional em humanos (DEVRIESE et al., 1995; TANNOCK & COOK, 2002).

Enterococcus spp. e Colonização do Trato Gastrointestinal

Os enterococos colonizam o trato gastrointestinal de humanos e outros animais, insetos e nematoides, participando desta maneira da microbiota intestinal desses seres. Entretanto, o aumento da densidade de colonização e o uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro têm levado a sucessivas alterações da microbiota intestinal, facilitando a colonização por espécies resistentes aos antimicrobianos clássicos utilizados no tratamento de infecções enterocócicas.

Nas décadas de 1970 e 1980, as espécies do gênero desenvolveram resistência aumentada a diversas classes de antimicrobianos e, recentemente, emergiram como

patógenos associados a infecções multirresistentes. Essa situação faz com que os enterococos se tornem uma das causas mais comuns de infecções hospitalares associadas (REYES, BARDOSSY & ZERVOS, 2016). Com a emergência de VRE, alguns estudos procuraram descrever melhor as características da colonização por bactérias deste gênero. Pacientes colonizados por VRE geralmente têm o mesmo organismo colonizando sua pele (BEEZHOLD et al., 1997); além disso, já foi descrito que a quantidade de VRE aumentou em indivíduos saudáveis que já fizeram o uso de glicopeptídeos orais (VAN DER AUWERA et al., 1996).

A presença de cepas resistentes na microbiota intestinal está relacionada com a competição destas com as integrantes da microbiota normal. Apesar dos mecanismos de controle, principalmente os oferecidos pela microbiota intestinal anaeróbica, representada em grande parte pelos gêneros *Clostridium* e *Bacteroides*, as bactérias resistentes são capazes de estabelecer a colonização (ECKBURG et al., 2005). Esse fato, somado à administração de antimicrobianos de amplo espectro, tem aumentado o risco de colonização e transmissão de enterococos resistentes (DONSKEY, 2004). Há que se considerar, porém, que estudos recentes têm mostrado que a adoção de novos hábitos alimentares, como por exemplo o uso de probióticos, prebióticos e uso da Terapia de Transplante de fezes, têm auxiliado no restabelecimento da microbiota intestinal, influenciando diretamente no controle da resistência (DUBIN & PAMER, 2017; PAIXÃO & CASTRO, 2016).

3.2 IMPORTÂNCIA DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *ENTEROCOCCUS* SPP.

O gênero *Enterococcus* apresenta grande importância clínica devido à sua resistência aos antimicrobianos, favorecendo os riscos de colonização e infecção (KRISTICH et al., 2014). O uso de antimicrobianos de amplo espectro e vancomicina acabou favorecendo o aumento de cepas de *E. faecium* nosocomiais (HIDRON et al., 2008). Em meados da década de 1980 surgiram os VRE, primeiro na Europa entre os rebanhos e, depois, nos hospitais dos EUA (UTTLEY et al., 1989). O desenvolvimento de resistência nesse gênero tem aumentado o número de casos de infecções de difícil tratamento, aumentando também o número de mortes já desde a década de 90, quando estudos começaram a apontar a alta prevalência de *E. faecalis* e *E. faecium* em infecções clínicas (JETT, HUYCKE & GILMORE, 1994; TREITMAN et al., 2005; TOP et al., 2007). Aproximadamente 30% das infecções enterocócicas nos EUA são resistentes aos antimicrobianos, totalizando 20.000 casos resistentes a

antibióticos por ano, dos quais aproximadamente 1300 pacientes vão a óbito anualmente (CDC, 2013).

Os enterococos podem apresentar diferentes tipos de resistência, que geralmente são categorizadas em resistência intrínseca, quando codificada no genoma central de todas as cepas enterocócicas; e resistência adquirida, que é transmitida entre as cepas através de elementos genéticos móveis, por transferência horizontal (DUBIN & PAMER, 2017). Nesta última, os enterococos podem adquirir genes que conferem resistência a inúmeras classes de antimicrobianos, incluindo cloranfenicol, tetraciclina, macrolídeos, estreptograminas, níveis elevados de aminoglicosídeos e β -lactâmicos, glicopeptídeos e quinolonas (MURRAY et al., 1990; LECLERCQ, 1997). Tem sido mostrado que muitas cepas circulantes adquiriram resistência à maioria das opções terapêuticas restantes, incluindo vancomicina, linezolida, quinupristina/dalfopristina e daptomicina, tidas como último recurso para o tratamento da infecção enterocócica (YADAV, 2017).

3.2.1. Resistência a Beta-Lactâmicos

Representados pelas penicilinas e inibidores de beta-carbapenêmicos esta classe de antimicrobianos inibe o crescimento bacteriano pela modificação e posterior inativação de um grupo de enzimas conhecidas como PBP5 (do inglês, Penicillin Binding Protein - proteínas de ligação à penicilina). Codificada cromossomicamente, a PBP5 confere resistência a esta classe, uma vez que tem menor afinidade de ligação ao fármaco. A resistência à ampicilina está associada a mutações no gene que codifica a PBP5, reduzindo ainda mais a afinidade de ligação aos beta-lactâmicos (DUBIN & PAMER, 2017).

Resistência Intrínseca

Os enterococos são considerados intrinsecamente resistentes às cefalosporinas e às penicilinas, visto que expressam a PBP5, que confere sensibilidade natural reduzida às penicilinas. A resistência às cefalosporinas é tão elevada que o antimicrobiano não pode ser usado no tratamento das infecções enterocócicas. Um dos beta-lactâmicos mais utilizados nas infecções por enterococos é a ampicilina, nas concentrações de 1 a 16 $\mu\text{g/mL}$. Porém, quando as infecções são causadas por *E. faecium*, as concentrações podem chegar a 256 $\mu\text{g/mL}$, além de muitas das cepas já apresentarem resistência a este antimicrobiano (TORRES et al., 2018).

Resistência extrínseca

A resistência à ampicilina está associada a mutações no gene que codifica a PBP5, reduzindo ainda mais a afinidade de ligação aos beta-lactâmicos. Esta resistência é amplificada quando estão presentes múltiplas mutações nesse gene, visto que os alelos mutados podem ser transferidos horizontalmente. A aquisição de mutações específicas do gene *pbp5* contribuiu para a resistência de alto nível à ampicilina que cepas nosocomiais de *E. faecium* desenvolveram no final dos anos 70 e 80 (DUBIN & PAMER, 2017; MILLER; MUNITA & ARIAS, 2014).

3.2.2. Aminoglicosídeos

Resistência intrínseca

Representados classicamente pela estreptomomicina e gentamicina, a resistência intrínseca à classe em questão está relacionada à má absorção do antimicrobiano no espaço intracelular e pela capacidade de inativar os grupos hidroxila ou amino dos aminoglicosídeos através de enzimas que impedem a ligação alostérica e, consequentemente, diminui a ligação com o alvo (MILLER; MUNITA & ARIAS, 2014).

Resistência extrínseca

A resistência a altos níveis dentro da classe resulta principalmente da aquisição de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs), que levam a mutações e interferem na ligação do fármaco ao alvo. Desde a década de 1980, a resistência à gentamicina tem sido relatada e está relacionada à presença de mutações ou à aquisição de DNA exógeno. Assim, tem sido cada vez mais comum a associação de medicamentos no tratamento das infecções enterocócicas agudas. A gentamicina de 120 µg, tem sido usada nesses tratamentos, porém a resistência a altos níveis de gentamicina (HLGR) em enterococos impede o sinergismo entre tal antimicrobiano e os demais que atuam na parede bacteriana (MILLER; MUNITA & ARIAS, 2014).

3.2.3 Estreptograminas

A quinupristina e a dalfopristina são derivados semissintéticos da pristamicina, uma estreptogramina natural. A droga é eficaz contra *E. faecium*, mas não

contra *E. faecalis*, uma vez que esta espécie apresenta um gene cromossômico que codifica uma proteína putativa transportadora, representando uma resistência intrínseca (MILLER; MUNITA & ARIAS, 2014).

3.2.4 Trimetoprim-sulfametoxazol

Trimetoprim e sulfametoxazol são drogas que atuam inibindo duas etapas consecutivas na biossíntese do ácido fólico, importante na manutenção das funções celulares dos microrganismos. Grande parte das bactérias é capaz de sintetizar o folato intracelularmente. Os enterococos, por sua vez, possuem a capacidade de absorver esse composto do ambiente e utilizarem outras fontes de folato. Assim, esta resistência intrínseca impede a eficácia desta composição (MILLER; MUNITA & ARIAS, 2014).

3.2.5 Glicopeptídios

Esta classe de antimicrobianos atua inibindo a síntese da parede celular pela formação de complexos com o terminal peptídico D-Ala-D-Ala, um dos precursores do peptidoglicano. Tais modificações inibem a ligação ao antimicrobiano e ainda permite a formação de uma parede celular funcional (FARON; LEDEBOER & BUCHAN, 2016).

Encontrados pela primeira vez na França e Inglaterra, na década de 80, o surgimento dos VRE foi relacionado com a avoparacina, glicopeptídeo usado na promoção de crescimento em rações animais (HOLLENBECK & RICE, 2012). A resistência à vancomicina, em enterococos, é mediada por um operon conhecido como Van, que pode ser transportado cromossomicamente ou de forma extracromossomial - via plasmídeo. Os operons Van podem determinar resistências de vários níveis (baixa, média ou alta), e os genes mais comuns são os *vanA*, *vanB* e *vanC*. O gene *vanA* confere alto nível de resistência à vancomicina (MIC, > 256 µg/ml) e está mais associado a *E. faecium* e *E. faecalis*. Já o *vanC* determina baixo nível de resistência à vancomicina (MIC, 8 a 32 µg / ml), e é encontrado em *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. flavescens* (CRANK & ODRISCOLL, 2015).

Existem atualmente nove operons associados à resistência já descritos em enterococos, que formam o alfabeto VAN, e são em maioria codificados por elementos móveis (LEBRETON et al., 2014).

3.2.6 Macrolídeos

São representados por diferentes compostos, sendo a eritromicina um dos mais representativos da classe. A resistência a macrolídeos foi relatada há pouco tempo, apesar de seu uso clínico em humanos ter iniciado em 1952. Dentre os genes que determinam a resistência aos macrolídeos está o *ermB*, difundido em humanos e outros animais. O principal mecanismo de resistência em enterococos é a alteração do sítio de ligação da enzima metilase, o que impede a ligação do antimicrobiano ao ribossomo (PORTILLO et al., 2000).

3.2.7 Tetraciclina

As tetraciclina se ligam na subunidade 30S do ribossomo e agem impedindo a ligação do aminoacil-t-RNA, interferindo na síntese proteica (PEREIRA-MAIA et al., 2010). A resistência às tetraciclina é mediada por vários genes e pode se dar por bombas de efluxo e proteção ribossômica, podendo ser transferida horizontalmente já que os genes estão inseridos em transposons (MILLER, MUNITA & ARIAS, 2014).

3.2.8 Daptomicina

Introduzido na década de 2000 no tratamento de infecções enterocócicas resistentes, a daptomicina atua alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática, resultando em morte celular. Os enterococos resistentes à daptomicina são capazes de alterar a composição da membrana celular por meio mutações em proteínas que desempenham um importante papel no metabolismo dos fosfolipídios. Por meio de transferência horizontal, esta mutação pode ser transferida a cepas de *E. faecalis* suscetíveis, conferindo, assim, resistência à daptomicina (DUBIN & PAMER, 2017).

3.2.9 Quinolonas

O mecanismo de ação das fluoroquinolonas se dá pela inibição da enzima DNA girase (topoisomerases tipo II e tipo IV), responsável pelo super-enovelamento negativo no DNA (KOLAR et al, 2006). As bactérias desenvolveram mecanismos de resistência que levam a alterações nos alvos de ligação da enzima, à diminuição da permeabilidade ou aumento da expressão de bombas de efluxo. A resistência adquirida nesta classe é resultado principalmente de mutações nos genes *gyrA* e *parC*, tendo sido descritas também aquisição de genes *qnr* e a expressão de bombas de efluxo (TORRES et al., 2018).

3.3 DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA EM BACTÉRIAS DO GÊNERO *ENTEROCOCCUS* SPP.

3.3.1 Ágar Cromogênico VRE

O ágar cromogênico VRE é um meio seletivo e diferencial para a identificação de *Enterococcus* spp. com resistência adquirida à vancomicina (VRE). O meio é capaz de inibir enterococos não resistentes, enterococos com resistência natural, a maioria das bactérias Gram negativas e Gram positivas, leveduras e bolores. Contém 8 µg/ml de vancomicina e usa substratos cromogênicos para diferenciar VRE fenotipicamente. Permite a detecção dos genótipos VanA e VanB e apresenta coloração diferencial entre as espécies - *E. faecium* irão formar colônias roxas e *E. faecalis*, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*, colônias azuis. A diferenciação se dá a partir da clivagem da substância cromogênica por enzimas produzidas pelo gênero *Enterococcus*, metabolizada pela atividade da enzima β-glicosidase (PELTROCHE-LLACSAHUANGA et al., 2009).

3.3.2 Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (TSA)

Descrito pela primeira vez em 1966, por Bauer e Kirby, o teste de disco-difusão é um método qualitativo simples que garante confiabilidade nos resultados, sendo um dos mais utilizados em laboratórios de microbiologia clínica. Sua importância está no fato de avaliar a susceptibilidade contra diferentes antimicrobianos e, conseqüentemente, servir de base para a escolha terapêutica (SEJAS et al., 2003). Por esse aspecto, o teste deve ser realizado de acordo com as normas estabelecidas para controle de qualidade, já que a interpretação errada ou o uso do antimicrobiano inadequado pode aumentar os riscos para o paciente.

O TSA é uma metodologia simples, mas fundamental para o monitoramento da resistência bacteriana, além de ser usado como uma medida de controle, impedindo a disseminação de bactérias multirresistentes. O teste é indicado para os seguintes gêneros/famílias: Enterobacteriaceae; *Pseudomonas* spp.; *Acinetobacter* spp.; *Staphylococcus* spp.; *Enterococcus* spp.; *Streptococcus pneumoniae*; *Streptococcus* do grupo *viridans* e beta-hemolítico; *Haemophilus influenzae*; Complexo *Burkholderia cepacia*; *Stenotrophomonas maltophilia*; *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*. (CLSI, 2018).

3.4 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *ENTEROCOCCUS* SPP.

3.4.1 PCR

Desenvolvida por Mullis e colaboradores (1983), a reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) é uma técnica que tem sido amplamente utilizada na identificação de espécies infecciosas e na detecção específica de diversos genes associados a resistência a antibióticos. Na identificação de enterococos, a PCR tem se mostrado uma importante ferramenta para a distinção das principais espécies envolvidas com as infecções em humanos. Uma variação da metodologia tem sido utilizada na identificação bacteriana, a PCR-Multiplex, na qual é possível avaliar mais de um alvo molecular em uma única reação (TITZE-DE-ALMEIDA, 2004).

A maioria dos genes-alvo de identificação bacteriana são conservados, como os que codificam a subunidade 16S do RNA ribossômico (*rrs*), RNA polimerase (*rpoB*), ou fatores de alongamento. O gene *rrs* foi previamente usado para desenvolver iniciadores específicos para a identificação de enterococos. Além disso, o gene da superóxido dismutase (*sodA*) foi identificado como um alvo potencial para a diferenciação de espécies de enterococos. Para a detecção em nível de gênero e espécies de enterococos, os genes usados são *tuf* – codifica o Fator de Elongação EF-Tu, *ddl* – codifica D-Ala:D-Ala ligase, e *sodA* – codifica Superóxido Dismutase magnésio-dependente, responsáveis pela identificação do gênero e das principais espécies em humanos: *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, respectivamente. (DEPARDIEU, PERICHON & COURVALIN, 2004; JACKSON, FEDORKA-CRAY & BARRETT, 2004; KE et al.,1999).

3.4.1.1 Princípio da técnica

Através de sucessivas etapas de variação da temperatura, a PCR promove a amplificação do DNA em nível exponencial. Para isso são utilizados di-nucleotídeos trifosfatados do DNA (dNTP's), sequências iniciadoras, *Taq* DNA polimerase, cofator enzimático (MgCl₂), tampão e a amostra a ser amplificada. O princípio da técnica envolve três etapas básicas de variação de temperatura: 1) desnaturação da fita molde de DNA - etapa com duração entre 30 s a 1 min a temperatura entre 92 °C a 96 °C; 2) anelamento dos iniciadores da reação de polimerização, ligando-se à região complementar da fita de DNA alvo que sofrerá a duplicação - etapa com duração de 30 s a 1 min, à temperatura entre 58 °C e 65 °C; e 3) extensão do DNA, ação realizada

pela enzima *Taq* DNA polimerase, resultando em novas fitas de DNA - etapa com duração entre 45 s e 1 min a 72 °C. Cada ciclo é repetido em torno de 30 a 35 vezes e promove a amplificação da região alvo determinada conforme o anelamento dos iniciadores. Ou seja, o iniciador reconhece, por complementaridade de bases, o local de início da região do DNA a ser amplificada, e fornece uma extremidade 3'-OH livre para a síntese da nova cadeia pela *Taq* DNA polimerase (JOSHI et al.; 2010).

3.4.1.2 Aplicações na identificação microbiana e vantagens

A biologia molecular permite uma rápida identificação bacteriana, garantindo sensibilidade e especificidade às reações. Além de permitir a identificação de organismos de crescimento lento, permite a detecção de microrganismos ainda não cultivados. Em segundo lugar, os resultados são geralmente obtidos em pouco tempo, especialmente se for utilizada a PCR em tempo real. Entretanto, é importante destacar que, mesmo com a alta sensibilidade da técnica, nem sempre os resultados obtidos são suficientes para determinar de forma eficiente a identificação ao nível da espécie. Assim, passos adicionais com o objetivo de amplificar outros genes-alvo são então requeridos (VALONES et al., 2009).

3.4.2. MALDI-TOF MS

Os métodos clássicos de identificação bacteriana são baseados na análise fenotípica frente às provas bioquímicas aplicadas como, por exemplo, a coloração de Gram, catalase e demais testes complementares de identificação (CROXATTO, PROD'HOM & GREUB, 2012). Com o desenvolvimento de novas metodologias, foram introduzidos sistemas miniaturizados e outras automatizações à rotina laboratorial, que auxiliam reduzindo o tempo de processamento e manejo da amostra clínica. Entretanto, algumas dessas análises ainda são imprecisas e demoram cerca de 18 horas ou mais, em casos de microrganismos fastidiosos, para o completo processamento. Em se tratando do manejo do paciente com infecção bacteriana, duas etapas são de fundamental importância: a primeira, é a identificação do microrganismo patogênico; a segunda, é encontrar uma opção terapêutica adequada, trabalhando inicialmente com o tratamento empírico e, após a identificação, o tratamento específico (HARTBARTH et al., 2003; ANNANE, BELLISSANT & CAVAILLON, 2005).

Desse modo, surge a necessidade novas abordagens e metodologias de identificação. O uso da Espectrometria de Massa de Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz – tempo de voo (MALDI-TOF MS) para a análise dos perfis das macromoléculas das bactérias tem sido uma ferramenta importante. O método utiliza as bases da proteômica, que consiste na caracterização do conjunto de proteínas expressas em uma célula ou tecido, a partir do genoma, para identificar os microrganismos em nível de espécie, por meio da comparação de moléculas depositadas em bancos de dados, alimentado de forma continuada.

3.4.2.1. Princípio do método

Essa metodologia se baseia na análise do padrão de espectros de massa de proteínas de 20 a 20.000 Da das células microbianas (MURRAY, 2012). O princípio da técnica é a quebra e ionização de proteínas, as quais são detectadas por sua relação massa/carga. O resultado do espectro gerado é comparado a uma banco de dados que, dependendo do aparelho, pode apresentar 5000 espécies bacterianas de origem clínica e ambiental. A comparação das amostras é realizada por um algoritmo próprio, a partir da calibração do equipamento com um padrão composto por proteínas liofilizadas de *Escherichia coli* (BENAGLI et al., 2011; CARBONNELLE et al., 2011).

Os equipamentos de espectrometria de massas apresentam variados analisadores que separam os íons de diferentes pesos/massas. Entre os analisadores/separadores de íons, há aqueles que diferenciam os pesos/massas pelo tempo de voo destas moléculas em tubo de vácuo. A matriz absorve a energia do laser, ocorrendo assim a evaporação da amostra com a formação de íons com massas diferentes. Estes íons apresentam carga +1 e são acelerados sob a influência do campo elétrico de carga positiva para dentro de um tubo de voo, que possui um detector na extremidade. O tempo de voo de cada partícula até o detector é utilizado para calcular sua massa. O espectro de massa da amostra é formado pela soma dos íons analisados. A relação massa/carga corresponde ao eixo das abscissas. Já a intensidade do sinal encontra-se no eixo das ordenadas, que é proporcional à quantidade de íons de mesma massa (CARBONNELLE, 2011).

Após a detecção, uma representação espectral desses íons é gerada e analisada por um *software*, gerando um perfil de espectrometria. Este perfil é então comparado com um Banco de Dados de Espectros de Referência e combinado a espectros idênticos ou ao espectro mais relacionado contido na base de dados, resultando na identificação do

microrganismo contido na amostra (CLARK et al.; 2013; DINGLE & BUTLER-WU; 2013). O *software* que compara o espectro gera um valor numérico (valor de pontuação) com base nas semelhanças entre os dados, e este valor fornece informações sobre a validade da identificação. Um valor de pontuação entre 2,0 e 3,0 é geralmente considerado uma identificação válida em nível de espécie. Valores entre 1,7 e 1,99 representam nível de gênero confiável e abaixo de 1,69 não é considerado um valor confiável.

Dentre os sistemas mais utilizados atualmente estão o MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), o Andromas (Andromas, Paris, França) e o Saramis (AnagnosTec, Potsdam, Alemanha), que foi incorporado ao sistema VITEK MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) (LING et al.; 2014).

3.4.2.2. Aplicações na identificação microbiana e vantagens

A metodologia de MALDI-TOF MS tem sido usada com sucesso na identificação taxonômica de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e vírus (GIEBEL et al., 2010). Por ser um método de alta sensibilidade e de alto rendimento (uma amostra pode ser analisada em poucos minutos), favorece suas aplicações em múltiplas áreas, incluindo diagnósticos médicos, biodefesa, monitoramento ambiental e controle de qualidade de alimentos. A técnica é adequada para alta produtividade e rápida identificação microbiana a baixo custo, sendo uma alternativa para os sistemas laboratoriais de identificação bioquímica e molecular convencionais, atendendo à necessidade de diagnósticos rápidos e precisos para diversas doenças (CROXATTO, PROD'HOM & GREUB, 2012; GOULART & RESENDE, 2013).

O primeiro relatório propondo identificação bacteriana por análise de MALDI TOF - MS foi por Holland e colaboradores em 1996, e os estudos iniciais permitiam a identificação de poucas bactérias devido à limitação dos bancos de dados. Ao descrever o uso de MALDI-TOF para a identificação bacteriana na rotina clínica, Seng e colaboradores (2009) conseguiram mais de 95% de identificação correta. Foram encontradas dificuldades na análise com estreptococos, entre os quais *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus mitis*, que apresentaram espectros próximos e têm a identificação dificultada.

Nesse estudo foi relatado que o tempo médio para a liberação do resultado ao médico acontece em menos de 10 minutos e, com relação aos custos, o sistema se

mostra de 3 a 5 vezes mais barato, quando comparado aos convencionais, após a aquisição do equipamento.

No ano de 2009, foi relatado pela primeira vez o uso do MALDI-TOF MS na identificação de bactérias diretamente a partir dos frascos de hemocultura positivos, e os resultados foram obtidos em menos de duas horas após a positividade dos frascos (LA SCOLA & RAOULT; 2009). Demais autores também têm mostrado o desenvolvimento de protocolos para identificação microbiana a partir de amostras de urina. Neste sentido, os trabalhos têm apontado que mais de 70% das amostras processadas apresentam identificação adequada (ÍÑIGO et al., 2016).

Tais dados mostram-se promissores para aplicação desta metodologia na rotina dos laboratórios de microbiologia clínica, uma vez que para o diagnóstico de infecções que debilitam o paciente rapidamente, a escolha da terapia antimicrobiana e a rápida identificação do organismo é crucial para o sucesso do tratamento e melhora do paciente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS DO ESTUDO

As amostras fecais utilizadas neste estudo foram cedidas pela Professora Dra. Gabrielle de Souza Rocha, do Departamento de Nutrição e Dietética, Faculdade de Nutrição da Universidade Federal Fluminense (UFF), uma vez que fez parte de um estudo prévio realizado em parceria com o Departamento de Nutrição.

O estudo anterior envolveu a avaliação dos efeitos do chocolate amargo com 70% de cacau sobre o perfil inflamatório, bioquímico e composição corporal de pacientes com insuficiência cardíaca. Para isso, os pacientes atendidos na Clínica de Insuficiência Cardíaca Coração Valente do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP), UFF foram submetidos a uma dieta que incluía a ingestão de cacau a 70%.

As amostras fecais são provenientes desses pacientes e foram mantidas sob congelamento a -20 °C, no Laboratório de Enteropatógenos, Microbiologia Veterinária e Alimentos (LEMA), do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto Biomédico da UFF.

4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense, e foi considerado aprovado sob número do CAAE: 50317415.7.0000.5243. Os pacientes foram recrutados da Clínica de insuficiência Cardíaca Coração Valente e concordaram em participar da pesquisa, para isso foi assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), documento no qual o paciente autoriza a utilização de seus dados e materiais clínicos. Dessa forma, foram selecionados através dos critérios de inclusão e exclusão descritos a seguir.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- a) Adultos e idosos;
- b) Índice de massa corporal (IMC) acima de 18,5 Kg/m² para ambos os sexos;
- c) ICC, Insuficiência cardíaca congestiva, em estágio 1, 2 e 3 segundo os critérios de classificação e diagnóstico do New York Heart Association (NYHA, 1994);

4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Pacientes em uso de suplemento dietético que tenha em sua formulação nutrientes antioxidantes e chocolate, com taxa de filtração glomerular ≤ 60 mL/min, fumantes ou ex-fumantes, doença hepática e/ou pancreática, angina pectoris instável, alergia a chocolate ou seus derivados, em estágio 4 de IC, exame físico com presença de anasarca, presença de doença infecciosa, auto-imune ou em uso de imunossupressor, presença de caquexia cardíaca ou hipoalbuminemia.

4.5 ISOLAMENTO

Para a realização do isolamento bacteriano, 1g de cada amostra fecal foi diluída em 9 mL de solução salina estéril para a realização de diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-10} . Após essa etapa, alíquotas de 0,1 mL foram semeadas pela técnica de espalhamento nas placas contendo meio seletivo para *Enterococcus*, Ágar Bile Esculina Azida (Scharlau, Madrid, Espanha), com auxílio da alça de Drigalski descartável, em duplicata. Em seguida foram incubadas a 37° C por 48 horas.

Foram recebidas 28 amostras fecais, provenientes de 14 pacientes cardiopatas. Estas foram armazenadas em freezer a -20°C no Laboratório de Enteropatógenos, Microbiologia Veterinária e Alimentos (LEMA), do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto Biomédico da UFF, para realização das análises microbiológicas e testes moleculares propostos. Para a denominação dessas amostras, foram empregadas as siglas PrI (pré intervenção - antes de serem submetidos à dieta) e PoI (pós intervenção – após serem submetidos à dieta) seguida do número do paciente (1 a 14) e do fator de diluição testado (10^{-1} a 10^{-10}).

4.6 MANUTENÇÃO

A partir do crescimento no Ágar Bile Esculina Azida, foram selecionadas unidades formadoras de colônias (UFC) com as características presuntivas de identificação de *Enterococcus* sp., e estas foram transferidas para o TSA. Utilizou-se a semeadura em estrias, de modo a obter intensa massa de microrganismos e em seguida as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Posteriormente a esta etapa, as culturas puras foram armazenadas em refrigerador com temperatura entre 2-8°C. Esta fase de refrigeração, anterior ao congelamento das culturas, impediu que ocorressem diferenças drásticas de temperatura evitando o choque térmico (SAEKI,

PONTES & PONTES,2015). Posteriormente a essa etapa amostras foram congeladas a -20 °C.

4.7 CONGELAMENTO

O congelamento a -20 °C em meio composto por leite desnatado e glicerol é um método de conservação de médio prazo, e, foi escolhido para trabalho, pois se apresenta como um dos métodos de manutenção mais simples e baratos, além de oferecer boa segurança para o armazenamento de diversos microrganismos por períodos de três meses a dois anos, devido a uma redução significativa no metabolismo celular (COSTA & FERREIRA, 1991).

O glicerol funciona como um bom crio-protetor (SPENCER & SPENCER, 1996) e é bioquimicamente compatível com as estruturas celulares; desta forma, as células podem ser preservadas e ter suas funções recuperadas quando descongeladas (ABREU & TUTUNJI, 2003). O leite desnatado também atua na proteção ao congelamento devido à ação dos diferentes componentes do leite na estrutura da célula (LEANDRO et al., 2013) e além disso, o cálcio contribui para a estabilidade das enzimas celulares (CODY et al., 2008).

Antes do congelamento foi preparada a solução estoque contendo leite em pó desnatado a 10%, esterilizado em autoclave por 8 a 10 minutos a 114 °C, adicionado de glicerol estéril, com a concentração final de 10%. O congelamento das UFCs foi realizado em microtubos de 1,5 mL devidamente identificados e armazenados em freezer a -20 °C.

4.8 DESCONGELAMENTO

Os microtubos foram retirados do freezer a -20 °C e mantidos em gelo para a manutenção da temperatura e impedir o total descongelamento da amostra. Com o auxílio da alça bacteriológica foi retirado um inóculo e este foi transferido para o caldo triptona de soja (TSB) para que as culturas fossem reativadas. Depois desse passo, as culturas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Para obtenção de massa celular, o caldo contendo as culturas puras foi semeado em placas de ágar triptona de soja (TSA) e incubados em estufa a 37 °C por aproximadamente 24 horas.

4.9 AMOSTRAS ANALISADAS NO ESTUDO

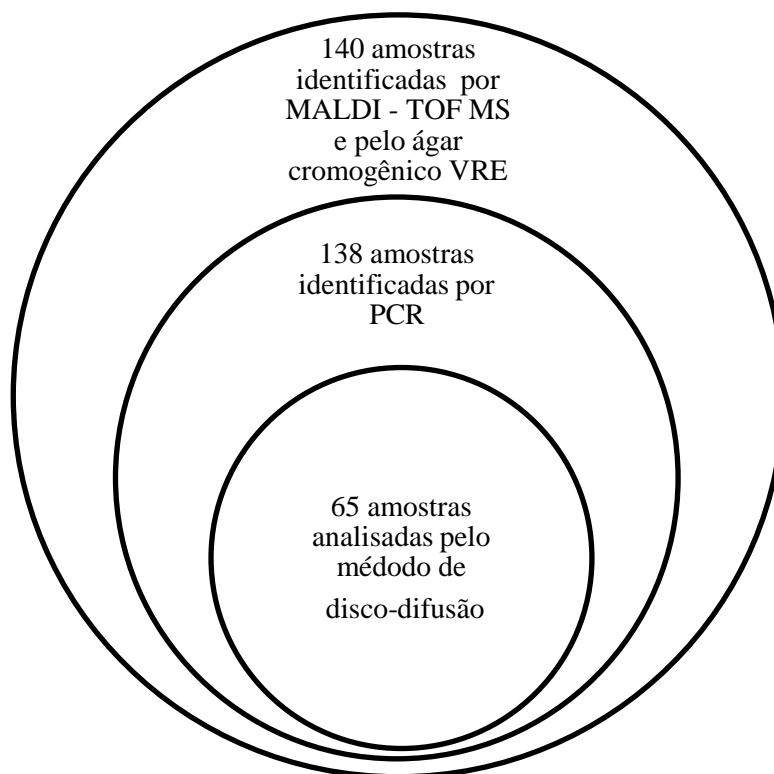


Figura 1 - Número de amostras analisadas em cada uma das metodologias

4.10 IDENTIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

4.10.1 Identificação genotípica por PCR

As cepas isoladas foram identificadas por meio das técnicas de PCR e PCR-Multiplex, com o uso de iniciadores específicos para gênero e espécie. A identificação foi realizada pela amplificação dos fragmentos correspondentes aos genes que identificam o gênero *Enterococcus* e as principais espécies envolvidas em infecções em humanos, *E. faecalis* e *E. faecium*.

4.10.2 Obtenção de DNA

O DNA bacteriano foi obtido segundo o protocolo descrito por Pai, Gertz e Beall (2006), com modificações. As amostras mantidas em congelamento no leite desnatado e glicerol foram reativadas em TSB e incubadas a 37 °C por aproximadamente 24 horas. Após esse período, as amostras foram semeadas em TSA e mantidas em incubação a 37 °C por 24 horas; e em seguida, as UFC foram suspensas em 300 µL de

tampão de extração (TE - 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), com turvação equivalente à escala 1 de MacFarland. O DNA foi obtido por meio da lise térmica, mantido em banho-maria a 100 °C durante 10-15 min, com posterior centrifugação por 1 min a 3.000 rpm, e congelamento a -20 °C até o uso.

Imediatamente antes do uso, as amostras de DNA foram descongeladas, a temperatura ambiente, e seu DNA foi quantificado em aparelho NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, U.S.A).

4.10.3 PCR

Os iniciadores utilizados estão descritos na tabela 1. As reações da polimerase em cadeia foram realizadas com diferentes misturas, afim de se realizar a identificação molecular dos isolados, tanto por PCR convencional, quanto por PCR Multiplex, como segue.

Tabela 1 - Iniciadores empregados para a identificação do gênero e das principais espécies

Denominação da Sequência	Sequência (5' → 3')	Gene	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
DD13 DD3-2	5'-CACCTGAAGAAACAGGC-3' 5'-ATGGCTACTTCAATTTACAG-3'	<i>ddl</i> (<i>E. faecalis</i>)	475	Depardieu, Perochon & Couvalin (2004)
FM1 FM2	5'-GAAAAACAATAGAAGAATTAT-3' 5'-TGCTTTTTTGAATTCTTCTTTA-3'	<i>sod A</i> (<i>E. faecium</i>)	215	Jackson, Fedorka-Cray & Barrett (2004)
ENT1 ENT2	5'-TACTGACAAACCATTCATGATG-3' 5'-AACTTCGTCACCAACGCGAAC-3'	<i>Tuf</i> (<i>Enterococcus</i>)	112	Ke et al. (1999)

Para as reações de PCR convencional, utilizamos os iniciadores descritos na Tabela 1 conforme a espécie previamente identificada. Assim, para as reações de identificação de *E. faecalis*, a mistura continha: 0,2 µM de iniciadores DD3 1-2; 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 µL de tampão da enzima 10X, 0,5 U de *Taq* DNA Polimerase, em um volume final de 25 µL. E, para a identificação de *Enterococcus faecium* foram utilizados: 0,8 µM dos iniciadores FM 1-2; 0,2 mM de

cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 µL de tampão da enzima 10X, 0,5 U de *Taq* DNA Polimerase.

Para as reações de PCR-Multiplex, foram utilizados: 2,5 mL de tampão da enzima 10X, 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM dos iniciadores Ent 1-2, 0,4 µM dos iniciadores DD3 1-2, 0,8 µM de FM 1-2, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase, com um volume final de 25 µL.

O volume de DNA nas PCRs variou conforme a concentração de cada extrato, sendo aplicado 40-60 ng de DNA por tubo de reação, sendo cada mistura ajustada com água deionizada estéril para um volume final de 25 µL.

Os reagentes utilizados foram todos obtidos pelo mesmo fabricante (Ludwig Biotecnologia, Alvorada, RS). Foi adicionada a cada mistura de reação uma alíquota de 40 a 60 µg de DNA referente às amostras analisadas. As reações de amplificação foram realizadas nos termocicladores Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Marsiling Estate Road 3, Cingapura) e Escohealthcare Swift MaxPro (ESCO), com os seguintes parâmetros: 95 °C por 5 min para etapa inicial, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 1 min para desnaturação, 55 °C por 1 min para anelamento, 72 °C por 1 min para extensão, seguidos de 72 °C por 10 min para extensão final. Como controle das reações foram utilizadas cepas E1, 18E (*E. faecium*) e E2, 19E (*E. faecalis*), cedidas pelo Professor Doutor Felipe Piedade Gonçalves Neves (Laboratório Cocos Gram Positivos), MIP/CMB da Universidade Federal Fluminense.

4.10.4 Eletroforese

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE (Tris, ácido bórico e EDTA) 0,5X, por aproximadamente 40 minutos a 80 V. Foi utilizado padrão de tamanho molecular de 100 pb (DNA ladder; Ludwig Biotecnologia, Alvorada, RS) para auxiliar na identificação do tamanho dos fragmentos amplificados. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) durante 15 min, descorado em água destilada por 2 minutos, visualizado com o auxílio do transiluminador com emissão de luz ultravioleta e fotografado em sistema de fotodocumentação L-PIX (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP).

4.11 IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DE IONIZAÇÃO POR DESSORÇÃO A LASER ASSISTIDA POR MATRIZ – TEMPO DE VÔO (MALDI-TOF MS)

A identificação pela técnica de MALDI-TOF MS foi realizada no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) com o aparelho Microflex, Bruker Daltonics possibilitou a confirmação dos resultados obtidos pela PCR e ainda o esclarecimento de outros que foram inconclusivos. As amostras foram cultivadas em caldo TSB por 24 horas a 37 °C e posteriormente repicadas em TSA e incubadas a 37 °C por 24 horas. Na preparação para análise foi escolhida uma colônia bacteriana isolada e esta foi depositada e uma placa de aço alvo, própria do aparelho. Para cada cepa, foi adicionado de 1µL de Matrix HCCA-portioned (chamado de “IVD HCCA”; HCCA = ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) permite a preparação fácil e conveniente da solução matriz para medição de peptídeos e proteínas por MALDI-TOF MS e, em seguida 1µL de etanol a fim de se realizar a extração de proteínas. (CLARK et al., 2013). Após secagem ao ar, a placa foi introduzida no aparelho que realizou a leitura, de acordo com as especificações do fabricante.

4.12 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS ATRAVÉS DO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO

4.12.1 Técnica de difusão em ágar

Segundo o protocolo adotado pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018), os seguintes discos contendo os antibióticos foram testados: ampicilina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), eritromicina (15 µg), linezolida (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), penicilina (10 U), tetraciclina (30 µg), vancomicina (30µg). Ainda foi testada a resistência a altos níveis de aminoglicosídeos, com os discos de gentamicina (120 µg) e estreptomicina (300 µg). Os antimicrobianos utilizados foram fornecidos pelo fabricante Sensifar e Multifar-Cefar[®], São Paulo, SP.

Anteriormente à realização do teste, as amostras foram semeadas em TSB e incubadas a 37 °C por aproximadamente 24 horas. Em seguida, foram semeadas em TSA e incubadas a 37 °C por aproximadamente 24 horas. Foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina 0,9% correspondentes a 0,5 de turvação na escala de McFarland. A semeadura por espalhamento foi realizada com auxílio de *swabs* estéreis na superfície das placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo ágar Mueller-Hinton (Kasvi, São José dos Pinhais, PR). Os discos de antimicrobianos

foram depositados na placa e, posteriormente, foram incubadas a 37°C por 16 a 24 horas, conforme indicações do CLSI. Os halos de inibição do crescimento foram medidos em milímetros e o resultado está relacionado com a susceptibilidade do isolado e com a taxa de difusão do fármaco através do meio ágar. Os diâmetros de zona de cada droga foram interpretados usando os critérios publicados pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2018).

4.12.2 ÁGAR CROMOGÊNICO VRE

Foi utilizado o Ágar Cromogênico VRE (Probac do Brasil) e as amostras foram previamente inoculadas em TSB. Após o crescimento, foram transferidos 10µL de cada amostra para as placas, como *spots*, e estas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. As cepas VRE 18E e 19E foram cedidas pelo Dr. Felipe Piedade (MIP, CMB/UFF) e usadas como controle e validação da semeadura em ágar cromogênico.

5 RESULTADOS

5.1 IDENTIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES POR PCR

Foram submetidas a PCR convencional e multiplex 132 das 140 cepas bacterianas incluídas neste estudo, a fim de se identificar as principais espécies enterocócicas envolvidas. Dessas, 15,9% (21/132) foram identificadas como *E. faecium*, 20,5% (27/132) como *E. faecalis* e 63,6% (84/132) não foram identificadas por PCR.

A Figura 2 traz a representação de uma eletroforese em gel de agarose ilustrando os tamanhos dos fragmentos utilizados para a identificação por PCR do gênero e das espécies enterocócicas.

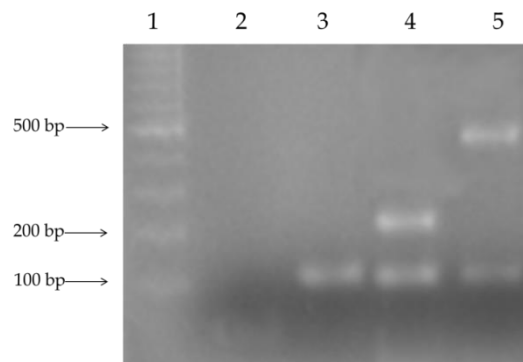


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose representando os fragmentos relacionados a PCR multiplex para a identificação de *Enterococcus* sp. onde: 1. Padrão de peso molecular; 2. controle negativo; 3. Fragmento de PCR com tamanho molecular referente a *Enterococcus* sp.; 4. Fragmento de PCR com tamanho molecular referente a *Enterococcus faecium*; 5. Fragmento de PCR com tamanho molecular referente a *Enterococcus faecalis*.

5.2 IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DE IONIZAÇÃO POR DESSORÇÃO A LASER ASSISTIDA POR MATRIZ – TEMPO DE VÔO (MALDI-TOF MS)

Todas as 140 amostras tiveram sua identificação avaliada pelo método de MALDI-TOF MS (Bruker, Daltonics). De acordo com o software do aparelho, o *score* maior ou igual a 2,0, é um valor considerado confiável para identificação em nível de gênero e espécie. *Scores* entre 1,7 a 1,9 são considerados confiáveis em nível de gênero e os menores que 1,6 não são considerados confiáveis para a identificação. Dentre eles, 45% (63/140) foram identificados como *Enterococcus faecalis*, 34,3% (48/140) como *Enterococcus faecium*, 6,4% (9/140) como *Enterococcus hirae*, 4,3% (6/140) como *Enterococcus durans*, 0,7% (1/140) como *Enterococcus casseliflavus* e

13 cepas não obtiveram identificação adequada. A Figura 3 mostra um gráfico que representa a identificação das espécies encontradas pelo MALDI-TOF MS.

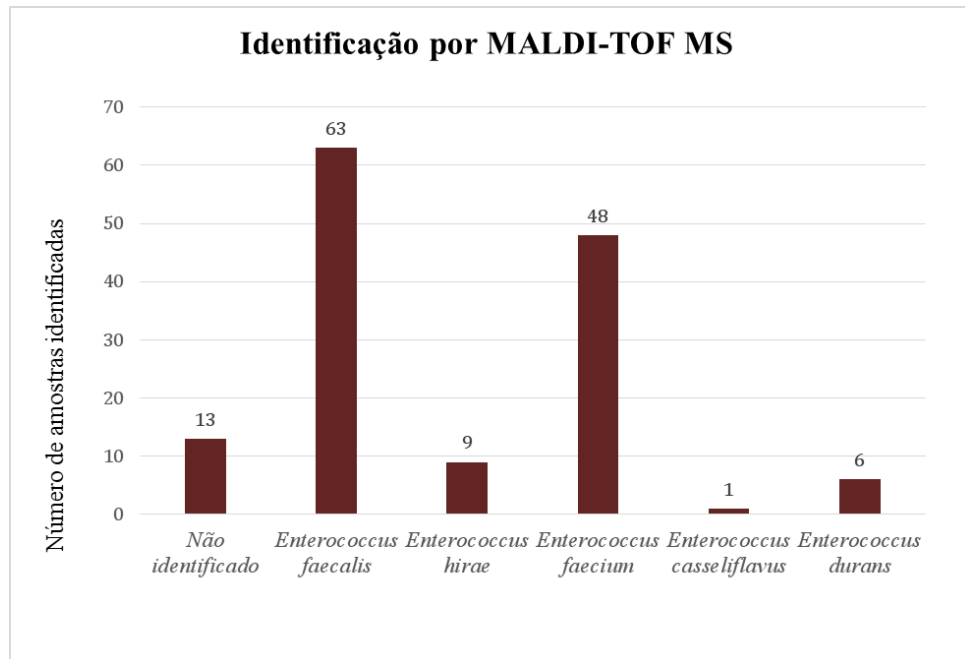


Figura 3 - Identificação por MALDI-TOF dos microrganismos isolados de amostras de fezes de pacientes cardiopatas atendidos pela Clínica Coração Valente em Niterói, Rio de Janeiro.

5.3 COMPARAÇÃO DAS METODOLOGIAS PARA IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DE *ENTEROCOCCUS FAECIUM* E *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

A comparação foi realizada apenas entre as amostras que foram devidamente identificadas em ambas as metodologias. Ao compararmos PCR e MALDI-TOF MS, verificamos uma divergência de 8,3% (4/48) entre os resultados apresentados. Desta maneira, 91,7% (44/48) das cepas analisadas apresentaram concordância entre as identificações.

A tabela 2 mostrada a seguir traz a comparação entre as metodologias utilizadas.

Tabela 2 – Resultados obtidos pelas metodologias de PCR e MALDI-TOF MS para identificação das amostras

Paciente	Amostra	MALDI-TOF MS	SCORE	PCR
Paciente 1	PrI 1.1	Não identificado	1.52	Não identificado
	PrI 1.2	Não identificado	1.29	Não avaliado
	PrI 1.4	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.31	Não identificado
	PrI 1.5	Não identificado	1.64	Não identificado
	PrI 1.8	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.03	Não identificado
	PoI 1.0	<i>Enterococcus faecium</i>	2.49	Não avaliado
	PoI 1.4	<i>Enterococcus faecium</i>	2.42	Não identificado
	PoI 1.6	Não identificado	≤ 0	Não identificado
	PoI 1.7	<i>Enterococcus hirae</i>	2.40	Não avaliado
	PoI 1.8	Não identificado	1.46	Não identificado
	PoI 1.9	Não identificado	≤ 0	Não identificado
Paciente 2	PrI 2.1	<i>Enterococcus faecium</i>	2.25	Não identificado
	PrI 2.2	<i>Enterococcus faecium</i>	2.24	<i>Enterococcus faecium</i>
	PrI 2.3	Não identificado	≤ 0	Não identificado
	PrI 2.4	<i>Enterococcus faecium</i>	2.49	<i>Enterococcus faecium</i>
	PrI 2.5	<i>Enterococcus hirae</i>	2.38	<i>Enterococcus faecium</i>
	PrI 2.7	<i>Enterococcus faecium</i>	2.28	Não identificado
	PoI 2.0	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.31	Não identificado
	PoI 2.1	<i>Enterococcus durans</i>	1.91	<i>Enterococcus faecium</i>
	PoI 2.2	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.32	Não identificado
	PoI 2.3	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.41	Não identificado
	PoI 2.4	<i>Enterococcus faecium</i>	2.54	<i>Enterococcus faecium</i>
PoI 2.5	<i>Enterococcus faecium</i>	2.52	Não identificado	
Paciente 3	PrI 3.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.27	Não identificado
	PrI 3.3	<i>Enterococcus faecium</i>	2.27	Não identificado
	PrI 3.5	<i>Enterococcus faecium</i>	2.48	Não identificado
	PrI 3.6	<i>Enterococcus faecium</i>	2.33	<i>Enterococcus faecium</i>
	PrI 3.9	<i>Enterococcus faecalis</i>	1.95	Não identificado
	PoI 3.2	<i>Enterococcus faecium</i>	2.52	Não identificado
	PoI 3.3	<i>Enterococcus faecium</i>	2.24	Não identificado
	PoI 3.4	<i>Enterococcus faecium</i>	2.34	Não identificado
	PoI 3.5	<i>Enterococcus faecium</i>	2.26	Não identificado
	PoI 3.6	<i>Enterococcus faecium</i>	2.20	<i>Enterococcus faecium</i>
	PoI 3.7	<i>Enterococcus faecium</i>	2.30	Não identificado
PoI 3.9	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.07	Não identificado	
Paciente 4	PrI 4.1	<i>Enterococcus faecium</i>	2.25	<i>Enterococcus faecium</i>
	PrI 4.2	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.32	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PrI 4.3	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.39	Não identificado
	PrI 4.5	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.16	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PrI 4.6	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.43	Não identificado
	PrI 4.7	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.37	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PrI 4.8	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.42	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PrI 4.9	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.28	Não identificado
	PoI 4.0	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.25	Não identificado
	PoI 4.2	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.21	Não identificado
	PoI 4.3	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.37	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PoI 4.4	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.35	Não identificado
	PoI 4.5	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.42	Não identificado
	PoI 4.6	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.09	<i>Enterococcus faecalis</i>
PoI 4.8	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.13	<i>Enterococcus faecalis</i>	
PrI 4.10	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.43	Não identificado	

Paciente	Amostra	MALDI-TOF MS	SCORE	PCR
Paciente 6	PrI 6.0	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.38	Não identificado
	PrI 6.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.38	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PrI 6.2	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.45	Não identificado
	PrI 6.3	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.26	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PrI 6.4	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.33	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PrI 6.5	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.38	Não identificado
	PrI 6.6	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.28	Não identificado
	PrI 6.7	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.30	Não identificado
	PoI 6.0	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.34	Não identificado
	PoI 6.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.42	Não identificado
	PoI 6.2	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.45	Não identificado
	PoI 6.3	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.45	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PoI 6.4	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.37	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PoI 6.5	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.42	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PoI 6.7	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.44	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PoI 6.8	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.41	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PoI 6.6	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.26	Não identificado
	PoI 6.9	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.25	<i>Enterococcus faecalis</i>
Paciente 7	PrI 7.1	<i>Enterococcus faecium</i>	2.39	<i>Enterococcus faecium</i>
	PrI 7.2	<i>Enterococcus faecium</i>	2.49	Não identificado
	PrI 7.3	<i>Enterococcus faecium</i>	2.28	<i>Enterococcus faecium</i>
	PrI 7.4	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.29	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PrI 7.5	<i>Enterococcus faecium</i>	2.22	<i>Enterococcus faecium</i>
	PoI 7.1	<i>Enterococcus faecium</i>	2.47	Não identificado
	PoI 7.3	<i>Enterococcus faecium</i>	2.35	<i>Enterococcus faecium</i>
	PoI 7.5	<i>Enterococcus faecium</i>	2.34	Não identificado
	PoI 7.4	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1.89	Não identificado
Paciente 8	PrI 8.1	<i>Enterococcus faecium</i>	2.47	<i>Enterococcus faecium</i>
	PrI 8.2	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.45	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PrI 8.3	<i>Enterococcus faecium</i>	2.24	Não identificado
	PrI 8.4	<i>Enterococcus faecium</i>	2.35	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PoI 8.1	<i>Enterococcus faecium</i>	2.36	Não identificado
	PoI 8.2	<i>Enterococcus faecium</i>	2.45	Não identificado
	PoI 8.3	<i>Enterococcus faecium</i>	2.45	Não identificado
	PoI 8.4	<i>Enterococcus faecium</i>	2.48	Não identificado
	PoI 8.6	Não identificado	≤ 0	<i>Enterococcus faecium</i>
Paciente 9	PrI 9.1	<i>Enterococcus hirae</i>	2.33	Não identificado
	PrI 9.2	<i>Enterococcus faecium</i>	2.27	Não identificado
	PrI 9.3	<i>Enterococcus faecium</i>	2.09	Não identificado
	PrI 9.4	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.29	Não identificado
	PrI 9.5	<i>Enterococcus hirae</i>	2.23	Não identificado
	PoI 9.1	<i>Enterococcus hirae</i>	2.34	Não identificado
	PoI 9.2	<i>Enterococcus hirae</i>	2.36	Não identificado
	PoI 9.3	<i>Enterococcus hirae</i>	2.34	Não identificado
	PoI 9.4	<i>Enterococcus faecium</i>	2.34	<i>Enterococcus faecium</i>
	PoI 9.5	<i>Enterococcus faecium</i>	2.40	Não identificado
Paciente 10	PrI 10.1	<i>Enterococcus hirae</i>	2.34	Não identificado
	PrI 10.2	Não identificado	≤ 0	Não avaliado
	PrI 10.4	<i>Enterococcus faecium</i>	2.48	Não avaliado
	PrI 10.5	<i>Enterococcus durans</i>	2.33	Não identificado
	PrI 10.3	<i>Enterococcus hirae</i>	2.39	Não identificado
	PoI 10.1	<i>Enterococcus durans</i>	2.16	Não avaliado
	PoI 10.2	<i>Enterococcus durans</i>	2.09	Não avaliado

	Amostra	MALDI-TOF MS	SCORE	PCR
	PoI 10.3	<i>Enterococcus faecium</i>	2.19	Não identificado
	PoI 10.4	<i>Enterococcus durans</i>	2.23	Não avaliado
	PoI 10.5	<i>Enterococcus durans</i>	2.12	Não identificado
Paciente 11	PrI 11.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.21	Não identificado
	PrI 11.2	Não identificado	≤ 0	Não identificado
	PrI 11.3	<i>Enterococcus faecium</i>	2.04	Não identificado
	PrI 11.4	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.02	Não identificado
	PrI 11.5	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.16	Não identificado
	PrI 11.6	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.03	Não identificado
	PrI 11.7	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.06	Não identificado
	PrI 11.8	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.20	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PrI 11.9	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.13	Não identificado
	PrI 11.10	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.30	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PoI 11.2	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.31	Não identificado
	PoI 11.3	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.38	Não identificado
	PoI 11.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.22	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PoI 11.4	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.27	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PoI 11.5	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.01	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PoI 11.6	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.05	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PoI 11.10	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.31	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PoI 11.8	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.16	Não identificado
Paciente 14	PrI 14.1	<i>Enterococcus durans</i>	2.25	<i>Enterococcus faecium</i>
	PrI 14.2	Não identificado	≤ 0	Não identificado
	PrI 14.3	<i>Enterococcus faecium</i>	2.49	<i>Enterococcus faecium</i>
	PrI 14.4	<i>Enterococcus faecium</i>	2.40	Não identificado
	PrI 14.6	<i>Enterococcus faecium</i>	2.41	<i>Enterococcus faecium</i>
	PrI 14.5	<i>Enterococcus faecium</i>	2.48	<i>Enterococcus faecium</i>
	PrI 14.7	<i>Enterococcus faecium</i>	2.40	<i>Enterococcus faecium</i>
	PrI 14.8	<i>Enterococcus faecalis</i>	1.77	Não identificado
	PrI 14.9	<i>Enterococcus faecium</i>	2.29	Não identificado
	PoI 14.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.23	<i>Enterococcus faecalis</i>
	PoI 14.3	<i>Enterococcus faecium</i>	2.31	Não identificado
	PoI 14.4	<i>Enterococcus faecium</i>	2.21	Não identificado
	PoI 14.6	Não identificado	≤ 0	Não identificado
	PoI 14.7	<i>Enterococcus faecium</i>	2.40	Não identificado
	PoI 14.10	<i>Enterococcus faecium</i>	2.22	<i>Enterococcus faecium</i>

5.4 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

5.4.1 Detecção da presença de VRE

Foi verificada a presença de amostras resistentes a vancomicina por meio da utilização do ágar cromogênico VRE. Das 140 amostras estudadas, a amostra PoI 11.2 se mostrou positiva para VRE e cresceu com coloração azul turquesa, indicativo da espécie *E. faecalis* (figura 4).

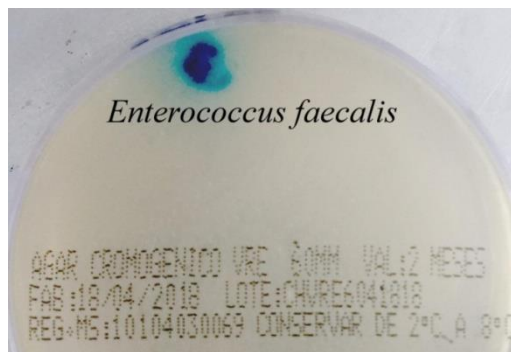


Figura 4 - Isolado VRE positivo no Ágar Cromogênico

5.4.2 Perfis de resistência a antimicrobianos

O teste de disco-difusão em ágar foi realizado em 65 das 140 amostras, previamente identificadas pela metodologia de MALDI-TOF MS. A seleção foi relativa à variabilidade de espécies encontrada em cada paciente, ou seja, ao menos uma amostra representativa de cada espécie, foi analisada. O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras testadas está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de 65 isolados de *Enterococcus* spp., provenientes de fezes de pacientes cardiopatas

Antimicrobiano	Categoria de Susceptibilidade (%)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	100	0	0
Ciprofloxacina	98,5	0	1,5
Eritromicina	46,2	29,2	24,6
Linezolida	98,5	1,5	0
Nitrofurantoína	100	0	0

Penicilina	97	0	3
Tetraciclina	64,7	9,2	26,1
Vancomicina	100	0	0
Gentamicina (120µg)	98,5	0	1,5
Estreptomicina (300µg)	88,9	0	11,1

Após a realização dos testes de disco-difusão, observamos que: 100% das 65 amostras se mostraram sensíveis a ampicilina, nitrofurantoína e vancomicina. Quanto à categoria intermediária, 29, 2% (19/65) das cepas testadas foram classificadas como intermediárias à ação da eritromicina, 1,5% (1/65) à da linezolida e 9,2% (6/65), à da tetraciclina. O padrão de resistência foi evidenciado em 1,5% (1/65) das cepas testadas com ciprofloxacina, 24,6% (16/65) com eritromicina, 3% (2/65) com penicilina, 26,1% (17/65) com tetraciclina, e 1,5% (1/65) com altos níveis de gentamicina. A resistência a elevados níveis de estreptomicina (HLSR - High-level Resistance Streptomycin) foi encontrada em 5 cepas das 45 amostras testadas, ou seja, 11,1% das amostras.

A Figura 5 mostra os diferentes perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos entre as cepas isoladas de pacientes cardiopatas, de acordo com os testes realizados pelo método de disco-difusão.

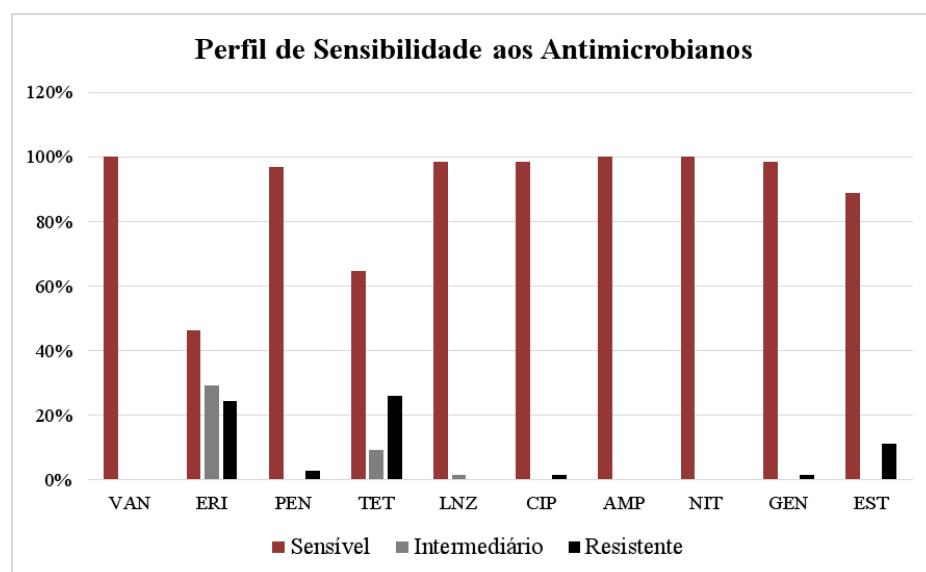


Figura 5 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos 65 isolados de *Enterococcus* spp. provenientes de fezes de pacientes cardiopatas, através da técnica de disco-difusão.

Outro importante parâmetro a ser analisado foram os perfis de resistência a, pelo menos, duas drogas, e os perfis de multirresistência (MDR – *Multi-drug Resistance*, quando as bactérias são resistentes a três ou mais antimicrobianos testados. Os perfis MDR foram exibidos por 4 (6,1%) das 65 amostras analisadas, e 10 (15,3%) foram resistentes ao menos a duas das drogas analisadas. Quanto ao padrão de resistência, foi observado que 13,8% (9/65) dos isolados apresentaram resistência a eritromicina e tetraciclina, 3% apresentaram resistência a eritromicina, tetraciclina e estreptomicina de altos níveis; 1,5% (1/65) das amostras apresentaram resistência a eritromicina e estreptomicina de altos níveis, 1,5% (1/65) a eritromicina, penicilina e tetraciclina e 1,5% (1/65) resistência a eritromicina, tetraciclina, gentamicina e estreptomicina de altos níveis. Esse resultado representa que seis, dos onze pacientes analisados neste estudo, são colonizados por cepas de enterococos multirresistentes.

Na tabela a seguir estão representadas as amostras que apresentaram resistência a pelo menos duas drogas e as que apresentaram multirresistência.

Tabela 4- Perfil de resistência dos 65 isolados.

Perfil de Resistência	Cepas bacterianas	Espécies	Origem (n)
ERI+TET	PoI 10.1	<i>E. durans</i> ,	Paciente 10
	PoI 10.3	<i>E. faecium</i> ,	Paciente 10
	PoI 10.5	<i>E. durans</i> ,	Paciente 10
	PoI 9.2	<i>E. hirae</i> ,	Paciente 9
	PrI 8.4,	<i>E. faecium</i> ,	Paciente 8
	PrI 6.0	<i>E. faecalis</i> ,	Paciente 6
	PoI 6.0	<i>E. faecalis</i> ,	Paciente 6
	PoI 6.4	<i>E. faecalis</i>	Paciente 6
	PoI 6.8	<i>E. faecalis</i>	Paciente 6
ERI+EST	PrI 9.2	<i>E. hirae</i>	Paciente 9
ERI+TET+EST	PrI 14.8	<i>E. faecalis</i> ,	Paciente 14
	PoI 8.3	<i>E. faecium</i>	Paciente 8
ERI+PEN+TET	PoI 6.9	<i>E. faecium</i>	Paciente 6
ERI+TET+GEN+EST	PrI 4.10	<i>E. faecium</i>	Paciente 4

ERI - eritromicina; EST - Estreptomicina; GEN - Gentamicina; PEN - Penicilina; TET, Tetraciclina.

6 DISCUSSÃO

O manejo do paciente suspeito de infecção bacteriana tradicionalmente segue duas linhas de ação: a primeira visa identificar o patógeno no local da infecção; a segunda busca encontrar a melhor opção terapêutica, utilizando um tratamento antibiótico empírico, sabendo que um tratamento antimicrobiano adaptado pode reduzir a morbidade e mortalidade (HARBARTH et al., 2003; ANNANE, BELLISSANT & CAVAILLON, 2005). Nos últimos 30 anos, aproximadamente, o sequenciamento do DNA ribossomal e de outros *housekeeping genes* permitiram a identificação mais eficiente de microrganismos; entretanto, envolve metodologias caras e complexas. Por outro lado, a identificação e caracterização de patógenos convencionais são baseadas nas propriedades bioquímicas dos microrganismos, ou seja, na sua capacidade utilizar diferentes substratos para crescimento e atividade metabólica, o que demanda muito tempo e, conseqüentemente, demora na perspectiva de tratamento específico. Assim, a identificação molecular realizada neste trabalho foi pautada na busca por uma metodologia com sensibilidade e especificidade, visando avaliar sua rapidez, eficácia e reprodutibilidade na identificação microbiana.

Inicialmente, a PCR-Multiplex foi aplicada para a avaliação das espécies enterocócicas; entretanto, as dificuldades de padronização e reprodutibilidade da metodologia impediram a identificação da maioria dos isolados. Desta forma, optamos por adotar a identificação molecular baseada em apenas um par de iniciadores, visando a identificação de apenas uma espécie por vez, a PCR uniplex. Foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase 94,2% (132/140) do total de isolados bacterianos deste estudo, visto que as dificuldades para se estabelecer um protocolo de realização para posterior padronização do método, com eficácia, rapidez e reprodutibilidade, foram um entrave, ainda que tenha sido realizada apenas com um par de iniciadores por reação.

Do total de amostras analisadas, 36,4% (48/132) foram identificadas corretamente por PCR, sendo identificadas como *Enterococcus faecalis* ou *Enterococcus faecium*. Sendo assim, 15,9% (21/132) foram identificados como *Enterococcus faecium* e 20,5% (27/132) como *Enterococcus faecalis*. O restante, 63,6% (84/132), não foi identificado adequadamente, dado as dificuldades na padronização da metodologia.

Na busca de soluções para os sucessivos problemas com a aplicação da técnica, foram realizadas diversas intervenções com o objetivo de otimização dos protocolos: 1) extração do DNA bacteriano em água ultrapura e em TE (Tampão Tris-EDTA); 2)

utilização de banho seco e banho-maria a 100 °C para a lise térmica e consequente liberação do material genético; 3) modificações no tempo de lise com alterações no intervalo de tempo - de 10 a 20 minutos; 4) quantificação da concentração do DNA; 4) alterações nos reagentes usados e em suas respectivas concentrações (MgCl₂, dNTP, iniciadores, *Taq* polimerase). Entretanto, apesar de todas as modificações, não foram encontradas mudanças tão significativas a ponto de melhorar a reprodutibilidade da técnica.

Os métodos bioquímicos tradicionais embora eficazes, ainda são lentos na identificação de enterococos em nível de espécies; desta maneira, é necessário novas metodologias que auxiliem neste processo. A identificação molecular veio para facilitar tais procedimentos, por ser um método bastante sensível; porém, esta ainda não é uma realidade nos laboratórios clínicos, dado a complexidade que envolvem, sendo então mais restrita aos laboratórios de pesquisa. Diversos trabalhos trazem boas performances da metodologia molecular, ZA Chabuck e colaboradores (2012) encontraram 71,4% de *Enterococcus faecalis* e 28,57 % para *E. faecium*, em seu estudo baseado na identificação dessas amostras. Furlaneto-Maia e colaboradores, em 2014, encontraram uma concordância de 90% na identificação de espécies enterocócicas clinicamente relevantes, ratificando o fato de a PCR se mostrar confiável e conveniente para identificação microbiológica.

Entretanto, neste estudo, pudemos perceber que, ao menos para as amostras com que trabalhamos, não conseguimos aplicar a técnica com a devida reprodutibilidade, visto que nossos resultados de amplificação foram obtidos com protocolos diferentes aplicados para as amostras. Ainda levando em consideração que realizamos as reações utilizando culturas puras, ressaltamos as dificuldades de se implementar esta técnica em diagnóstico clínico de infecções enterocócicas, uma vez que neste caso a técnica deveria ser aplicada diretamente na amostra clínica.

Nos últimos anos têm sido desenvolvidas novas metodologias de identificação como os painéis multiplex com testes automatizados, que vem com o intuito de facilitar a prática laboratorial, mas em razão do custo não são acessíveis a todos os laboratórios (PORITZ & LINGENFELTER, 2018). Nesse sentido, ressaltamos a importância da metodologia de MALDI- TOF MS para a identificação dos microrganismos patogênicos e da implementação desta técnica na prática laboratorial de rotina, que além de realizar a identificação já tem sido usada na detecção de resistência (KASSIM et al., 2017; HOLZKNECHT et al., 2018).

A identificação realizada pela Espectrometria de massas neste estudo revelou um predomínio das principais espécies encontradas na clínica, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* (ARIAS & MURRAY, 2008). Porém, a prevalência de *Enterococcus faecalis* foi relativamente maior (45%) quando comparado a *Enterococcus faecium* (34,3%). As demais espécies se apresentaram em menor prevalência, *Enterococcus hirae* (6,4%), *Enterococcus durans* (4,3%), *Enterococcus casseliflavus* (0,7%), e 9,2% das amostras analisadas não apresentaram identificação adequada pela metodologia.

Ao se comparar as duas metodologias de identificação, levando em consideração apenas a parcela que foi devidamente identificada pela PCR PCR e MALDI-TOF MS, houve uma divergência de 8,3% (4/48) entre os resultados apresentados. Desta maneira, até o momento, 91,7% (44/48) dos isolados analisados apresentaram concordância entre as identificações, sendo incluídas nesta comparação apenas aqueles que foram devidamente identificados pelas PCR's.

Quando comparado a PCR, a MALDI-TOF MS fornece maior qualidade de dados para a identificação em nível de espécie, uma vez que a base de dados do aparelho Biotyper Bruker 3.0 possui contínua alimentação em se tratando do gênero *Enterococcus* (CHRIST et al., 2017). Além disso, nossa análise molecular envolveu duas das principais espécies enterocócicas mais isoladas de infecções e, desta maneira, permitia a detecção de *E. faecium* ou *E. faecalis* de forma bastante eficaz. A classificação baseada no gênero e na espécie se assemelha muito aos resultados encontrados por Christ e colaboradores, em 2017, que também encontrou além de *E. faecalis* e *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans* e *E. casseliflavus*.

Neste trabalho, a metodologia de MALDI-TOF MS mostrou um desempenho de 90,7% de precisão na taxa de identificação ao nível das espécies. Bizzini e Greub (2010) encontraram desempenhos de 93,2% em nível da espécie e Seng e colaboradores (2009), uma concordância de 84%. Para Van Veen, Claas & Kuijper (2010), a abordagem experimental é semelhante ao trabalho de 2009 (SENG et al., 2009), onde 85,2% foram corretamente identificados na espécie e 96,7% em nível do gênero, demonstrando a efetividade desta técnica para estes microrganismos. Lo e colaboradores (2015) encontraram que 153 das 191 amostras (80,1%) produziram uma identificação exata ao nível da espécie, enquanto 174 das 191 amostras (91,1%) apresentaram uma identificação concordante no nível do gênero. Kassim e

colaboradores (2017) avaliaram que a identificação foi adequada para 97,6% para o gênero e 97,4% para o nível de espécie, considerando 383 amostras analisadas.

Outros trabalhos relataram ter dificuldades na identificação de outros gêneros bacterianos como estreptococos, bem como HACCEK (grupo de bactérias Gram negativas de crescimento lento), *Shigella* e bactérias aeróbias estritas (*Aeromonas* spp., *Achromobacter* spp., *Alcaligenes* spp.). Nos estudos de Blondiaux e colaboradores (2009), 264 (73%) das 362 cepas analisadas foram devidamente identificadas em nível da espécie.

Existem também autores que têm avaliado a identificação direta de bactérias de amostras clínicas, como sangue e urina. Em 2010, Ferreira e colaboradores avaliaram a identificação por MALDI-TOF de amostras de urina, e o equipamento avaliou corretamente 79,2% em nível de espécies e 80%, de gênero. Zboromyrska e colaboradores (2016) analisaram 140 amostras de urina, das quais 86.4% obtiveram identificação adequada em nível das espécies. Christner e colaboradores (2010) analisaram 277 hemoculturas positivas e obtiveram 94.2% e 95% para espécie e gênero, respectivamente.

O potencial discriminativo da MALDI-TOF MS superam os métodos tradicionais de identificação bacteriana ou de identificação com base nos genes que codificam o 16S rRNA. (BIZZINI & GREUB, 2010). Além de reduzir o tempo de análise laboratorial, internações e custos, o método tem sido cada vez mais utilizado em laboratórios clínicos. Os bancos de dados do sistema MALDI-TOF MS utilizam abordagens baseadas em reconhecimento de padrões na identificação de microrganismos. Na tentativa de melhorar as sensibilidades, já tem sido usado biomarcadores específicos ao invés de marcadores genéricos não conservados, garantindo melhores identificações (KASSIM et al., 2017).

A utilização do meio cromogênico para avaliar a presença de VRE possibilitou a identificação de uma das amostras estudadas como *Enterococcus faecalis* VRE positivo. Porém, ao realizar o teste de disco-difusão, esta amostra se mostrou sensível à vancomicina, não confirmando o padrão VRE esperado. Com relação à sensibilidade e especificidade, Soares e colaboradores (2017) avaliaram a da metodologia do ágar cromogênico para detecção de VRE com sensibilidade de 87,23% e 100% para a detecção de VRE de *E. faecalis* e VRE de *E. faecium*, respectivamente.

Com relação à análise do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, observamos que 100% das amostras foram sensíveis a ampicilina, nitrofurantoína e vancomicina.

Esse resultado pode estar relacionado ao fato de esses pacientes cardiopatas não serem colonizados por cepas reconhecidamente resistentes a vancomicina, o que pode contribuir para um bom prognóstico em casos de futuros procedimentos e intervenções médico-cirúrgicas, dado a susceptibilidade desse grupo.

O uso de antimicrobianos tem contribuído para o aumento da resistência aos patógenos bacterianos, uma vez que esses patógenos exibem uma grande e notável heterogeneidade nos mecanismos de resistência e virulência. Isso, somado ao uso irresponsável das drogas antibacterianas, contribui para a disseminação desses genes em larga escala (FRENCH, 2010). Deste modo, é possível observar o crescimento da resistência tanto no ambiente hospitalar, como na comunidade. Em relação a esse cenário, pode-se perceber que mesmo se tratando de amostras de origem comunitária, foi encontrado um número considerável de cepas com resistência intermediária a três, dos dez antimicrobianos testados: 29, 2% com resistência intermediária a eritromicina, 1,5% a linezolida e 9,2% da tetraciclina.

Também foram encontrados isolados resistentes a ciprofloxacina, penicilina, e gentamicina e estreptomicina de altos níveis, que embora se apresentem em baixa prevalência, representam um alerta em se tratando da co-morbidade desse grupo de pacientes. As maiores taxas de resistência foram encontradas para tetraciclina (26,1%) e para eritromicina (24,6%), apresentando certa concordância com os dados encontrados no estudo de Furlaneto-Maia e colaboradores (2014).

No presente trabalho também foi relatada a colonização por cepas resistentes a pelo menos duas das drogas testadas e outras que exibiam multirresistência, conhecidas classicamente como MDR. Cerca de 6,0 % das cepas analisadas foram classificadas como MDR e 15,3% das cepas foram resistentes ao menos a duas das drogas. Em nosso estudo, as duas drogas que apresentaram maior taxa de resistência foram tetraciclina e eritromicina, resultado semelhante ao encontrado por Meysam e colaboradores (2015). A colonização da microbiota intestinal por cepas MDR pode representar uma preocupação, uma vez que esses microrganismos podem se tornar patogênicos estabelecendo maiores riscos ao portador e até mesmo à saúde pública (MEYSAM et al., 2015).

No estudo realizado por Daniel e colaboradores (2015) foi relatado que a interação entre diferentes reservatórios contribui para a ampla disseminação dos enterococos MDR. Foram sugeridas algumas fontes de transmissão como a zoonótica, a transmissão a partir da contaminação do esgoto e a que acontece a partir do contato

com com esterco de suínos; além das fontes classicamente conhecidas como a disseminação dos genes de resistência a partir dos indivíduos colonizados por VRE ou enterococos MDR.

Um recente estudo realizado por Surette e Wright (2017) apontou que a problemática da resistência é uma questão de saúde única e, por isso, muito se tem discutido a respeito do termo “One Health”. Este princípio integra a saúde humana, animal, ambiental e políticas públicas, como forma de aproximar e integralizar tais áreas na busca de novas alternativas para os problemas advindos com o crescente avanço tecnológico, industrial e farmacêutico da era atual. Neste contexto, surgiu também um termo que tem ganhado reconhecido destaque desde a popularização do sufixo -oma empregado em diferentes áreas do conhecimento científico, termo este conhecido como resistoma. O resistoma compreende um conjunto de genes associados à resistência das bactérias aos antimicrobianos, presentes em um determinado ambiente.

Uma vez que *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* emergiram como patógenos nosocomiais resistentes a múltiplas drogas nas últimas décadas, e sendo esses microrganismos integrantes da microbiota intestinal, é bastante relevante a caracterização do resistoma da microbiota intestinal humana. Assim, será possível uma melhor compreensão dos mecanismos de transferência de genes de resistência, principalmente pelo fato de estes serem patógenos oportunistas. É sabido que microrganismos oportunistas podem causar uma série de infecções dos mais variados níveis de gravidade e, dado à complexidade, variabilidade e tamanho das populações bacterianas intestinais, tem-se uma oportuna possibilidade de transferência de genes, o que contribui extensamente para a emergência de bactérias intestinais multi resistentes (PERRY, WESTMAN & WRIGHT, 2014).

O gênero estudado está envolvido em muitas das infecções bacterianas graves em consequência da presença de vários genes associados à virulência e resistência antimicrobiana (PRIETO et al., 2016). Portanto, uma identificação precisa e a rápida análise do padrão de sensibilidade aos antimicrobianos do agente causador auxilia no tratamento direcionado e precoce, sendo determinante para a saúde do paciente.

Além disso, a detecção de bactérias resistentes ou não susceptíveis a diferentes classes de antimicrobianos, em indivíduos sem doença infecciosa, vem contribuir para conscientização da comunidade para a gravidade do problema da resistência nos dias atuais. Desta forma, torna-se possível tomar medidas de prevenção eficazes, como a

realização de uma lavagem de mãos eficiente, a mudança de atitude em relação ao uso mais consciente de antimicrobianos, ou mesmo o descarte adequado desses produtos como forma individual de mudanças, podendo levar a ganhos em nível de saúde pública.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho, abordamos uma atividade laboratorial de extrema importância para a prática clínica, uma vez que foram utilizadas técnicas e metodologias amplamente empregadas no diagnóstico laboratorial de infecções bacterianas. Nesta direção, podemos concluir que:

- As espécies de *Enterococcus* sp. provenientes de fezes de pacientes cardiopatas foram devidamente identificadas através da utilização de Espectrometria de Massa de Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz – tempo de voo (MALDI TOF); tendo menor correspondência nas metodologias envolvendo PCR
- Os métodos envolvendo PCR foram menos eficazes na identificação de *Enterococcus* sp. isolados de fezes de pacientes cardiopatas, levando a um maior gasto de tempo e custo financeiro, visto que um resultado pode ser falso-negativo, já que a ausência de amplificação em determinada amostra pode estar relacionada à necessidade de otimização da técnica
- A detecção da presença de VRE entre as amostras, a partir do ágar cromogênico, foi uma forma de triagem bastante empregada na clínica, e a amostra suspeita não foi confirmada a partir das metodologias empregadas neste estudo
- O método da disco-difusão permitiu uma ampla avaliação do perfil de susceptibilidade dos enterococos analisados, permitindo a detecção de um perfil de enterococos não-susceptíveis e, de maior importância, a presença de enterococos MDR

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU M.M.V. & TUTUNJI V.L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. *Universitas Ciênc. Saúde*. v.2 n.2, p.236-25, 2003.

ANNANE, D.; BELLISSANT, E. & CAVAILLON, J. Septic shock. *The Lancet*, v. 365, n. 9453, p.63-78, 2005.

ARIAS, C.A.; CONTRERAS, G.A.; MURRAY, B.e.. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clinical Microbiology And Infection*, v. 16, n. 6, p.555-562, 2010.

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

ARIAS, C.A.; MURRAY, B.E. Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. v. 5, n. 6, p. 637-55, 2008.

BEEKMANN, S. E. et al. Effects of Rapid Detection of Bloodstream Infections on Length of Hospitalization and Hospital Charges. *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 7, p.3119-3125, 2003.

BENAGLI, C. et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Clinically Relevant Bacteria. *Plos One*, v. 6, n. 1, p.164-170, 2011.

BEEZHOLD, D. W. et al. Skin Colonization with Vancomycin-Resistant Enterococci Among Hospitalized Patients with Bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, v. 24, n. 4, p.704-706, 1997.

BIZZINI, A. & GREUB, G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clinical Microbiology And Infection*, v. 16, n. 11, p.1614-1619, 2010.

BYAPPANAHALLI, M.N. et al. Enterococci in the Environment. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, v. 76, n. 4, p.685-706, 2012.

CARBONNELLE, E. et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry*, v. 44, n. p.104-109, 2011.

CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): Human Isolates Final Report, 2011. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2013.

CHRISTNER, M. et al. Rapid Identification of Bacteria from Positive Blood Culture Bottles by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight Mass Spectrometry Fingerprinting. *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 5, p.1584-1591, 2010.

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

CLSI - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. . 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

CODY W.L. et al. Skim mik enhances the preservation of thawed -80°C bacterial stocks. *J.Microbiol. Methods*. n75 v.1 p.135–138, 2008.

COSTA, C. P.& FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. *Revista de Microbiologia*, v.22, n. 3, p. 263-268, 1991.

CRANK, C. & O'DRISCOLL, T. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infection And Drug Resistance*, p.217-222, 2015.

CHRIST, A.P.G. et al. Characterization of Enterococcus species isolated from marine recreational waters by MALDI-TOF MS and Rapid ID API® 20 Strep system. *Marine Pollution Bulletin*, v. 118, n. 1-2, p.376-381, 2017.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G. & GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *Fems Microbiology Reviews*, v. 36, n. 2, p.380-407, 2012.

DANIEL, D.S. et al. Public Health Risks of Multiple-Drug-Resistant *Enterococcus* spp. in Southeast Asia, *Appl. Environ. Microbiol.* v.81, n.18 p. 6090 – 6097, 2015.

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*, v. 42, n. 12, p. 5857-5860, 2004.

DEVRIESE, L.A. et al. Identification of Enterococcus species isolated from foods of animal origin. *International Journal Of Food Microbiology*, v. 26, n. 2, p.187-197, 1995.

DINGLE, T.C.; BUTLER-WU, S.M.. MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification. *Clinics In Laboratory Medicine*, v. 33, n. 3, p.589-609, 2013.

DONSKEY, C. J.. The Role of the Intestinal Tract as a Reservoir and Source for Transmission of Nosocomial Pathogens. *Clinical Infectious Diseases*, v. 39, n. 2, p.219-226, 2004.

DUBIN, Krista; PAMER, Eric G.. Enterococci and Their Interactions with the Intestinal Microbiome. *Microbiology Spectrum*, v. 5, n. 6, p.1-24, 2017.

EIGNER, U. et al. Performance of a Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry System for the Identification of Bacterial Isolates in the Clinical Routine Laboratory. *Clinical Laboratory*, v. 55, n. 8, p.289-296, 2009.

ECKBURG, P. B. et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*, v. 308, n. 5728, p.1635-1638, 2005.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature:Enterococci. 2017.Disponível em: <http://www.bacterio.net/enterococcus.html>>. Acesso em: 12 nov. 2018.

FACKLAM, R. R.; CARVALHO, M.G.S.; TEIXEIRA, L.M. History, Taxonomy, Biochemical Characteristics and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci. In: GILMORE, M, S. (Ed.). *The Enterococci: Patogenesis, molecular biology, and antibiotic resistense*. Washington: ASM Press, 2002, p. 154.

FARON, M.L.; LEDEBOER, N.A. & BUCHAN, B.W. Resistance Mechanisms, Epidemiology, and Approaches to Screening for Vancomycin-Resistant Enterococcus in the Health Care Setting. *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 54, n. 10, p.2436-2447, 2016.

FISHER, K. & PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus *Microbiology*, v. 155, n. 6, p.1749-1757, 2009.

FOULQUIÉ MORENO, M.R. et al. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal Of Food Microbiology*, v. 106, n. 1, p.1-24, 2006.

FRACALANZZA, S.A.P. et al. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 7, p.853-859, 2007.

FRENCH, G.I.. The continuing crisis in antibiotic resistance. *International Journal Of Antimicrobial Agents*, v. 36, p.3-7, 2010.

FURLANETO-MAIA, L. et al. Comparison between automated system and pcr-based method for identification and antimicrobial susceptibility profile of clinical

Enterococcus spp. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 56, n. 2, p.97-103, 2014.

GIEBEL, R. et al. Microbial Fingerprinting using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *Advances In Applied Microbiology*, p.149-184, 2010.

GOULART, V.A.M & RESENDE, R.R. MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer. *Nanocell News*, v. 1, n. 3, p.1651-1655, 2013.

HARBARTH, S. et al. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. *The American Journal Of Medicine*, v. 115, n. 7, p.529-535, 2003.

HIDRON, A.I. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, v. 29, n. 11, p.996-1011, 2008.

História e evolução da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase). KASVI. Disponível em: <https://kasvi.com.br/historia-e-evolucao-da-tecnica-de-pcr/> Acesso em: 03 dez., 2018.

HOLLAND, R. D. et al. Rapid Identification of Intact Whole Bacteria Based on Spectral Patterns using Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization with Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, v. 10, n. 10, p.1227-1232, 1996.

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

HOLZKNECHT, B.J. et al. Typing of vancomycin-resistant enterococci with MALDI-TOF mass spectrometry in a nosocomial outbreak setting. *Clinical Microbiology And Infection*, v. 24, n. 10, p.1101-1104, 2018.

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*, v. 42, n. 8, p.3558-3565, 2004.

JETT, B D; HUYCKE, M M; GILMORE, M S. Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 7, n. 4, p.462-478, 1994.

JOSHI, M. & DESHPANDE, J.D. POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *International Journal Of Biomedical Research*. v. 2, n. 1, p.81-87, 2011.

KALINA, A. P. The taxonomy and nomenclature of enterococci. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, v. 20, n. 2, p.185-189, 1970.

KASSIM, A. et al. Comparison of biomarker based Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and conventional methods in the identification of clinically relevant bacteria and yeast. *Bmc Microbiology*, v. 17, n. 1, p.56-63, 2017.

KE, D. et al. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiology*, v. 37, n. 11, p. 3497–3503, 1999.

KOLAR, M. et al. The influence of antibiotic use on the occurrence of vancomycin-resistant enterococci. *Journal Of Clinical Pharmacy And Therapeutics*, v. 31, n. 1, p.67-72, 2006.

KRISTICH CJ, RICE LB & ARIAS CA. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. 2014 Feb 6. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al., editors. Enterococci:18 From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection Landry M, Jorgensen J, Pfaller M, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9 th., 2014.

LASCOLA, B. & RAOULT, Didier. Direct Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Bottles by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Plos One*, v. 4, n. 11, p.8041-8049, 2009.

Leandro E.S., et al. Efeito de protetores e tratamentos de estresse na sobrevivência de *Lactococcus lactis subsp lactis* ao congelamento. *Rev Inst Latic "Candido Tostes"*. v. 390 n.68 p.37-40, 2013.

LEBRETON F., WILLEMS R.J.L. & GILMORE, M.S. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al., editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* Landry M, Jorgensen J, Pfaller M, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9 th , 2014 .

LECLERCQ, R. et al. Plasmid-Mediated Resistance to Vancomycin and Teicoplanin in *Enterococcus faecium*, *New England Journal of Medicine*, p.157 – 161, 1997.

LING, H. et al. Accuracy of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Clinical Pathogenic Fungi: a Meta-Analysis. *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 7, p.2573-2582, 2014.

LO, C.I. et al. MALDI-TOF Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Clinical Microbiology at Hôpital Principal de Dakar, Senegal (West Africa). *Plos One*, v. 10, n. 12, p.35-42, 2015.

MADSEN, K.T. et al. Virulence Factors Associated with Infective Endocarditis: A Mini Review. *The Open Microbiology Journal*, v. 11, n. 1, p.1-11, 2017.

MEYSAM, H.B. et al., “Clonal Diversity in Multi Drug Resistant (MDR) Enterococci Isolated from Fecal Normal Flora” *International Journal of Molecular and Cellular Medicine* v. n.4, p. 240 - 244, 2015.

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

MURRAY, B.E. et al. Comparison of Genomic DNAs of Different Enterococcal Isolates Using Restriction Endonucleases with Infrequent Recognition Sites. *Journal of Clinical Microbiology*, p.2059–2063, 1990.

MURRAY, P.R. What Is New in Clinical Microbiology - Microbial Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *The Journal of Molecular Diagnostics*, v. 14, n. 5, 2012.

PAI, R.; GERTZ, R. E. & BEALL, B.. Sequential Multiplex PCR Approach for Determining Capsular Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* Isolates. *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 1, p.124-131, 2006.

PAIXÃO, L.A. & CASTRO, F.F.S. Colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro *Universitas: Ciências da Saúde*, v. 14, n. 1, p.1-12, 2016.

PELTROCHE-LLACSAHUANGA, H. et al. Comparison of Two Chromogenic Media for Selective Isolation of Vancomycin-Resistant Enterococci from Stool Specimens. *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 12, p.4113-4116, 2009.

PEREIRA-MAIA, E.C. et al. Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. *Química Nova*, v. 33, n. 3, p.700-706, 2010.

PERRY, J.A.; WESTMAN, E.L.; WRIGHT, G.D. The antibiotic resistome: what's new?. *Current Opinion In Microbiology*, v. 21, p.45-50, 2014.

PORTILLO, A. et al. Macrolide Resistance Genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v. 44, n. 4, p.967-971, 2000.

PORITZ, M.A.; LINGENFELTER, B. Multiplex PCR for Detection and Identification of Microbial Pathogens. *Advanced Techniques In Diagnostic Microbiology*, p.475-493, 2018.

PRIETO, A.M.G. et al. Global Emergence and Dissemination of Enterococci as Nosocomial Pathogens: Attack of the Clones?. *Frontiers In Microbiology*, v. 7, p.788-796, 2016.

REYES, K.; BARDOSSY, A.C. & ZERVOS, M. Vancomycin-Resistant Enterococci. *Infectious Disease Clinics Of North America*, v. 30, n. 4, p.953-965, 2016.

RICE, L.B. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *The Journal Of Infectious Diseases*, v. 197, n. 8, p.1079-1081, 2008.

SAEKI, E.K.F., PONTES, L.P. & PONTES, E.A. Eficiência dos crioprotetores glicerol e leite desnatado para o congelamento de micro-organismos. *Acta Veterinaria Brasilica* v.9, n.2, p.195-198, 2015.

SCHLEIFER, K. H. & KILPPER-BALZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, v. 34, n. 1, p.31-34, 1984.

SHERMAN, J.M. The enterococci and related streptococci. *Journal of Bacteriology*, v. 35, n. 2, p. 81-93, 1937.

SEJAS, L.M, et al. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, -, v. 39, n. 1, p.27-35, 2003.

SPENCER, J.F.T .& SPENCER, D.M. Maintenance and Culture of Yeasts. *Yeast Protocols*, p.5-16, 1996.

SENG, Piseth et al. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, v. 49, n. 4, p.543-551, 2009.

SURETTE, Matthew D.; WRIGHT, Gerard D.. Lessons from the Environmental Antibiotic Resistome. *Annual Review Of Microbiology*, v. 71, n. 1, p.309-329, 2017.

TANNOCK, G.W. & COOK, G (2002) Enterococci as members of the intestinal microflora of humans. In: Enterococci: pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance (ed. M. Gilmore, P. Curvalin, D. Clewell, G. Dunny, B. Murray & L. Rice). American Society for Microbiology, Washington, D.C.

TEIXEIRA LM, SIQUEIRA-CARVALHO MG, FACKLAM RR 2007. Enterococcus. In PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, ML Landry, MA Pfaller (eds.), Manual of clinical microbiology, ASM Press, Washington DC, p. 430-442.

TITZE-DE-ALMEIDA, R. et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of Enterococci recovered from Brazilian intensive care units. *Brazilian Journal Of Infectious Diseases*, v. 8, n. 3, p.197-205, 2004.

TOP, J. et al. Ecological replacement of Enterococcus faecalis by multiresistant clonal complex 17 Enterococcus faecium. *Clinical Microbiology And Infection*, v. 13, n. 3, p.316-319, 2007.

TORRES, C. et al. Antimicrobial Resistance in Enterococcus spp. of animal origin. *Antimicrobial Resistance In Bacteria From Livestock And Companion Animals*, p.185-227, 2018.

TREITMAN, A.N. et al. Emerging Incidence of Enterococcus faecium among Hospital Isolates (1993 to 2002). *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 1, p.462-463, 2005.

UTTLEY, A H et al. High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections. *Epidemiology And Infection*, Si, v. 103, n. 1, p.173-181, 1989.

VAN VEEN, S.Q.; CLAAS, E.C. & KUIJPER, E.J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol.*, p. 900–907, 2010.

VALONES, M.A.A. et al. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian Journal Of Microbiology*, v. 40, n. 1, p.1-11, 2009.

VAN DER AUWERA, P. et al. Influence of Oral Glycopeptides on the Fecal Flora of Human Volunteers: Selection of Highly Glycopeptide-Resistant Enterococci. *Journal Of Infectious Diseases*, v. 173, n. 5, p.1129-1136, 1996.

WIESER, A. et al. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology And Biotechnology*, [s.l.], v. 93, n. 3, p.965-974, 2011.

WINN, W.C. et al.,Cocos Gram Positivos: Parte II: Estreptococos Enterococos e Bactérias “Semelhantes a Estreptococos”. In: Diagnóstico microbiológico. Texto e Atlas Colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. cap. 13, p.666 – 758, 2014.

YADAV, G. Linezolid and Vancomycin Resistant Enterococci: A Therapeutic Problem. *Journal Of Clinical And Diagnostic Research*, p.1-5, 2017.