



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCAS FERNANDO DA SILVA

***Enterococcus faecium* RESISTENTE À VANCOMICINA
ISOLADO DE INFECÇÃO URINÁRIA:
FORMAÇÃO DE BIOFILME E GENOMA**

LUCAS FERNANDO DA SILVA

***Enterococcus faecium* RESISTENTE À VANCOMICINA
ISOLADO DE INFECÇÃO URINÁRIA:
FORMAÇÃO DE BIOFILME E GENOMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Tadachi Morey

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Silva, Lucas Fernando da.

Enterococcus faecium resistente à vancomicina isolado de infecção urinária: formação de biofilme e genoma : formação de biofilme e genoma / Lucas Fernando da Silva. - Londrina, 2018.

72 f. : il.

Orientador: Sueli Fumie Yamada Ogatta.

Coorientador: Alexandre Tadachi Morey.

Coorientador: Eliandro Reis Tavares.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2018.

Inclui bibliografia.

1. VREfm - Tese. 2. Infecção relacionada a assistência à saúde - Tese. 3. Virulência. Genoma - Tese. I. Ogatta, Sueli Fumie Yamada. II. Morey, Alexandre Tadachi. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

LUCAS FERNANDO DA SILVA

***ENTEROCOCCUS faecium* RESISTENTE À VANCOMICINA
ISOLADO DE INFECÇÃO URINÁRIA:
FORMAÇÃO DE BIOFILME E GENOMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada
Ogatta
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Danielle Kian
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Lucy Lioni Megumi Yamauchi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Natália de Souza Botelho
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 05 de outubro de 2018.

À minha mãe, Lorene do Belém
Oliveira da Silva, por me ensinar que
“menos que 90 não é nota”, entre outras
tantas demonstrações diárias de amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta, por responder meus e-mails mesmo aos domingos, por me acolher e acreditar em mim desde a seleção deste doutorado, pelo incentivo e auxílio nos projetos desenvolvidos, sobretudo por compartilhar seus conhecimentos e experiências.

À Profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni, por compartilhar seus conhecimentos e pelo auxílio durante a realização deste doutorado.

Ao co-orientador deste trabalho Prof. Dr. Alexandre Tadachi Morey, pelos conhecimentos compartilhados, pelos exemplos de disciplina, eficiência e profissionalismo e pelo incentivo e auxílio durante todas as etapas deste doutorado.

Ao Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares pelo auxílio durante a realização deste doutorado, pelos conhecimentos compartilhados e pela parceria neste estudo.

Ao Dr. Renan Augusto Ribeiro e à Dra. Mariangela Hungria, da Embrapa Soja, pelo auxílio no sequenciamento do genoma do isolado analisado neste estudo.

Aos membros da banca profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta, profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi, prof. Dr. Eliandro Reis Tavares, Dra. Danielle Kian, e Dra. Natália de Souza Botelho, pela disponibilidade e contribuições.

À Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade, especialmente aos professores do programa de Pós-graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas.

Aos demais Professores e funcionários do Departamento de Microbiologia da UEL, pelo auxílio.

Aos colegas de laboratório Ana Elisa Belotto Morguette, Caroline Souza Azevedo, Danielle Kian, Pollyana Mirella Capela dos Santos, Renata Perugini Biasi Garbin, Márcio Leandro Oliveira, Patrícia Morais Lopes Pereira, pelos conhecimentos compartilhados e colaboração.

Aos colegas de turma pela colaboração durante as disciplinas.

Ao amigo Alexandre Tadachi Morey por me acolher no laboratório e me receber em sua casa, pelo incentivo e apoio constantes, pelos conselhos pessoais e profissionais, pelos bons momentos e pela ajuda fundamental para a realização

deste doutorado.

Ao amigo Eliandro Reis Tavares, por me receber no laboratório e em sua casa, pelos bons momentos e apoio desde os primeiros momentos em Londrina.

Ao amigo Daniel Santos Pinto Silva, por me receber em sua casa, pelos bons momentos e apoio desde os primeiros momentos em Londrina.

À minha amada esposa Mahara pelo carinho, amor, incentivo e suporte no período em que eu precisava de concentração para organizar este trabalho.

Aos meus pais e familiares, especialmente minha mãe, a pessoa que sempre me incentivou e apoiou, especialmente nos estudos.

A professora Adriana Knob pelo incentivo para iniciar o doutorado e por indicar este programa.

Aos amigos e companheiros de trabalho de Londrina.

Gostaria de agradecer também a todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Silva, Lucas Fernando da. ***Enterococcus faecium* resistente à vancomicina isolado de infecção urinária: formação de biofilme e genoma.** 2018. 72 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Enterococcus são cocos Gram-positivos, comensais em humanos e animais, sendo também encontrados em solo, água e alimentos. No entanto, algumas cepas possuem diferentes fatores de virulência e podem causar infecções. Atualmente os enterococos estão entre as principais causas de infecções, especialmente em ambientes de assistência à saúde, comumente associadas ao uso de cateteres, à alta morbidade e mortalidade. *Enterococcus faecium* destaca-se enquanto patógeno devido a sua resistência a vários antimicrobianos, inclusive à vancomicina (VRE_{fm}: Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*), além de sua capacidade de recombinações genéticas e de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas. Neste trabalho foi analisado o perfil de formação de biofilme de um isolado clínico de VRE_{fm}, em poliestireno e vidro, e realizado o sequenciamento, montagem e anotação do seu genoma. A produção de biomassa (coloração com cristal violeta) e a atividade metabólica (redução de XTT) sugerem que o isolado é capaz de aderir rapidamente à superfície de poliestireno e que o período entre 12 e 24 horas compreende a etapa de maior multiplicação microbiana e formação de biofilme. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura revelaram aumento da densidade celular e alterações no agrupamento das células ao decorrer do tempo, de maneira semelhante em poliestireno e vidro. O sequenciamento do genoma revelou a ocorrência de genes relacionados com: resistência a determinados antimicrobianos (eritromicina, estreptotricina, fluoroquinolonas, glicopeptídeos e quaternário de amônio), bombas de efluxo de múltiplos antimicrobianos, beta-lactamases, proteínas de ligação à penicilina, multi-resistência; adesão e formação de biofilme (*acm*, *efafm* e *esp*), autoindutores de *quorum-sensing*, promotores de agregação (*agr*); evasão do sistema imune (*Leucine-rich protein*), invasão de tecidos (hemolisina), capacidade de causar peritonite e endocardite (serina-protease e sortases), e outros associados com patogenicidade. Os resultados correlacionaram os genótipos da cepa em relação à capacidade de adesão e formação de biofilme, além da presença de fatores relacionados com resistência e patogenicidade, reforçando a relevância deste clone do ponto de vista clínico.

Palavras-chave: VRE_{fm}. Infecção relacionada a assistência à saúde. Virulência. Genoma.

Silva, Lucas Fernando da. **Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from urinary infection: biofilm formation and genome.** 2018. 72 p. Thesis (PhD in Microbiology) - Londrina State University, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Enterococcus are Gram-positive cocci, commensal in humans and animals, and are also found in soils, water and food. However, some strains have different virulence factors and can cause infections. Currently enterococci are among the main causes of infections, especially in health care settings, commonly associated with catheter use, high morbidity and mortality. *Enterococcus faecium* stands out as a pathogen due to its resistance to several antimicrobials, including vancomycin (VREfm: Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*), as well as its capacity for genetic recombination and biofilm formation on biotic and abiotic surfaces. In this work the profile of biofilm formation of a clinical isolate of VREfm, in polystyrene and glass, was analyzed and the sequencing, assembly and annotation of its genome was performed. The production of biomass (violet crystal staining) and metabolic activity (XTT reduction) suggest that the isolate is able to adhere to the polystyrene surface quickly and that the period between 12 and 24 hours comprises the stage of greater microbial multiplication and formation of biofilm. Scanning electron microscopy images revealed increased cell density and changes in cell grouping over time, similarly in polystyrene and glass. Genome sequencing revealed the occurrence of genes related to: resistance to certain antimicrobials (erythromycin, streptothricin, fluoroquinolones, glycopeptides and quaternary ammonium), multidrug efflux pumps, beta-lactamases, penicillin binding proteins, multiresistance; adhesion and formation of biofilm (*acm*, *efafm* and *esp*), *quorum-sensing* autoinducers, aggregation promoters (*agr*); immune system evasion (*Leucine-rich protein*), tissue invasion (hemolysin), ability to cause peritonitis and endocarditis (serine protease and sortases), and others associated with pathogenicity. The results correlated the genotypes of the strain with respect to the adhesion capacity and biofilm formation, besides the presence of factors related to resistance and pathogenicity, reinforcing the relevance of this clone from the clinical point of view.

Key words: VREfm. Nosocomial. Virulence. Biofilm. Genome.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1	O gênero Enterococcus	11
2.2	Tratamento antimicrobiano das infecções enterocócicas e resistência aos antimicrobianos	16
2.3	Formação de Biofilme em E. faecium	21
2.4	Sequenciamento do genoma de E. faecium	24
3	OBJETIVOS	32
4	METODOLOGIA	33
4.1	Escolha e identificação do isolado	33
4.2	Cultivo	33
4.3	Cinética de crescimento (curva de crescimento)	33
4.4	Cinética de biofilme	34
4.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	35
4.6	Sequenciamento, montagem e anotação do genoma do isolado	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	Formação de biofilme de Enterococcus faecium resistente à vancomicina cepa 170	37
	Curva de crescimento	37
	Quantificação da biomassa e atividade metabólica do biofilme	38
	Microscopia Eletrônica de Varredura	41
5.2	Artigo científico	43
6	CONCLUSÕES	47
7	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

Enterococcus são cocos Gram-positivos que habitam o trato gastrointestinal de humanos e animais (SGHIR et al., 2000), sendo também encontradas em solos, água e alimentos (KLIBI et al., 2012; RATHNAYAKE et al., 2012; MURRAY et al., 2015). Embora sejam considerados microrganismos de baixo potencial de virulência, as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), causadas por enterococos, vêm aumentando nas últimas décadas (HIDRON et al., 2008; WOODFORD; LIVERMORE, 2009), entre as quais, endocardite (SOOD et al., 2008), infecções de feridas e do trato urinário (HORNER et al., 2005).

Enterococcus faecium e *Enterococcus faecalis* são as espécies de maior importância clínica (IWEN et al., 1997; DAHLEN et al., 2012). No entanto, nas duas últimas décadas, a incidência de infecções ocasionadas por *E. faecium* vem aumentando significativamente, principalmente por causa da resistência a múltiplos antimicrobianos (MDR: *multiple drug resistance*) apresentada pela espécie (DALLA COSTA et al., 1998; HIDRON et al., 2008; DOERNBERG et al., 2017; SACRAMENTO et al., 2017). Particularmente, resistência aos glicopeptídeos entre isolados de *Enterococcus* spp. têm sido relatada em diversas regiões do mundo (HIDRON et al., 2008; RUZON et al., 2010; ARIAS; MURRAY, 2012; de KRAKER et al., 2013; GOMES et al., 2014; RESENDE et al., 2014; COOMBS et al., 2016).

Ao contrário de *E. faecalis* que pode ser isolado de pacientes tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade, uma subpopulação definida de *E. faecium* está associada a pacientes hospitalizados e raramente é encontrada em ambientes comunitários. Esses clones, associados ao hospital, pertencentes ao complexo clonal 17 (CC17), são caracterizados pela aquisição de elementos genéticos adaptativos, incluindo genes envolvidos no metabolismo, formação de biofilme e resistência a antibióticos (GUZMAN PRIETO et al., 2016).

A crescente importância clínica de *E. faecium* também está relacionada com a sua capacidade de adesão e formação de biofilme em superfícies de biomateriais em ambiente hospitalar (SÁNCHEZ-DÍAZ et al., 2016). Biofilmes são compostos por comunidades polimicrobianas e uma matriz polimérica extracelular produzida por elas (WOJTYCZKA et al., 2014), bem como qualquer material aprisionado dentro desta matriz. Biofilmes são compostos principalmente por água e matéria orgânica,

composta principalmente por exopolissacarídeos (MACÊDO, 2000). A matriz ajuda os microrganismos do biofilme a resistirem às condições estressantes dos ambientes, como depleção de águas e nutrientes, presença de antimicrobianos (KIVES et al., 2006). O biofilme contribui para evasão das defesas e persistência dos microrganismos no hospedeiro. Estas características dificultam o tratamento das infecções relacionadas a formação de biofilmes, as quais geralmente estão associadas a altas taxas de mortalidade (RAMAGE et al., 2006).

O potencial de adaptação de *E. faecium* e sua emergência como importante patógeno de Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde (IRAS) é provavelmente devido a plasticidade de seu genoma, o qual lhe confere a capacidade de aquisição e disseminação de determinantes genéticos de resistência e virulência (MURRAY et al., 2000). O sequenciamento do genoma de patógenos contribui para o conhecimento sobre a evolução de suas características; permitindo identificar “assinaturas” genéticas que possam facilitar a identificação da espécie e seus atributos de virulência e resistência antimicrobiana. A partir destes dados é possível elaborar estratégias para minimizar a incidência de IRAS (BALLOUX et al., 2018).

O isolado clínico de *E. faecium* deste trabalho foi identificado e analisado em estudos anteriores e destaca-se por: pertencer ao CC17, ser capaz de aderir em células de mamíferos; ser fortemente formador de biofilme e resistente a vários antimicrobianos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O gênero *Enterococcus*

O gênero *Enterococcus* compreende espécies de cocos Gram-positivos (CHENOWETH; SCHABERG, 1990). Os enterococos habitam o trato gastrointestinal e urogenital humano (SGHIR et al., 2000; STOBBERINGH et al., 1999), coexistindo com outros microrganismos, com possível papel na manutenção do equilíbrio homeostático do intestino humano (KASPER et al., 2017). Estas bactérias também podem ser encontradas em solos, água e alimentos, especialmente crus (CETINKAYA et al., 2000; FACKLAM et al., 2002; JENSEN et al., 2002; AARESTRUP et al., 2004).

O nome enterococo refere-se à forma arredondada e a origem entérica do grupo, conhecida há mais de 100 anos (MURRAY, 1990). Os enterococos possuem dimensões entre 0,6 a 2,5 μm (MURRAY et al., 2015). Em amostras clínicas, os enterococos aparecem normalmente como células isoladas, diplococos, cadeias curtas, cadeias longas (KASPER et al., 2017), ou ainda em forma cocobacilar, quando cultivadas em meio solidificado (MURRAY et al., 2015). A maioria das espécies é imóvel, porém há espécies móveis, com poucos flagelos e ausência de cápsula (FACKLAM et al., 2002).

Historicamente, enterococos isolados de várias fontes humanas, de animais, alimentos, entre outras, foram identificados como grupos, espécies, ou subespécies do gênero *Streptococcus* (FACKLAM et al., 2002; MURRAY et al., 2015). *Enterococcus* e *Streptococcus* compartilham várias características morfológicas e fenotípicas, incluindo reação catalase negativa (KASPER et al., 2017). Em contrapartida, os enterococos apresentam o antígeno ácido teicoico glicerol associado à parede celular, característica do grupo estreptocócico D, segundo a classificação de Lancefield (GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010).

Somente em 1970 foi proposta uma reclassificação dos enterococos, com base em diferenças fenotípicas e no arranjo celular (DIAZGRANADOS et al., 2005; MURRAY et al., 2015). Entretanto, a classificação do gênero *Enterococcus* só foi ampliada anos mais tarde, com o auxílio de técnicas bioquímicas e moleculares (FACKLAM et al., 2002), como hibridação do DNA e sequenciamento do rRNA 16S (KASPER et al., 2017). *Enterococcus* spp. pertencem ao Filo Firmicutes; Classe

Bacilli, Ordem Lactobacillales; Família Enterococcaceae e Gênero *Enterococcus* (MADIGAN et al. 2004; TAXONOMY BROWSER, 2018).

Enterococos são bactérias anaeróbias facultativas, não possuem a enzima citocromo e produzem a enzima leucina-aminopeptidase (LAP). Estas bactérias são capazes de fermentar diversos carboidratos, especialmente glicose, gerando L(+) ácido lático, geralmente sem produção de gases (GAMA, 2008). Estes microrganismos possuem exigências nutricionais complexas e algumas espécies produzem pseudocatalase, apresentando-se como catalase positivas com fraca efervescência (LEME; FERREIRA, 2001; FACKLAM et al., 2002).

Os enterococos apresentam vantagens adaptativas em relação a outros microrganismos filogeneticamente próximos. Estas bactérias são capazes de hidrolisar esculina, crescer na presença de sais biliares a 40%, em pH de 9,6, em altas concentrações de NaCl (6,5%) e em temperaturas entre 10 e 45 °C, com crescimento ótimo a 37 °C (DAHLEN et al., 2012; KONEMAN et al., 2001; MURRAY 2015). As espécies mais relevantes do ponto de vista clínico comumente são capazes de hidrolisar Pirrolidônol-β-naftilamida (PYR) e geralmente não reduzem nitrato (LECLERCQ et al., 1992). Enterococos também são relativamente resistentes a desinfetantes químicos, tais como glutaraldeído, cloro e álcool (ZHANG et al., 2013).

A capacidade de adaptação a condições estressantes, como aquelas encontradas no trato gastrointestinal humano, é necessária para a sobrevivência das bactérias. Entre os principais desafios para os microrganismos da microbiota intestinal, destaca-se a bile (BEGLEY; HILL; GAHAN, 2006), uma mistura complexa de sais biliares, fosfolipídios, colesterol, proteínas e bilirrubina (ESTELLER, 2008). Sais biliares são moléculas anfipáticas que, além de atuar como detergentes, auxiliando na solubilização e digestão lipídica; também desempenham papel nas defesas do hospedeiro, devido as suas potentes propriedades antimicrobianas, as quais podem causar danos ao DNA, proteínas e membranas das bactérias entéricas (MERRIT; DONALDSON, 2009; HOFMANN; HAGEY, 2008). Em bactérias Gram-positivas, o rompimento dos *loci* gênicos de tolerância à bile pode prejudicar a sobrevivência intestinal (ZHANG et al., 2013). Por outro lado, mutação que confere alta resistência à bile em *Escherichia coli* resulta em vantagem durante a colonização intestinal (De PAEPE ET AL., 2011).

A resistência intrínseca dos enterococos a uma variedade de antimicrobianos pode romper o equilíbrio do ecossistema, promovendo aumento da colonização gastrointestinal por estas bactérias. Destacam-se antibióticos que são excretados na bile e possuem atividade de amplo espectro, como determinadas cefalosporinas, os quais estão associados ao isolamento de maiores números de enterococos das fezes (KASPER et al., 2017).

Vários estudos mostram que níveis mais altos de colonização gastrointestinal representam um fator crítico na patogênese de infecções enterocócicas. No entanto, os mecanismos pelos quais os enterococos colonizam com sucesso o intestino e conseguem acesso aos vasos linfáticos, ou à corrente sanguínea, ainda não estão completamente esclarecidos (KASPER et al., 2017).

Embora já tenham sido considerados microrganismos com baixo potencial de virulência (HIDRON et al., 2008). Os enterococos estão entre as principais causas de infecções de corrente sanguínea, do trato urinário e endocardite (BOUCHER et al., 2009; PENG et al., 2018; FOCHTMANN-FRANA et al., 2018). Adicionalmente, estas bactérias também podem causar infecções pélvicas, respiratórias, neonatais, intra-abdominais, cutâneas e do sistema nervoso central (LEME; FERREIRA, 2001; PALAVECINO et al., 2001; GOULD et al., 2004). Ainda, as infecções enterocócicas estão relacionadas à alta morbidade e mortalidade (FREITAS et al. 2006; ARIAS; MURRAY, 2012).

Algumas cepas de *Enterococcus* possuem alto potencial de colonização de tecidos de hospedeiros humanos, persistindo por longos períodos, podendo invadi-los e causar doenças (WOODFORD et al., 2009), especialmente em ambientes relacionados com assistência à saúde (HIDRON et al., 2008; WERNER et al., 2012).

Infecções enterocócicas acometem principalmente indivíduos imunocomprometidos ou submetidos a procedimentos médicos cirúrgicos ou invasivos, especialmente pelo uso de cateteres intravenosos (MURRAY; WEINSTOCK, 1999; RICHARDS et al., 2000; MURRAY, 2015). Períodos prolongados de hospitalização e da sobrevivência da bactéria no hospedeiro e no ambiente, procedimentos de higiene e limpeza negligentes, dificuldade de identificação de reservatórios e o uso frequente de antimicrobianos estão entre as principais adversidades para combater as infecções enterocócicas em ambientes hospitalares (TORNIEPORTH et al., 1996; HAYDEN, 2000; CETINKAYA et al., 2000; BYERS et al., 2002; MARTINEZ et al., 2003; PANESSO et al., 2010). Os pacientes

colonizados ou infectados são os principais reservatórios de enterococos em ambientes hospitalares (TORNIEPORTH et al., 1996).

Embora várias espécies de enterococos tenham sido isoladas de infecções humanas, a grande maioria das doenças é causada por duas espécies, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (KASPER et al., 2017). Apesar da maior prevalência de infecções enterocócicas causadas por *E. faecalis* (SOOD, 2008), *E. faecium* vem se destacando como um agente etiológico importante de Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde (IRAS) no mundo todo (HOSHUYAMA et al., 2008; TOP et al., 2008; WERNER et al., 2008). A relação entre *E. faecium* e infecções hospitalares pode ser explicada, pelo menos em parte, pela vantagem adaptativa conferida pela sua capacidade de adquirir determinantes genéticos de múltipla resistência antimicrobiana (WILLEMS; BONTEN, 2007; SOOD et al., 2008).

Vários fatores de virulência têm sido descritos em *Enterococcus* (PALAZZO et al., 2011). Estes fatores estão relacionados com a adaptação e sobrevivência da bactéria no hospedeiro durante o processo de infecção (HARE, 2014). A maioria dos genes que codificam fatores de virulência está localizada em ilhas de patogenicidade, entre os quais destacam-se (SCHLIEVERT et al., 2010; PALAZZO et al., 2011; TSIKRIKONIS et al., 2012; KASPER et al., 2017):

a) *acm/ace* (adesina de ligação ao colágeno em *E. faecium* e *E. faecalis*, respectivamente): estas proteínas fazem parte de uma subfamília de adesinas de superfície bacteriana, denominada MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) e estão envolvidas na fixação das bactérias às proteínas do hospedeiro, como colágeno, fibronectina e fibrinogênio. Os genes *ace* e *acm* são importantes na patogênese de endocardite experimental (NALLAPAREDDY et al., 2003);

b) *asa1* (substância de agregação): esta proteína pode aumentar a aderência bacteriana aos tecidos dos hospedeiros, como células renais e músculos cardíacos (GUZMAN et al., 1989; JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2014);

c) *cyl* (citolisina): atua como bacteriocina contra várias bactérias Gram-positivas, bem como possui atividade hemolítica em células de procariotos e eucariotos (GILMORE et al., 2003);

d) *empA* e *empB* (componentes do operon *empABC*, codifica para *pili*): mutantes nulos para esses genes apresentam atenuação na capacidade de adesão ao fibrinogênio e colágeno tipo I, na formação de biofilme e virulência em modelo murino de infecção do trato urinário (MONTEALEGRE et al., 2016);

e) *esp* (proteína de superfície): sua presença está relacionada com a capacidade de adesão inicial e formação de biofilmes de enterococos (TOLEDO-ARANA et al., 2001; TENDOLKAR et al., 2004; CAMARGO et al., 2006; CHANG et al., 2010;).

f) *geE* (gelatinase): participa da degradação de tecidos e de componentes do sistema imunológico do hospedeiro. Mutantes que não produzem gelatinase são altamente atenuados na peritonite, endocardite e endoftalmite experimentais (KASPER et al., 2017);

g) *hyl* (hialuronidase): o gene de *E. faecium* codifica uma glicosiltransferase e tem sido frequentemente associado com aumento da virulência desta bactéria em modelo murino de peritonite (RICE et al., 2009; ARIAS et al., 2010; FREITAS et al., 2010);

h) adesinas de ligação às moléculas do hospedeiro da família MSCRAMM (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*), importantes para a colonização e invasão dos tecidos, como *ecbA* (adesinas de ligação ao colágeno tipo 1); *sgrA* (adesina de ligação aos componentes da lâmina basal); *fnm* (adesina de ligação a fibronectina) (PATTI et al., 1994; VENGADESAN; NARAYANA, 2011).

Algumas medidas profiláticas podem evitar a disseminação de enterococos multirresistentes e entre as principais recomendações estão: desinfecção minuciosa das superfícies e objetos; uso moderado de antimicrobianos (especialmente vancomicina); identificação e isolamento de pacientes colonizados ou infectados; vigilância de pacientes de risco; divulgação dos resultados de prevalência e/ou incidência de enterococos multirresistentes e implementação de programas de orientações sobre medidas preventivas e de controle (CDC, 1995; SIEGEL et al., 2007).

2.2 Tratamento antimicrobiano das infecções enterocócicas e resistência aos antimicrobianos

O gênero *Enterococcus* pode apresentar resistência intrínseca à aminoglicosídeos, cefalosporinas, penicilinas, oxacilina e trimetoprina (WILLEMS et al., 2011; SHARIFI et al., 2012; MURRAY et al., 2015). Ainda, há indícios de que os enterococos podem transferir sua resistência para outros organismos ainda mais virulentos, como *Staphylococcus aureus* (WERNER et al., 2008).

A combinação entre antimicrobianos é a principal estratégia para o tratamento de infecções enterocócicas. Pode ser utilizado um agente que atue na parede celular, como um beta-lactâmico (ampicilina ou penicilina, por exemplo), e para obter efeito bactericida pode ser utilizado sinergicamente um aminoglicosídeo, como gentamicina ou estreptomicina (HORNER et al., 2005).

Em caso de infecções graves causadas por cepas resistentes aos aminoglicosídeos ou beta-lactâmicos, são utilizados glicopeptídeos (vancomicina ou teicoplanina). Porém, as taxas de eliminação das infecções são inferiores em relação ao tratamento combinado (HORNER et al., 2005).

A resistência de *E. faecium* aos antimicrobianos pode ocorrer por mutação no DNA ou por aquisição de material genético oriundo de outro microorganismo, principalmente via plasmídeos (RICE et al., 2003). A resistência também pode ocorrer de uma maneira intrínseca, quando é uma característica inata da cepa, por exemplo, ausência do alvo de um determinado antimicrobiano (MURRAY et al., 2015). Os genes associados à resistência aos antimicrobianos podem estar localizados no genoma bacteriano ou em elementos móveis, como plasmídeos e transposons (AMINOV et al., 2001), o que facilita sua transferência entre microrganismos (MILLER, 1998; OCHMAN et al., 2000).

E. faecium destaca-se por sua resistência aos antibióticos β -lactâmicos e aos aminoglicosídeos, mesmo em altas concentrações (Concentração inibitória mínima $\geq 500 \mu\text{g/mL}$). Resistência a altas concentrações de aminoglicosídeos é comumente observado em isolados de infecções enterocócicas graves. Esta resistência normalmente é devida a expressão do gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* que codifica uma enzima modificadora dos aminoglicosídeos [AAC(6')-APH(2'')]. Estes genes estão amplamente disseminados entre os enterococos, diminuindo as opções terapêuticas para infecções enterocócicas graves. Além disso, a presença desta enzima anula o

sinergismo observado entre um aminoglicosídeo e um antimicrobiano ativo na biossíntese da parede celular bacteriana (KOBAYASHI et al., 2001; KASPER et al., 2017).

O mecanismo de resistência aos β -lactâmicos está associado à expressão de uma proteína de ligação a penicilina (PBP, *penicillin-binding protein*), designada PBP5, a qual constitui o alvo desses antimicrobianos. A PBP5 exibe menor afinidade pela ampicilina, permitindo a biossíntese da parede celular na presença de ampicilina, mesmo quando outras PBP são inibidas. O alto nível de resistência à ampicilina em isolados clínicos pode ser devido a mutações no gene que codifica a PBP5, ou por produção excessiva de PBP5, que pode diminuir ainda mais a afinidade da proteína pela ampicilina (KASPER et al., 2017).

Enterococos podem também apresentar resistência a: linezolida, comumente devido a mutações no gene do rRNA 23S e a presença de uma rRNA metilase; daptomicina, envolvendo alterações da membrana celular; e tigeciclina, reduzindo ainda mais as alternativas terapêuticas (KASPER et al., 2017).

2.2.1 Resistência à vancomicina

A vancomicina é um glicopeptídeo isolado de *Streptomyces orientalis* (PFEIFFER, 1981). Devido a sua toxicidade, inicialmente não foi amplamente utilizada para tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas. O uso clínico difundiu-se somente alguns anos após sua descoberta (1956), em consequência da disseminação de *Staphylococcus aureus* resistente à penicilina (NAILOR; SOBEL, 2011).

Estruturalmente, a vancomicina é um glicopeptídeo composto por uma cadeia peptídica de sete membros e duas moléculas de açúcares, vancosamina e glicose. O efeito antimicrobiano da vancomicina ocorre por meio da inibição da biossíntese da parede celular bacteriana, devido a sua alta afinidade pelo dipeptídeo D-alanil-D-alanil (D-Ala-D-Ala) dos precursores do pentapeptídeo, inibindo desta maneira as reações catalisadas por transglicosilases, transpeptidases e D,D-carboxipeptidases (CETINKAYA et al., 2000). O mecanismo de resistência à vancomicina envolve a substituição do último resíduo de D-alanina dos precursores de peptidoglicano por D-lactato ou D-serina, com consequente resistência de alto e de baixo nível, respectivamente (KASPER et al., 2017).

Fenótipos VRE podem resultar da expressão de genes que estão contidos em um operon, denominado *van*, o qual pode estar presente tanto em plasmídeo quanto no cromossomo bacteriano (COURVALIN et al., 2006). Os mecanismos de resistência mais relevantes clinicamente são os fenótipos VanA, VanB e VanM, por conferirem níveis intermediário ou alto de resistência à vancomicina, e por sua capacidade de transferência entre espécies bacterianas (CETINKAYA et al., 2000; LEE et al., 2018).

A maioria dos surtos de VRE registrados são causados por enterococos que expressam os operons *vanA* ou *vanB* (SUTTER et al., 2010; KRAFT et al., 2011; MARRA et al., 2011). Porém, outros operons também estão relacionados com a resistência aos glicopeptídeos: *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanF*, *vanG*, *van M* e *vanN* (CETINKAYA et al., 2000). A expressão destes diferentes conjuntos de genes resulta em distintos fenótipos de resistência, cuja transcrição pode ser induzida por vancomicina e/ou teicoplanina (CETINKAYA et al., 2000; COURVALIN et al., 2006).

O resultado da expressão do genótipo *vanA*, é a síntese de D-Alanina-D-Lactato, alterando o sítio alvo do glicopeptídeo (CETINKAYA et al., 2000). O fenótipo VanA, o primeiro tipo de resistência à vancomicina descrito, e também o mais prevalente, é mediado pelo transposon *Tn1546*. Este transposon frequentemente localiza-se em plasmídeo e pode carrear novos determinantes genéticos de resistência (LEME; FERREIRA, 2001). Cepas que expressam o fenótipo VanA apresentam alto nível de resistência à vancomicina e teicoplanina, assim como aquelas que expressam o fenótipo VanM (o gene *vanM* apresenta 80% de identidade com o gene *vanA*). O fenótipo VanB (o gene *vanB* apresenta 67 a 76% de homologia de sequência com o gene *vanA*) pode conferir níveis variados de resistência à vancomicina e normalmente, sensibilidade à teicoplanina (BAZET et al., 2005). Os demais fenótipos ocorrem com menor frequência e conferem diferentes níveis de resistência à vancomicina (CETINKAYA et al., 2000; COURVALIN et al., 2006; LEE et al., 2018).

A exposição à vancomicina induz a autofosforilação de uma histidina quinase, uma proteína sensora transmembrana, denominada VanS. Por sua vez, esta enzima fosforila um regulador transcricional (VanR), que ativa a transcrição do operon *van* a partir de promotores, denominados R e H. Em ausência de vancomicina, VanS atua como uma fosfatase, exaurindo o conteúdo celular de VanR fosforilado, inibindo consequentemente a transcrição do operon *van* (COURVALIN, 2006).

O gene *vanH* codifica uma desidrogenase que reduz o piruvato a D-lactato. VanA ligase (produto do gene *vanA*), liga D-lactato a D-alanina. A molécula resultante desta ligação, D-Ala-D-Lac, é incorporada nos precursores do pentapeptídeo em substituição ao dipeptídeo C-terminal D-Ala-D-Ala. Uma vez que D-Ala-D-Lac apresenta baixa afinidade pelos glicopeptídeos, inibe a ação dos antimicrobianos e permite a síntese do peptideoglicano (COURVALIN, 2006).

O gene *vanX* codifica a enzima D,D-dipeptidase, enquanto o gene *vanY* codifica a enzima D,D-carboxipeptidase. Estas enzimas realizam a hidrólise dos precursores naturais D-Ala-D-Ala produzidos pelas bactérias. A função de *vanZ* permanece desconhecida; no operon *vanB*, este gene está ausente e o gene *vanW* está presente; no operon *vanM*, ambos os genes estão ausentes (CETINKAYA et al., 2000; COURVALIN, 2006; LEE et al., 2018). Adicionalmente, enterococos resistentes à vancomicina também produzem enzimas que destroem os precursores com terminação de D-alanina-D-alanina, assegurando a não disponibilidade de sítios de ligação adicionais para a vancomicina (KASPER et al., 2017).

Aproximadamente 30 anos após a descoberta da vancomicina (em 1956) foi relatado o primeiro surto de infecções por VRE, na Europa (LECLERCQ et al., 1988; UTTLEY et al., 1988; GRAYSON et al., 1991; GAMBAROTTO et al., 2000), e um ano depois, em 1989, nos Estados Unidos (FRIEDEN et al., 1993). A resistência à vancomicina de *Enterococcus* spp. está entre as principais preocupações dos profissionais de saúde em relação ao controle de IRAS, tendo em vista o potencial de disseminação desta resistência (FURTADO et al., 2005; D'AZEVEDO et al., 2008). Além disso, as opções de antimicrobianos se tornam limitadas, dificultando o tratamento das infecções e, conseqüentemente, as taxas de mortalidade aumentam (DIAZGRANADOS et al., 2005).

Em 1990, a detecção de VRE foi associada ao uso de vancomicina nos hospitais, apesar deste medicamento estar entre as últimas opções para tratamento de infecções enterocócicas (RICE et al., 2003; METALLIDIS et al., 2006; TACCONELLI; CATALDO, 2008). De fato, a partir do início da década de 1990, tornou-se mais comum a utilização de vancomicina para o tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes a outros antibióticos, ou para substituir antibióticos que apresentavam algum tipo de desvantagem em relação à vancomicina (SIEGEL et al., 2007). A utilização de vancomicina em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) nos Estados Unidos também se tornou mais frequente desde

o início da década de 1990. Entre os anos de 1990 e 1997, a taxa de VRE passou de 1% para mais de 25% (SIEGEL et al., 2007).

Vários casos de infecções causadas por isolados de enterococos resistentes à vancomicina têm sido descritos em hospitais de vários países (KLARE et al., 2005; NEBREDÁ et al., 2007; CASTANHEIRA et al., 2008; GALLOWAY-PEÑA et al., 2009; BRILLIANTOVA et al., 2010; RUZON et al., 2010; MARRA et al., 2011; PALAZZO et al., 2011; VALDEZATE et al., 2012; PERUGINI et al., 2015). Ainda, a relação entre cepas multirresistentes de enterococos com complicações de determinadas infecções, como endocardite, vem se tornando cada vez mais comum (BOUCHER et al., 2009).

O primeiro caso brasileiro de infecção por VRE ocorreu em 1996, na cidade de Curitiba, no estado do Paraná. O registro foi atribuído à espécie *E. faecium*, isolada em hemocultura de uma criança com anemia aplásica. Neste caso em particular, a paciente havia sido internada anteriormente, bem como havia utilizado antibióticos (DALLA COSTA et al., 1998; DALLA COSTA et al., 2000; ROSSI, 2011). No ano de 2010, na cidade de Londrina, foi relatado o primeiro isolado clínico de *E. faecium* vancomicina-dependente do Brasil (KERBAUY et al., 2011).

Dados de vigilância de IRAS de vários países demonstraram que a porcentagem de isolados de *E. faecium* resistentes à vancomicina aumentou desde a década de 1990 (TREITMAN et al., 2005; BIEDENBACH et al., 2007; DESHPANDE et al., 2007). Na Austrália, a taxa de resistência à vancomicina em *E. faecium* se tornou uma das mais altas do mundo, com 48,7% a 56,8% dos isolados clínicos em 2015 (LEONG et al., 2018). Na América do Norte ocorreu aumento de 76%, seguido pela América Latina (48,4%), Europa (31,5%) e Ásia/Região do Pacífico (14,1%) (KUO et al., 2014; SIMNER et al., 2015).

Relatos de infecções causadas por VRE (*Vancomycin-Resistant Enterococcus*) na América Latina e no Brasil vêm aumentando significativamente desde os primeiros casos identificados, ainda na década de 1980. Segundo pesquisa sobre a sensibilidade de cocos Gram-positivos, realizada por uma rede de monitoramento de resistência antimicrobiana de diferentes tipos de infecções, houve um aumento de mais de 10% de infecções causadas por *Enterococcus* resistente à vancomicina na América Latina, de 2003 a 2008. Já no Brasil, no mesmo período, as taxas de VRE, passaram de cerca de 7% para aproximadamente 30% (SADER; MOET; JONES, 2009; ROSSI, 2011).

Em 2008, foi elaborado um relatório com a finalidade de aprofundar o conhecimento do perfil de sensibilidade de *Enterococcus* spp. no Brasil, e conseqüentemente planejar estratégias para o controle de infecções causadas por VRE. Neste relatório verificou-se a sensibilidade de *Enterococcus* para os seguintes antibióticos: aminoglicosídeos, ampicilina, linezolida, penicilina, teicoplanina e vancomicina. Entre as espécies notificadas, 77% eram *E. faecalis* e 14% *E. faecium*. Foram investigadas 75 instituições, das quais 14 apresentaram cepas de *E. faecium* resistentes à vancomicina (VRE_{fm}), totalizando 15% dos isolados de *E. faecium* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil, 2008). A detecção de VRE no Brasil ocorre principalmente em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), (KROCHMAL et al., 2011; SHRAIFI et al., 2012).

Tendo em vista a resistência à maioria dos antimicrobianos pelos enterococos, o tratamento das infecções causadas por estas bactérias representa um grave problema de saúde mundial (MURRAY et al., 2015). O tratamento de infecções enterocócicas causadas por *E. faecalis* ou *E. faecium* diferem, principalmente devido a diferenças nos perfis de resistência das duas espécies. A resistência à ampicilina e vancomicina, por exemplo, é rara em *E. faecalis*, enquanto é comum na maioria das cepas de *E. faecium* (KASPER et al., 2017).

2.3 Formação de Biofilme em *E. faecium*

As bactérias são comumente encontradas como parte de um complexo de organismos conhecido como biofilme (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000). Biofilmes são associações entre células microbianas e uma determinada superfície, embebidas em uma matriz polimérica extracelular (COSTERTON et al., 1995).

O biofilme proporciona aos microrganismos proteção contra os efeitos adversos do ambiente, como depleção de águas e nutrientes, e presença de antimicrobianos (KIVES et al., 2006). Ainda, a arquitetura do biofilme proporciona um ambiente favorável para a transferência de material genético entre os microrganismos em biofilme (DONLAN; COSTERTON, 2002; KAFIL; MOBAREZ, 2015).

Além das superfícies naturais, diferentes materiais abióticos comumente utilizados em vários setores, tais como vidro, aço inoxidável, borracha, poliuretano, poliestireno, polipropileno, polivinil, silicone e alumínio são propícios à adesão

microbiana e formação de biofilmes (DONLAN, 2001; MARQUES et al., 2007; SIMÕES et al., 2010; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2013; HAMADI et al., 2014; DI CICCIO et al., 2015). Do ponto de vista clínico, os materiais utilizados para implantes médicos, como cateteres, suportam a formação de biofilmes microbianos (FABRETTI; HUEBNER 2005; BALDASSARRI et al., 2005; RAMAGE et al., 2006). Infecções relacionadas a cateter representam uma significativa causa de morbidade e mortalidade no mundo todo (SHUMAN; CHENOWETH 2018; RUPP; KARNATAK 2018).

A patogênese das infecções relacionadas ao uso de cateteres pode iniciar com a migração de microrganismos da pele no local de inserção e, com a colonização da ponta do cateter (MAKI et al., 1977; MERMEL et al., 1991; DONLAN; COSTERTON, 2002). Ocasionalmente, também pode ocorrer disseminação hematogênica de outro foco de infecção (O'GRADY, 2002).

A aderência microbiana depende de características da célula bacteriana, da superfície (biótica ou abiótica) envolvida, e da camada de moléculas adsorvidas ou do filme condicionante, por exemplo, proteínas do soro, no caso de cateteres intravenosos (MORALES et al., 2004). Além do sangue, outros materiais produzidos pelo hospedeiro como lágrimas, urina, saliva, secreções respiratórias, influenciam na aderência das bactérias aos tecidos/superfícies (VANDECASTEELE et al., 2003).

Em estudo comparando processos de adesão, invasão e formação de biofilmes de isolados clínicos de diferentes espécies bacterianas, verificou-se que os isolados de *E. faecium* aderiram mais eficientemente do que os isolados de *Streptococcus gallolyticus*. Embora ambas as espécies tenham sido classificadas como fortemente formadoras de biofilmes, os isolados de *E. faecium* exibiram capacidade de adesão duas a três vezes maior do que os isolados de *S. gallolyticus*, os quais apresentaram estruturas de biofilme mais compactas (SÁNCHEZ-DÍAZ et al., 2016).

Mohamed et al., (2004) em estudo com 163 isolados clínicos de *E. faecalis*, verificaram que a formação de biofilme era significativamente mais frequente em isolados de pacientes com endocardite e infecções do trato urinário (MOHAMED et al., 2004). A formação de biofilme é geralmente considerada uma característica importante para ambas às infecções (SILLANPAA et al., 2010).

Foi mostrado que a presença de *pili*, estruturas proteicas da superfície de *E. faecalis*, está associada a capacidade de formar biofilme, tanto em superfícies

abióticas como em tecidos de modelos murinos de endocardite e infecção do trato urinário (MOHAMED et al., 2004; KASPER et al., 2017).

Vários genes ou conjuntos de genes têm sido relacionados com formação de *pili* e de biofilme em *E. faecalis*, evidenciando a complexidade destes processos e a necessidade de ampliar o conhecimento sobre os genes envolvidos (MOHAMED et al., 2004; TELFORD et al., 2006). Menos ainda se conhece sobre estes processos em *E. faecium* (SILLANPAA et al., 2010). No entanto, segundo Sillanpaa et al., (2010), o *locus* que contém o operon *ebpABC* e um gene adjacente (*bps*), codifica proteínas que formam *pili* em *E. faecium*. A deleção deste operon provocou redução na capacidade de formação de biofilme e virulência em modelos murinos de endocardite e de infecções do trato urinário (MONTEALEGRE et al., 2016).

Heikens et al., (2007) em estudo com *E. faecium* isolado de infecção sanguínea, mostraram a participação do gene *esp* na formação de biofilme. Top et al., (2013) mostraram que a expressão deste gene é parcialmente regulada por EbrB, um regulador transcricional, cujo gene localiza-se upstream ao gene *esp*. A deleção do gene *ebrB* promove redução na capacidade de formar biofilmes, bem como na colonização intestinal de camundongo BALB/c pela bactéria. Entretanto o gene *esp* parece não ser essencial para adesão e colonização da mucosa epitelial de camundongos C57BL/6 (HEIKENS et al., 2009).

Diversos ensaios para quantificação de biofilme *in vitro* têm sido descritos, os quais podem ser classificados em: ensaios de biomassa de biofilme, baseados na quantificação de unidades formadoras de colônias - UFC; ensaios de viabilidade, baseados na quantificação de células viáveis; e ensaios de quantificação de matriz, baseados na coloração específica de componentes de matriz (PEETERS; NELIS; COENYE, 2007).

A quantificação de biomassa de biofilme por contagem das UFCs está entre as técnicas mais praticadas, apesar de ser lenta e laboriosa (DONLAN; COSTERTON 2002). Medidas da densidade óptica para estimar a formação de biofilme são comumente utilizadas (HANNIG et al., 2010; MOREIRA et al., 2006; PEETERS; NELIS; COENYE, 2007; SULE et al., 2009). O ensaio de coloração com cristal violeta é uma metodologia presuntiva para verificar a formação de biofilme por meio da quantidade de biomassa. Já o método de redução do sal tetrazólio (XTT) permite quantificar a formação de biofilme com base na atividade metabólica da

amostra. Para ambas as metodologias, as variáveis utilizadas são os valores de absorbância.

Entre as metodologias disponíveis utilizadas para analisar a formação de biofilme, destaca-se a microscopia eletrônica. O método preserva as estruturas envolvidas em condições viáveis. As amostras são fixadas com ajuda de um agente químico, tais como glutaraldeído e ósmio, ou criofixadas (MARQUES, 2007; PEETERS; NELIS; COENYE, 2007).

Atualmente, entre as técnicas disponíveis para ampliar o conhecimento sobre os mecanismos genéticos que sustentam a formação de biofilme e patogênese dos enterococos, destacam-se a genômica comparativa (SURYALETHA et al., 2018) e a bioinformática (PETREY; HONIG, 2014).

2.4 Sequenciamento do genoma de *E. faecium*

O potencial de adaptação dos enterococos e sua ascensão como importante patógeno nosocomial é provavelmente devido a plasticidade de seu genoma, o qual lhe confere a capacidade de aquisição e disseminação de determinantes genéticos de resistência e virulência (MURRAY et al., 2000). O sequenciamento do genoma de novos isolados humanos permite conhecer seus genes. A partir destes dados é possível desenvolver estudos sobre a estrutura e funções destes genes, buscando compreender a complexa maquinaria envolvida nos processos biológicos (DELAMUTA et al., 2012).

O primeiro método de sequenciamento de DNA foi desenvolvido por Sanger e colaboradores e apresentado ao mundo em 1977 (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). O princípio geral da técnica é sintetizar uma fita de DNA com terminadores marcados, complementar à fita da qual se deseja determinar a sequência (SHENDURE; JI, 2008). Os ddNTPs marcados não possuem o grupo hidroxila livre na extremidade 3'. Com isso, quando esse nucleotídeo é incorporado, o alongamento para, uma vez que o próximo nucleotídeo depende da hidroxila ausente (CARRARO; KITAJIMA, 2002).

A marcação confere uma cor diferente para cada um dos quatro ddNTPs, permitindo identificar o último nucleotídeo adicionado a determinado fragmento de DNA. Desta forma, vários fragmentos diferentes, marcados com um dos quatro fluorocromos, são obtidos e podem ser separados de acordo com seus tamanhos

por eletroforese em gel. Géis de poliacrilamida permitem a separação de fragmentos que diferem em apenas um nucleotídeo, proporcionando a resolução necessária para o sequenciamento da molécula de DNA de interesse (SANGER, 1988; HUANG et al., 1992).

A técnica, utilizada desde o primeiro genoma sequenciado (*Haemophilus influenzae*), permitiu sequenciar moléculas de DNA de vários organismos (FLEISCHMANN et al., 1995; LANDER et al., 2001). No entanto, devido ao alto custo e grande demanda de tempo, o sequenciamento de larga escala utilizando esta metodologia restringiu-se apenas a grandes laboratórios e centros de genômica (HALL, 2007).

Para superar a problemática da técnica de Sanger (1977), novas tecnologias foram sendo desenvolvidas, entre as quais se destacam: o primeiro sequenciador automático, em 1986, e o primeiro sequenciador por eletroforese capilar, em 1998 (GARCIA-HERNANDEZ et al., 2002). Sucessivamente, os sequenciadores automáticos foram sendo aprimorados, culminando em novas metodologias de sequenciamento, conhecidas como sequenciamento de nova geração (NGS: *next generation sequencing*), foram apresentadas (LIU et al., 2012).

A automatização do processo de sequenciamento permitiu realizar grandes projetos e sequenciar inúmeras moléculas de DNA, culminando no sequenciamento do genoma humano (VENTER et al., 2001). Estas tecnologias contornaram a problemática da alta demanda de investimentos, possibilitando novas abordagens para o sequenciamento (SHENDURE; JI, 2008).

A lógica usada nos programas para montar corretamente sequências de proteínas, também passou a ser utilizada para sequenciar DNA (HAGEN, 2000). Com o advento da internet e com o desenvolvimento de novos métodos de sequenciamento e programas computacionais, a biologia computacional foi ganhando força. Vários bancos de dados de nucleotídeos e proteínas foram criados, permitindo comparações funcionais e estruturais entre sequências. Projetos genoma, em especial o projeto genoma humano, também contribuíram para a criação, uso e popularização de novas ferramentas em bioinformática (KANEHISA; BORK, 2003).

No ano de 2009, quatro anos após o término do projeto do genoma humano, as plataformas de sequenciamento de nova geração foram lançadas. Desde então, estas ferramentas têm sido responsáveis por leituras de DNA cada vez mais precisas, maior cobertura de genomas, redução no tempo de corrida, trabalho e

custo de sequenciamentos (METZKER, 2010; LOMAN et al., 2012; EL-METWALLY et al., 2013).

As plataformas NGS apresentam como principal vantagem o alto volume de dados gerados por corrida, se comparadas ao método de Sanger, bem como são capazes de gerar em um dia, mais resultados do que centenas de sequenciadores do tipo capilar. Estas vantagens possibilitaram um crescimento significativo na quantidade de projetos de sequenciamento de genomas completos, principalmente para organismos procaríotos (HUSEMANN, 2011).

O principal fator limitante das plataformas NGS são os homopolímeros, ou seja, sequências repetitivas de um único nucleotídeo, as quais dificultam a leitura precisa destas regiões do DNA, resultando em altas taxas de erros de inserção e deleção de sequências (ROTHBERG et al., 2011). Obter recursos computacionais para armazenar e analisar os dados gerados e realizar montagens de genoma com pequenas leituras também são desafios que precisam ser superados pela bioinformática (METZKER, 2010).

Apesar das limitações, a utilização de plataformas NGS para sequenciamento de genomas completos vem auxiliando a microbiologia a aprofundar a compreensão sobre determinados microrganismos patogênicos, aspectos epidemiológicos de surtos, bem como auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos, entre outras diversas aplicações (LOMAN et al., 2012).

Atualmente, as tecnologias de sequenciamento de alta performance disponíveis possibilitam gerar um grande volume de dados, depositados diariamente em bancos de dados genômicos. As ferramentas de bioinformática estão cada vez mais presentes em pesquisas de diversas áreas, permitindo realizar inúmeras análises, entre as quais, o alinhamento e montagem de novo de genomas (GIACHETTO; HIGA, 2015).

Apesar de utilizar diferentes estratégias, os sequenciadores de nova geração realizam basicamente o processamento massivo de fragmentos de DNA. Entre as principais diferenças em relação à metodologia de Sanger, está a possibilidade de eliminar as etapas mais dispendiosas do primeiro método, que são a clonagem em vetores bacterianos e a eletroforese (CHEVREUX, 2004; SHENDURE; JI, 2008).

Além de acelerar o processo e diminuir o custo dos sequenciamentos, as metodologias de nova geração serviram como base para o desenvolvimento de outras linhas de pesquisa, como a identificação de polimorfismos, genômica,

metagenômica, transcriptômica, proteômica, entre outras (MARDIS, 2008; SHENDURE; JI, 2008).

Atualmente existem diferentes plataformas NGS disponíveis, as quais apresentam vantagens e desvantagens, de acordo com os objetivos e possibilidades de cada estudo. Entre as plataformas compactas, ou ainda “de bancada”, destaca-se a plataforma MiSeq, da empresa ILLUMINA (LIU et al., 2012).

A plataforma NGS Illumina MiSeq, utiliza a metodologia de sequenciamento por síntese de DNA. Esta metodologia representa uma opção simples e veloz para o sequenciamento de volumes intermediários de dados. Apesar de compacto, este sequenciador é versátil, permitindo realizar todas as etapas do processo, desde a amostra até a análise de dados, em apenas oito horas. O custo por corrida também pode ser considerado acessível, em comparação com outros sequenciadores. A MiSeq é ideal para o sequenciamento de pequenos genomas, de genes alvo ou amplicons, análises de metagenômica, expressão de genes alvo, entre outras aplicações (LIU et al., 2012).

O método de sequenciamento da Illumina utiliza basicamente o DNA a ser sequenciado, oligonucleotídeos iniciadores, enzimas e ddNTPs marcados (CARRARO; KITAJIMA, 2002). No processo, a fita dupla de DNA é convertida em fita simples, as quais se ligam a adaptadores fixados na placa (flowcell), sendo amplificadas clonalmente. Esta clonagem *in vitro* dos fragmentos ocorre por PCR em ponte (*bridge* PCR) ou PCR de fase sólida (lâmina de vidro), um dos diferenciais destes sequenciadores. Outra característica do método é utilizar nucleotídeos modificados com bloqueador reversível e radical fluorescente clivável (FEDURCO et al., 2006; TURCATTI et al., 2008).

No sequenciamento MiSeq, os fragmentos de DNA da amostra são ligados aos adaptadores, em ambas às extremidades. Desta forma, os fragmentos fixam-se à lâmina de sequenciamento por hibridação aos iniciadores. Após a etapa de amplificação, cada superfície de sequenciamento possui mais de 300 milhões de aglomerados (clusters) clonados paralelamente, cada um contendo cerca de 1000 cópias clonais de uma única molécula (BENTLEY, 2006).

A DNA polimerase utilizada para o sequenciamento foi modificada para permitir a incorporação dos nucleotídeos modificados. A incorporação destes nucleotídeos, por sua vez impede que novas bases sejam inseridas até que o terminador seja removido. Cada um dos quatro nucleotídeos marcados apresenta

com uma cor diferente (CARRARO; KITAJIMA, 2002). A leitura das cores em imagens de alta resolução, obtidas a cada passo de adição dos nucleotídeos, permitem deduzir a posição e a sequência molde de cada cluster (BENTLEY, 2006).

Apesar de apresentar mais erros que as plataformas baseadas em Sanger, a abordagem Illumina é mais eficaz no sequenciamento de trechos homopoliméricos que outras metodologias, como pirosequenciamento. Inicialmente a técnica Illumina apresentava capacidade de produzir e ler somente sequências mais curtas, de 36 pares de bases (pb). No entanto, atualmente é possível gerar até 15Gb de dados ou 25 milhões de leituras de até 2 X 300pb por corrida, na plataforma MiSeq (Illumina, 2017). O custo por pb gerado também pode chegar a mais de quatro ordens de magnitude menor se comparado com outras plataformas, o que vem permitindo pesquisas em diversas áreas (BENTLEY, 2006).

As plataformas Illumina vêm sendo utilizadas com vários objetivos em diferentes estudos, com microrganismos (CAPORASO et al., 2012), plantas (WANG et al., 2010; WEI et al., 2011; MIZRACHI et al., 2010), moluscos (WILLIAMS et al., 2014), mamíferos (THOMPSON et al., 2015) e humanos (KING et al., 2014; YI et al., 2014).

Após o sequenciamento é necessário montar e finalizar o genoma, ou seja, orientar e ordenar as leituras obtidas (MILLER et al., 2010). A montagem pode ser dividida em três etapas: análise de dados; montagem *de novo* e *scaffolding*. Durante a análise ou homogeneização de dados, é necessário converter os dados do sequenciamento para padrões utilizáveis pelos *softwares* de montagem. O formato FASTQ é comumente utilizado, pois apresenta as sequências de nucleotídeos e dados que permitem avaliar a qualidade do sequenciamento (RAMOS, 2011; AGUIAR, 2015).

Na etapa de montagem *de novo*, as sequências são sobrepostas com o objetivo de formar sequências contínuas (*contigs*). Os *softwares* de montagem *de novo* podem utilizar diferentes modelos de algoritmos, entre os quais se destacam: overlap-layout-consensus e grafo de Bruijn. Por fim, a etapa de *scaffolding* ou de finalização de montagem pode ser realizada a partir de um genoma referência (AGUIAR, 2015).

Após a obtenção do genoma, análises comparativas com ferramentas de bioinformática podem ampliar o conhecimento sobre o organismo em questão. Utilizar ferramentas de bioinformática para realizar análises comparativas entre

genomas do gênero ou de linhagens da mesma espécie é uma possível abordagem para obtenção destas informações (RICHARDS et al., 2011; AGUIAR, 2015).

A bioinformática permite trabalhar com alto volume de dados, porém a demanda de tempo e o custo são menores quando comparados com outras metodologias. Por conta disso, há uma tendência atual de realizar análises *in silico* antes da realização de estudos *in vivo* ou *in vitro* (AGUIAR, 2015).

A bioinformática tornou-se parte das pesquisas biomédicas, possuindo um papel fundamental na decodificação de dados genômicos, transcriptômicos e proteômicos gerados por várias metodologias recentes e tradicionais. Métodos têm sido desenvolvidos para analisar um grande número de genes ou proteínas simultaneamente. Com o sequenciamento dos genomas de vários organismos, disponibilizados em bancos de dados, as sequências de nucleotídeos e proteínas podem ser comparadas (KANEHISA; BORK, 2003). Análises comparativas podem ampliar a compreensão sobre as funções de genes, bem como de regiões não codificantes do genoma (KARLIN; CAMPBELL; MRÁZEK, 1998; ABBY; DAUBIN, 2007; AGUIAR, 2015).

As ferramentas de bioinformática se tornam cada vez mais relevantes em estudos de diversidade genética, permitindo compreender melhor a relação entre as patogenias e os genótipos (NAKIB et al., 2011). Assim, podemos afirmar que a bioinformática se tornou uma ferramenta fundamental nas pesquisas de biologia e saúde (PETREY; HONIG, 2014).

O sequenciamento de genomas bacterianos tem ampliado a compreensão sobre a diversidade, patogênese e resistência bacteriana, entre outros aspectos. Até o momento, foram realizados o sequenciamento, montagem e anotação do genoma completo de 53 cepas de *Enterococcus faecium*, isoladas de diversas fontes, principalmente do ambiente hospitalar, em diversos países (NCBI, 2018). Entretanto, apenas um isolado de origem brasileira está presente nas publicações referentes a estes sequenciamentos. O isolado brasileiro, *E. faecium* VRE16, foi obtido a partir de um *swab* retal de vigilância epidemiológica para VRE de um paciente internado na UTI de um hospital em Minas Gerais, Brasil. De acordo com o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, esta cepa foi classificada como multirresistente uma vez que apresentava resistência a altos níveis de vancomicina, teicoplanina, eritromicina, ampicilina, penicilina e estreptomicina (de MELLO et al., 2016).

Os genomas sequenciados de VRE apresentam em média o tamanho de 2,8 milhões de bases (megabases). Entre estas cepas, verificou-se desde a presença somente do cromossomo (em apenas 10% dos isolados), até seis plasmídeos, sendo que a maioria dos isolados apresenta dois a quatro plasmídeos (NCBI, 2018).

Em análise comparativa entre genomas de vários isolados de *E. faecium*, verificou-se a presença de elementos móveis e transposons exclusivos dos isolados hospitalares. Segundo os autores, estas características genéticas podem conferir vantagens seletivas para estes isolados clínicos. Neste estudo, a única bactéria brasileira analisada foi isolada de cateter vascular e apresentou resistência a nove de treze antibióticos testados (QIN et al., 2012).

Em estudo comparativo do primeiro genoma de *E. faecium* sequenciado, uma cepa isolada de sangue na Austrália, foi detectada a presença de fatores de virulência localizados no cromossoma, como proteína de superfície enterocócica, hemolisina e adesina de ligação ao colágeno. Também foram detectados três profagos e duas ilhas gênicas, ausentes em outros 22 genomas de *E. faecium* (LAM et al., 2012).

Análises de genomas de enterococos indicam que a maioria das cepas clínicas de *E. faecium* associadas a surtos pertencem a uma determinada linhagem genética predominante que circula pelos hospitais do mundo. Esta linhagem parece estar em um processo evolutivo que emergiu há 75 anos, simultaneamente com a introdução dos agentes antimicrobianos. Ainda, há evidências que esta linhagem teria evoluído a partir de cepas que habitavam animais, e não humanos. Estudos sugerem que ocorreu uma separação genômica em *E. faecium* há cerca de 3.000 anos, coincidentemente com o processo de urbanização e domesticação dos animais. Estes dados ajudam a remontar a história evolutiva dos enterococos, os quais tornaram-se relevantes patógenos hospitalares, a partir de comensais (KASPER et al., 2017).

Análises de genomas de *E. faecium* indicam que a diversidade genética está relacionada com sua capacidade de adquirir DNA exógeno e de mobilização de grandes regiões cromossômicas, resultando em recombinações genéticas (KASPER et al., 2017).

Neste trabalho realizou-se o sequenciamento do genoma total de *E. faecium*, isolado de urina de paciente internado na UTI de um hospital universitário de

Londrina, no sul do Brasil. Foi realizada montagem *de novo*, seguida de anotação funcional do genoma.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo analisar a formação de biofilme, sequenciar, montar e anotar o genoma de *Enterococcus faecium* (cepa 170) resistente à vancomicina, isolado a partir de infecção urinária de um paciente internado em um hospital universitário no sul do Brasil.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar a cinética de crescimento do isolado;
- Quantificar a produção de biomassa de biofilme do isolado;
- Avaliar a atividade metabólica do biofilme;
- Analisar a formação de biofilme por microscopia eletrônica de varredura;
- Realizar o sequenciamento do genoma;
- Realizar montagem *de novo* e anotação funcional do genoma;
- Realizar varredura do genoma para identificação de genes relacionados à formação de biofilme, fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos.

4 METODOLOGIA

4.1 Escolha e identificação do isolado

A cepa 170 de *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE_{fm}), obtido da coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Estadual de Londrina (UEL), foi escolhido para este trabalho. Esta cepa foi isolada de urina de uma paciente de quatro anos, internada na UTI do Hospital Universitário de Londrina, no ano de 2007. A identificação do isolado foi confirmada por meio de testes fenotípicos automatizados (Vitek, bioMérieux).

O isolado foi previamente caracterizado em estudo anterior (RUZON et al., 2010). A sua escolha para este trabalho justifica-se por apresentar, além de resistência a vários antimicrobianos, capacidade de aderir em células de mamífero e por ter sido considerado fortemente formador de biofilme. Ainda, genes associados com adesão e formação de biofilme também haviam sido verificados no isolado.

4.2 Cultivo

A bactéria foi cultivada a 37 °C por 20 horas em BHI (Brain Heart Infusion, Himedia, Brasil) ágar. Posteriormente, de 3 a 5 unidades formadoras de colônia (UFC) foram coletadas e transferidas para caldo BHI. Após incubação a 37 °C por 20 horas as bactérias foram lavadas duas vezes em 0,15 M tampão fosfato-salina (PBS), (pH 7,2, sem Ca²⁺ e Mg²⁺) e suspensas no mesmo tampão, ajustando a turbidez para 0,5 McFarland, utilizando o aparelho DensiCHECK™ PLUS (bioMérieux, Brasil), que corresponde a aproximadamente 1,0 a 2,0 x 10⁸ UFC/mL (suspensão bacteriana padrão).

4.3 Cinética de crescimento (curva de crescimento)

A bactéria foi cultivada em caldo BHI a 37°C. Em determinados intervalos de tempo (0, 1, 3, 8, 12, 18, 24 e 48 horas), 10 µL foram retirados e submetidos à diluição seriada (1:10) e posteriormente, transferidos para BHI ágar. Após crescimento a 37 °C por 24 horas foi realizada contagem das UFCs e o cálculo foi ajustado para obtenção dos valores de UFC/mL (ENDO, 2010).

4.4 Cinética de biofilme

A formação de biofilme foi avaliada por duas técnicas: método de coloração por cristal violeta e ensaio de redução de XTT. As bactérias foram submetidas à fase de adesão por diferentes intervalos de tempo, a 37°C, em microplacas de fundo chato (Techno Plastic Products, Suíça), contendo lâminas de poliestireno (área superficial de 0,5 cm², cortadas assepticamente), acondicionadas no fundo dos poços. Em todos os experimentos, poços contendo somente meio de cultura foram utilizados como controle de contaminação.

- **Coloração por Cristal Violeta:** os biofilmes formados foram lavados por duas vezes com 200 µL de PBS e após secagem a temperatura ambiente por 45 minutos, as células sésseis foram coradas com 110 µL de solução aquosa de cristal violeta 0,4% por 45 minutos, lavadas três vezes com água ultrapura esterilizada (200 µL) e descoradas com 200 µL de etanol 95% por 45 minutos, à temperatura ambiente. A solução descorante (100 µL) foi transferida para uma nova placa, a qual foi submetida à quantificação em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595nm, utilizando leitor de microplaca (Synergy™ HT, BioTek).

- **Ensaio de redução de XTT:** 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) foi realizado para analisar a atividade metabólica de células sésseis. Uma alíquota de 200 µL de XTT-menadione [0.5 mg/mL XTT, 1 mM menadiona (Sigma Chemical Co, USA)] foi adicionada em cada poço e as placas foram incubadas a 37°C, no escuro, por 90 minutos. O sobrenadante foi transferido para outra microplaca e a densidade óptica (OD) foi mensurada a 490nm utilizando leitor de microplaca (Synergy™ HT, BioTek).

Os experimentos foram realizados em quintuplicata, em duas ocasiões diferentes. Os valores de absorbância dos controles negativos foram subtraídos das amostras teste para normalização dos resultados (JIN et al., 2003).

Todos os parâmetros mencionados nesta metodologia foram padronizados previamente. Os gráficos de cinética de crescimento e de formação de biofilme foram construídos utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 6.0 (GRAPHPAD Software, San Diego, CA).

4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A estrutura do biofilme foi monitorada por MEV. Um inóculo de $3,0 \times 10^6$ UFC/mL em BHI caldo foi utilizado para formação de biofilme, em lâminas de vidro ou poliestireno, depositadas nos poços de microplacas de fundo chato. As placas contendo as lâminas foram incubadas 37°C por diferentes intervalos de tempo (1, 3, 12, 24 e 48 horas). Após incubação, as lâminas contendo os biofilmes formados foram transferidas para outra microplaca contendo 2% (v/v) de glutaraldeído e 2% (v/v) de tampão cacodilato a 0.1 M (pH 7.2), à temperatura ambiente. As amostras foram encaminhadas à central de microscopia da UEM (CMI-COMCAP/UEM), em temperatura ambiente. As amostras foram fixadas em 1% de tetróxido de ósmio por 2 horas. As células foram desidratadas por uma série de lavagens com etanol (30, 50, 70, 90 e 100%). Realizou-se secagem com CO₂ (BALCTED CPD 030 Critical Point Dryer) e revestimento com ouro (BALTEC SDC 050 Sputter Coater). As observações foram realizadas sob microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200 scanning electron microscope).

4.6 Sequenciamento, montagem e anotação do genoma do isolado

O DNA total do isolado foi extraído utilizando o GenElute™ Blood Genomic DNA Kit NA2010, segundo recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja, unidade de Londrina). O sequenciamento *shotgun* foi realizado utilizando a plataforma MiSeq, com o version 3 reagent kit (600-cycle, Illumina, Brazil), em estratégia paired-end 2x300. Os arquivos FASTQ foram montados *de novo* pelo pipeline A5-miseq, que realiza o ajuste de leitura, contenção, correção do desmonte e *scaffolds* finais. Os contigs montados obedeceram aos parâmetros padrões da plataforma computacional CLC Genomics Workbench versão 10.0 (CLC bio, Denmark – QIAGEN Bioinformatics). A anotação foi feita utilizando o algoritmo *Brujin graphs*, disponível na plataforma CLC bio. O arquivo contendo as sequências montadas foi submetido a alinhamento de sequências utilizando a ferramenta BLASTx. O mapeamento das sequências com alinhamento significativo foi obtido segundo a base de dados Gene Ontology, para determinar anotações funcionais, e submetidas para análise na base de dados KEGG, para determinar os possíveis mapas metabólicos associados aos Enzyme Codes presentes. O genoma foi comparado

com outros genomas de *Enterococcus*. Realizou-se varredura do genoma para identificação de supostos genes, relacionados à formação de biofilme, fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos, utilizando o serviço automatizado de anotação de genomas bacterianos RAST. Determinadas proteínas de interesse foram analisadas utilizando a ferramenta BLASTp. As ferramentas BLASTp, BLASTx e RAST são disponibilizadas pela página National Center for Biotechnology Information – NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

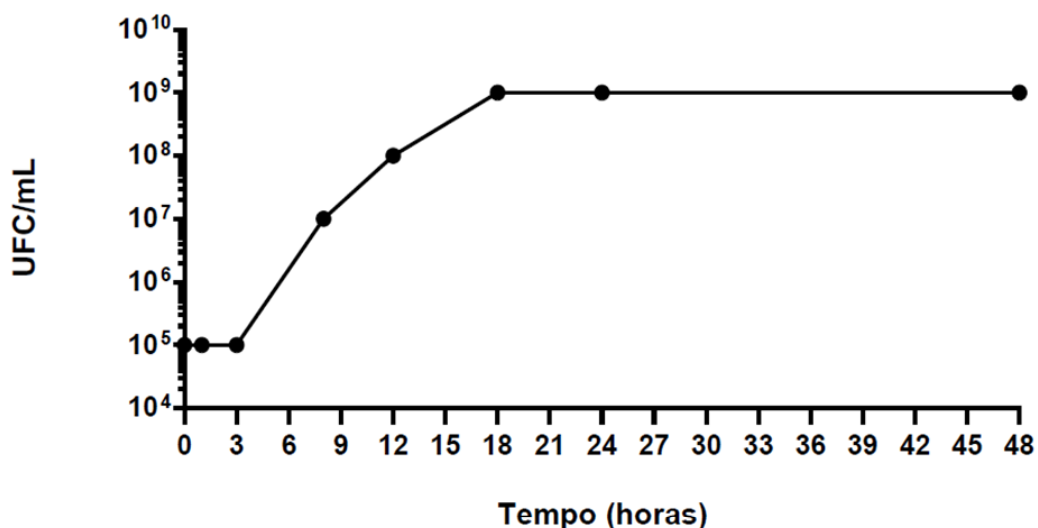
5.1 Formação de biofilme de *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina cepa 170

Curva de crescimento

Para compreender a dinâmica de crescimento do isolado e determinar os parâmetros dos demais experimentos com a cepa, foi realizada estimativa do número de células viáveis, por meio da contagem direta de UFC, em determinados intervalos de tempo. Os resultados foram reunidos em uma curva de crescimento (Figura 1).

O crescimento do isolado deu-se ao longo de 48 horas, sendo que os intervalos de tempo considerados para a determinação da curva foram de 0, 1, 3, 8, 12, 18, 24 e 48 horas. Entre os tempos zero e 1 hora não se observou crescimento, correspondendo à fase lag. No intervalo de 3 a 18 horas verificou-se crescimento exponencial, correspondendo à fase log. Nesta fase, o número estimado de UFC passou de 1×10^5 UFC/mL para 1×10^9 UFC/mL. Entre 18 e 48 horas, o número de UFC permaneceu praticamente inalterado, indicando o período da fase estacionária. Possivelmente o meio ofereceu condições para manter a cultura além do tempo analisado, não sendo observada a fase de declínio ou morte.

Figura 1: Curva de crescimento do isolado VREfm 170.



Em estudo DE formação de biofilme em aço inoxidável por *E. faecium*, isolados de alimentos, Andrade; Ajao; Zottola, (1998), observaram que após 24 horas de crescimento, a estimativa do número de células passou de aproximadamente 1×10^6 UFC/mL (inóculo inicial) para 1×10^9 UFC/mL.

Quantificação da biomassa e atividade metabólica do biofilme

O biofilme é caracterizado por células aderidas a um substrato (superfície ou tecido) e/ou entre si e embebidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares de sua própria produção. O biofilme confere aos microrganismos envolvidos proteção contra a resposta imune do hospedeiro e à terapia antimicrobiana (ATELA et al., 1997; CRUMP; COLLIGNON, 2000; RUPP et al., 2001; DANESE, 2002; DONLAN; COSTERTON, 2002).

Características de determinados materiais utilizados em hospitais pode aumentar a aderência de certas espécies bacterianas (LOCCI et al., 1981). O poliestireno é um polímero bastante utilizado no ambiente de assistência à saúde. Este polímero possui certas propriedades que o tornam passível de adesão bacteriana (CABEÇA, 2006). Superfícies como vidro e aço inoxidável podem ser contaminadas por microrganismos que, sob certas condições podem aderir e interagir com a superfície, iniciando crescimento celular e, conseqüentemente, formar biofilme (MARQUES et al., 2007).

A formação do biofilme bacteriano é um processo complexo, que envolve uma série de etapas. Inicialmente, ocorre a adesão das bactérias à determinada superfície e/ou tecido. Porém, esta adesão inicial ocorre de maneira fraca e reversível, por meio de forças de van der Waals e interações eletrostáticas. Nesta etapa o biofilme ainda pode ser facilmente removido, por simples lavagens (WIRTANEN et al., 2005).

Entre os tempos zero e 1 hora não foi verificado aumento significativo no número de UFC de células planctônicas. No entanto, no mesmo período já foi possível observar aumento na biomassa (Figura 2) e atividade metabólica (figura 3) das células sésseis, sobre o poliestireno. Neste período a densidade óptica (DO) passou de zero para 0,3. Este período compreende a fase de aderência inicial.

Verificou-se que, tanto a produção de biomassa quanto a atividade metabólica das células aderidas seguiu aumentando com o decorrer do tempo. No intervalo

entre os tempos três e 18 horas verificou-se crescimento exponencial, correspondendo à fase log da curva de crescimento. No mesmo período observou-se o acréscimo mais significativo na produção de biomassa, a qual aumentou mais de quatro vezes. Este resultado está de acordo com a curva de crescimento. Verificou-se ainda mais um acréscimo na produção de biomassa até o quinto tempo analisado, 24 horas. Já a atividade metabólica também seguiu aumentando, porém no período compreendido entre 3 horas e 12 horas.

Após a fase de aderência inicial, a adesão das células à superfície se torna irreversível, por meio de um material extracelular produzido pela bactéria, de natureza proteica ou polissacarídica, denominado de exopolissacarídeo (EPS). O EPS forma um complexo com o material da superfície e com receptores específicos dos microrganismos, localizados em fimbrias, flagelos ou *pili*, favorecendo a aderência ao peptidoglicano. As bactérias aderidas desta maneira são difíceis de remover, sendo necessária forte força mecânica, calor e/ou interrupção química da força de aderência, por meio de detergentes, enzimas, surfactantes ou desinfetantes (SINDE; CARBALLO, 2000).

Os maiores valores de atividade metabólica foram observados nos tempos 12 e 18 horas, apesar de ter sido verificada redução neste último tempo, seguido de mais uma redução às 24 horas de cultivo. Desta forma, os resultados indicam que possivelmente a maior produção de biofilme, ou sua maturação, ocorre no período compreendido entre três e 18 horas de cultivo.

Após o processo de adesão irreversível, inicia-se o processo de maturação do biofilme, marcado pelo início do crescimento e multiplicação bacteriana em biofilme. Para tanto, as células aderidas utilizam os nutrientes do ambiente nas proximidades das colônias, as quais seguem aumentando, até cobrir toda a superfície com camadas de células. Após a maturação, mais EPS é produzido pelas bactérias já aderidas. Desta forma, outras células seguem ancorando-se, enquanto a colônia torna-se cada vez mais protegida da flutuação do ambiente. Esta é a etapa de proteção do biofilme (CHARACKLIS; MARSHALL, 1990).

Entre os tempos de 18 e 48 horas da curva, o número de células permaneceu praticamente inalterado, indicando o período da fase estacionária. Possivelmente o meio ofereceu condições para manter a cultura além do tempo analisado, não sendo observada a fase de declínio ou morte. No entanto, verificou-se significativa redução na produção de biomassa às 48 horas de cultivo, bem como decréscimo, embora

mais gradativo, da atividade metabólica a partir das 18 horas, indicando que este período corresponde ao processo de dispersão. O processo de dispersão consiste no desprendimento espontâneo das bactérias do biofilme, como resultado de estresse na estrutura do biofilme (CHARACKLIS; MARSHALL, 1990; DALTON; GOODMAN; MARSHALL, 1996; PICIOREANU et al., 2000).

Figura 2: Biomassa de biofilme formado em poliestireno, produzido pelo isolado *VREfm* 170. Metodologia cristal violeta.

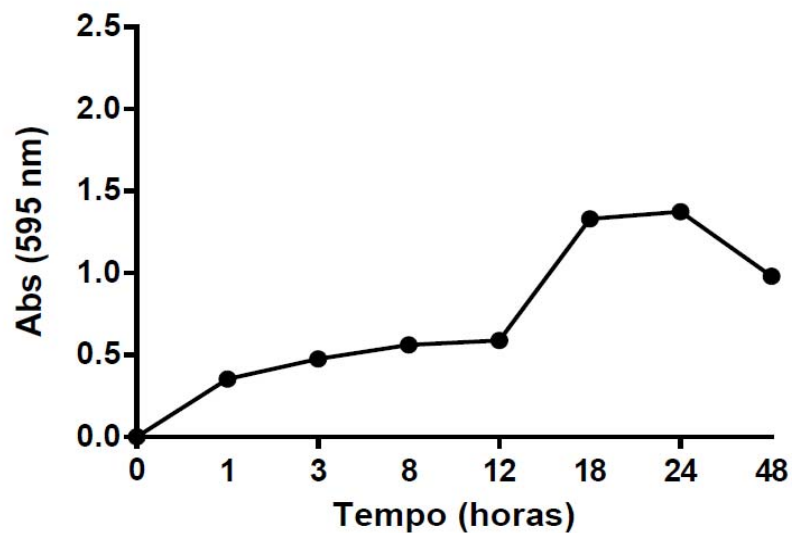
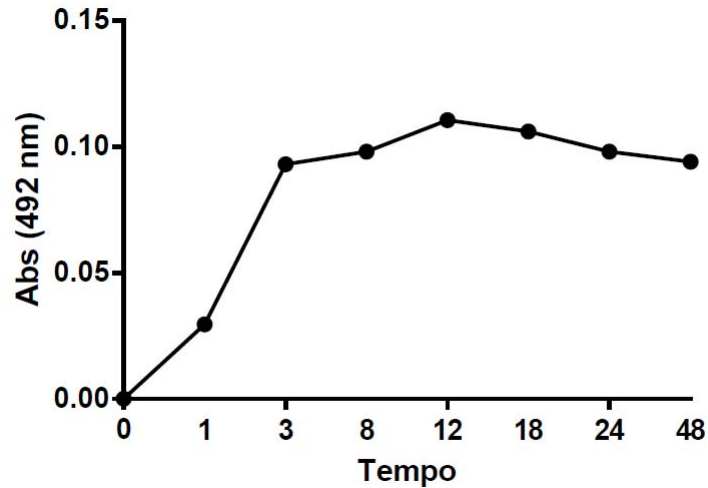


Figura 3: Atividade metabólica em biofilme produzido pelo isolado *VREfm* 170 poliestireno. Ensaio de redução de XTT.



Microscopia Eletrônica de Varredura

Estudos de microscopia eletrônica de transmissão e varredura mostram que a colonização de instrumentos médicos por microrganismos incrustados em uma matriz de biofilme é muito comum (RAAD, 1998). Neste estudo, as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura evidenciam aderência e crescimento do isolado em ambas as superfícies, poliestireno (Figura 4) e vidro (Figura 5). Observou-se aumento da densidade celular e alterações no agrupamento das células a partir do tempo 12 horas. As células apresentaram-se viáveis até o tempo de 48 horas. Os resultados para ambas as superfícies são semelhantes.

Figura 4: Morfologia de biofilme formado pelo isolado de *VREfm* 170, em superfície de **poliestireno**, analisado por MEV, aumento de 20000x, após: a) 1 hora; b) 3 horas; c) 12 horas; d) 24 horas; e) 48 horas.

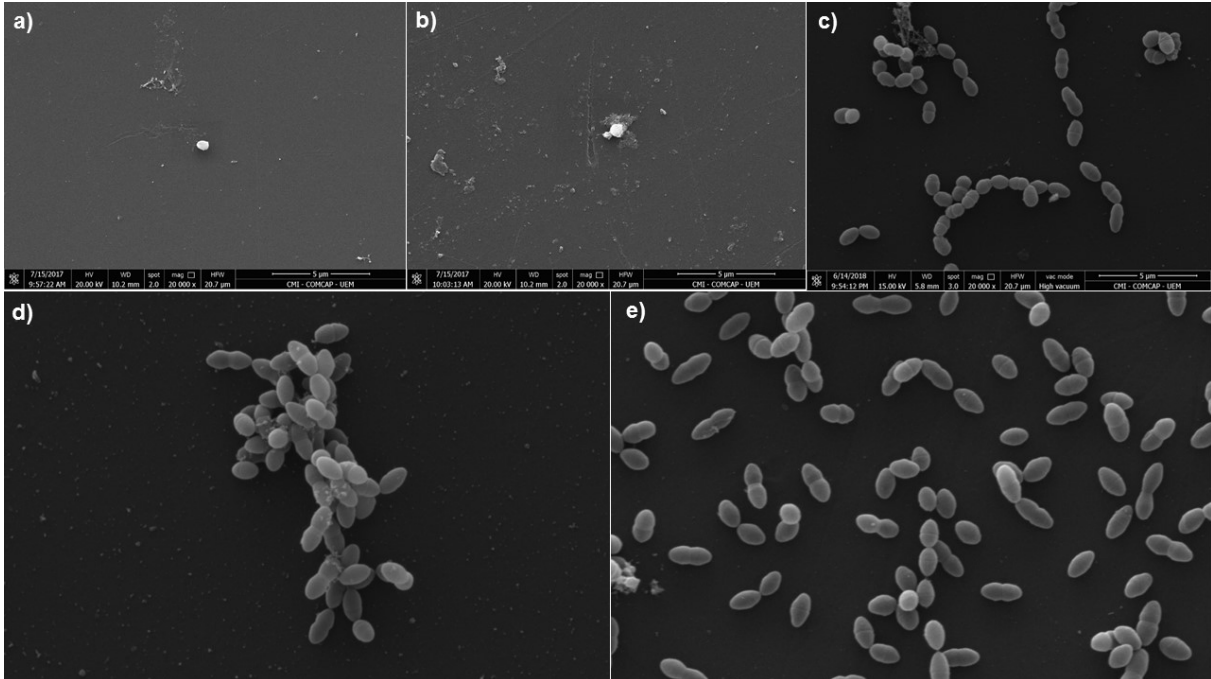
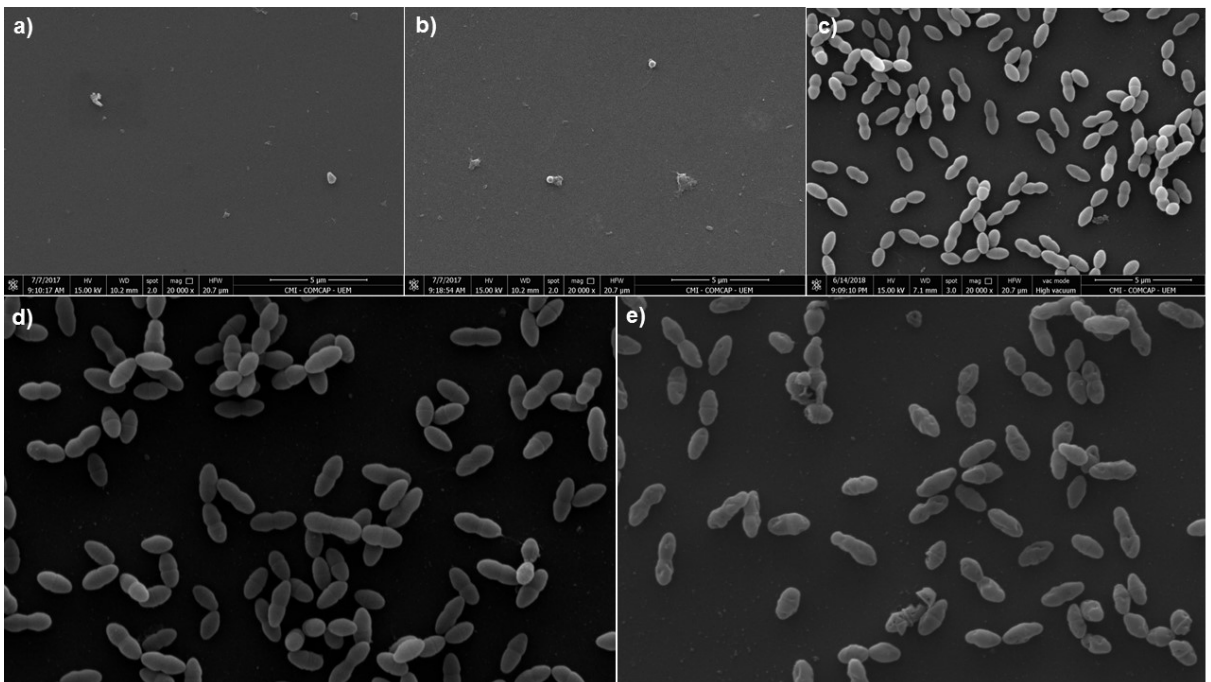


Figura 5: Morfologia de biofilme formado pelo isolado de *VREfm* 170, em superfície de **vidro**, analisado por MEV, aumento de 20000x, após: a) 1 hora; b) 3 horas; c) 12 horas; d) 24 horas; e) 48 horas.



5.2 Artigo científico

Genoma de *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina, isolado de infecção urinária.

Resumo: infecções enterocócicas causadas por cepas resistentes à vancomicina tornaram-se um grave problema de saúde mundial. O genoma completo do isolado analisado contém 3.040.378 pb, com 3.071 sequências codificadoras de DNA, entre as quais destacam-se genes relacionados com virulência, formação de biofilme, e resistência a vários antimicrobianos.

Enterococos fazem parte da microbiota humana (13), porém podem tornar-se patógenos oportunistas (14). Estão associados a várias doenças, especialmente infecções do trato urinário, endocardite e bacteremia (11). Acometem especialmente indivíduos submetidos a procedimentos médicos invasivos (7). *Enterococcus faecium* é um dos principais agentes de infecções hospitalares (15), possivelmente devido a sua capacidade de aquisição e disseminação de determinantes genéticos de virulência e resistência (16).

Vários genes que codificam fatores de virulência têm sido descritos em *E. faecium* (9). Entretanto, seus papéis na patogênese das infecções enterocócicas ainda não estão completamente esclarecidos (5). Destacam-se fatores relacionados à capacidade de formação de biofilme (8), e de resistência a vários antimicrobianos, inclusive à vancomicina (4;10), comuns em *E. faecium* (17). Consequentemente, as infecções enterocócicas estão relacionadas à alta morbidade e mortalidade (12). O sequenciamento do genoma de isolados clínicos permite conhecer seus genes e analisar suas funções nos processos biológicos (3), bem como ampliar a compreensão sobre a disseminação de determinantes genéticos entre microrganismos patogênicos endêmicos (2).

Neste trabalho realizamos o sequenciamento do genoma completo de uma cepa de *Enterococcus faecium*, resistente à vancomicina, fortemente formadora de biofilme, isolada de infecção urinária, na UTI do hospital universitário de Londrina, Paraná, Brasil. O isolado faz parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da Universidade Estadual de Londrina. O DNA total foi extraído utilizando o GenElute™ Blood Genomic DNA Kit NA2010,

segundo recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa soja, unidade de Londrina). Para tanto, foi utilizada a plataforma MiSeq, com o kit version 3 reagent kit (600-cycle, Illumina, Brazil), em estratégia paired-end 2x300. Após o sequenciamento, a qualidade das reads foi avaliada pela ferramenta FastQC (Fast Quality Control) para determinar o Phred Quality Scores (Q). Os contigs montados obedeceram aos parâmetros padrões da plataforma computacional CLC Genomics Workbench versão 10.0 (CLC bio, Denmark – QIAGEN Bioinformatics). A anotação de novo foi feita utilizando o algoritmo Bruijn graphs, disponível na plataforma CLC bio. O arquivo contendo as sequências montadas foi submetido a alinhamento de sequências utilizando a ferramenta BLASTx. O mapeamento das sequências com alinhamento significativo foi obtido segundo a base de dados Gene Ontology, para determinar anotações funcionais, e submetidas para análise na base de dados KEGG, para determinar os possíveis mapas metabólicos associados aos Enzyme Codes presentes. Após a montagem e anotação funcional dos genes, o genoma foi comparado com outros genomas de *Enterococcus*. Em seguida foi realizada varredura para identificação de supostos genes que codificam determinantes genéticos relacionados com fatores de virulência e que conferem resistência a antimicrobianos, utilizando o serviço automatizado de anotação de genomas bacterianos RAST (1). Determinadas proteínas de interesse foram analisadas utilizando a ferramenta BLASTp. O genoma foi estimado em 3.040.378 pb, com conteúdo de GC de 38%, e N50 de 37880. Conseguimos 3071 sequências codificadoras (CDSs), 2079 genes, 169 subsistemas e 85 RNAs.

Verificou-se no isolado, em estudos anteriores, resistência à ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina, teicoplanina e vancomicina, bem como capacidade de adesão e formação de biofilme em poliestireno (11;5) e vidro (ainda não publicado). Após análise do genoma, observou-se a ocorrência de genes relacionados com resistência a compostos tóxicos e antibióticos, tais como: eritromicina (*ermB*); estreptotricina (aminoglicosídeo-acetiltransferase); fluoroquinolonas; glicopeptídeos (*vanA*, *vanH*, *vanR*, *vanS*, *vanZ* e *vanX*); e amônio quaternário. Verificou-se ainda a presença de bombas de efluxo multidrogas, beta-lactamases, proteínas de ligação à penicilina e de multi-resistência.

Verificou-se no isolado a presença de determinantes genéticos relacionados com adesão e formação de biofilme, tais como os genes *acm*, *efafm* e *esp*, bem

como autoindutores de *quórum-sensing*, promotores de agregação e sortases. Destaca-se ainda no isolado a presença do gene regulador acessório (*agr*), relacionado com a patogenicidade em *Staphylococcus*, bem como a presença de genes que codificam proteínas associadas com evasão do sistema imune (*Leucine-rich protein*); com invasão de tecidos (hemolisina); com transferências genéticas (proteínas de capsídeos de fagos); e com a capacidade de causar peritonite e endocardite (serina-protease e sortases).

O sequenciamento do genoma deste isolado confirmou a presença de fatores relacionados com virulência e resistência, já verificados em estudos anteriores. Adicionalmente, foram observados novos determinantes genéticos provavelmente relacionados com a resistência da cepa e sua capacidade de causar infecções e formar biofilme, reforçando a sua importância enquanto patógeno nosocomial. Vale considerar que, apesar da relevância clínica de *E. faecium*, informações sobre seus determinantes genéticos de patogenicidade ainda são escassas. Desta forma, a comparação com genes e proteínas já identificados em outros organismos pode ampliar a compreensão sobre estes mecanismos.

Agradecimentos:

Agradecemos aos membros e laboratórios participantes dessa pesquisa. Ao laboratório da Professora Dra. Mariangela Hungria da Cunha EMBRAPA Soja/PR por ter realizado o sequenciamento da amostra. Ao Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da Universidade Estadual de Londrina pela montagem e análise dos fragmentos sequenciados. Agradecemos, aos órgãos de fomento, CNPQ e CAPES, pelo apoio financeiro a pesquisa.

REFERÊNCIAS:

1. AZIZ, RK; BARTELS, D; BEST, AA; DEJONGH, M; DISZ, T; EDWARDS, RA; FORMSMA, K; GERDES, S; GLASS, EM; KUBAL, M; MEYER, F; OLSEN, GJ; OLSON, R; OSTERMAN, AL; OVERBEEK, RA; MCNEIL, LK; PAARMANN, D; PACZIAN, T; PARRELLO, B; PUSCH, GD; REICH, C; STEVENS, R; VASSIEVA, O; VONSTEIN, V; WILKE, A; ZAGNITKO, O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9:75, 2008.
2. BENDER, JK; et al. Detection of a cfr (B) Variant in German *Enterococcus faecium* Clinical Isolates and the Impact on Linezolid Resistance in *Enterococcus* spp. *PloS one*, 11(11): 0167042, 2016.
3. DELAMUTA, JRM; RIBEIRO, RA; GOMES, DF; SOUZA, RC; CHUEIRE, LMO; HUNGRIA, M. Genome sequence of Bradyrhizobium embrapense strain CNPSo 2833T, isolated from a root nodule of Desmodium heterocarpon. *Brazilian journal of microbiology*, 48: 9–10, 2017.
4. FREITAS, MCS; et al. Prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus* fecal colonization among kidney transplant patients. *BMC infectious diseases*, 6(1):1, 2006.

5. GOMES, L; MOREY, AT; SANTOS, JP; CARDOSO, JD; OLIVEIRA, CF; PERUGINI, M; YAMAUCHI, LM; OGATTA, S. Commensal and environmental vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated in hospital settings: Genotypic diversity, antimicrobial resistance and virulence traits. *Indian J Med Microbiol*, 32:345-7, 2014.
6. MURRAY, BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N Engl J Med*, 342:710–721, 2000.
7. MURRAY, BE; WEINSTOCK, GM. *Enterococci*: new aspects of an old organism. *Proc Assoc Am Physicians*, 111:328–334, 1999.
8. NECIDOVA, L; STASTKOVA, Z; POSPISILOVA, M; JANSTOVA, B; STREJCEK, J; DUSKOVA, M; KARPISKOVA, R. Influence of soft cheese technology on the growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. *Czech J Food Sci*, 27:127–133, 2009.
9. PALAZZO, ICV; PITONDO-SILVA, A; LEVY, CE; DA COSTA DARINI, AL. Changes in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing outbreaks in Brazil. *J Hosp Infect*, 79:70–74, 2011.
10. RICE, EW; et al. Detection of intrinsic vancomycin resistant enterococci in animal and human feces. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 46(2):155-158, 2003.
11. RUZON, FI; PAULA, SB; KANOSHIKI, RL; SANTOS, JP; KERBAUY, G; KOBAYASHI, RKT; YAMAUCHI, LM; PERUGINI, MRE; YAMADA-OGATTA, SF. Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* vanA isolated from different sources at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. *J Microbiol*, 48:814–821, 2010.
12. SALGADO, CD; FARR, BM. Outcomes associated with vancomycin-resistant enterococci: a meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 24:690–698, 2003.
13. SGHIR, A; GRAMET, G; SUAU, A; VIOLAINE, R; POCHART, P; DORE, J. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 66:2263–2266, 2000.
14. SOOD, S; MALHOTRA, M; DAS, BK; KAPIL, A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian J Med Res*, 128:111-121, 2008.
15. TREITMAN, AN; YARNOLS, PR; WARREN, J; NOSKIN, GA. Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002). *J Clin Microbiol*, 43:462-463, 2005.
16. WILLEMS, RJL; BONTEN, MJM. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Curr Opin Infect Dis*, 20: 384-390, 2007.
17. WOODFORD, N; LIVERMORE, DM. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *J Infect*. 2009; 59(1): 4-16, 2009.

6 CONCLUSÕES

Os resultados da curva de crescimento permitiram identificar: uma fase de adaptação, sem crescimento (fase lag); uma fase de crescimento exponencial (fase log); e uma fase estacionária, sem acréscimo ou decréscimo significativo no número de células (contagem de UFCs).

Os resultados sugerem que o isolado é capaz de aderir à superfície de poliestireno rapidamente, desde o primeiro período analisado. A produção de biomassa (coloração com cristal violeta) e a atividade metabólica (redução de XTT) seguiram aumentando até o tempo 24 horas, e 12 horas, respectivamente. Nos tempos 12, 18 e 24 horas, foram verificados os maiores valores para ambas as técnicas. Desta forma, o período entre 12 e 24 horas possivelmente compreende a etapa de maior multiplicação microbiana e formação de biofilme. A redução da produção de biomassa e atividade metabólica no tempo 48 horas indica que este período corresponde ao processo de erosão ou perda de massa do biofilme. Portanto, verificou-se relação entre o tempo e a formação de biofilme.

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura revelaram que o isolado possui capacidade de aderência e crescimento em ambas as superfícies, poliestireno e vidro. Observou-se aumento da densidade celular e alterações no agrupamento das células a partir do tempo 12 horas. As células apresentaram-se viáveis até o tempo de 48 horas. Os resultados para ambas as superfícies são semelhantes.

O sequenciamento resultou em 2079 genes, dentre os quais, genes de resistência a vários antimicrobianos: eritromicina; estreptotricina; fluoroquinolonas; glicopeptídeos; e quaternário de amônio. Verificou-se ainda a presença de bombas de efluxo multidrogas, beta-lactamases, proteínas de ligação à penicilina e de multi-resistência.

Observou-se no isolado a presença de genes relacionados com adesão e formação de biofilme (*acm*, *efafm* e *esp*), autoindutores de *quorum-sensing*, promotores de agregação e sortases. Adicionalmente, genes relacionados com: patogenicidade em *Staphylococcus* (*agr*); evasão do sistema imune (*Leucine-rich protein*); invasão de tecidos (hemolisina); transferências genéticas (proteínas de capsídeos de fagos); e capacidade de causar infecções (serina-protease e sortases).

7 REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, FM. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: principles and limitations. **J Vet Med**, 51:380–388, 2004.
- ABBY, S; DAUBIN, V. Comparative genomics and the evolution of prokaryotes. **Trends Microbiol**, 15(3): 135-141, 2007.
- ADAL, KA; FARR, BM. Central venous catheter-related infections: a review. **Nutrition**, 12:208-213, 1996.
- AGUIAR, EL. Sequenciamento, montagem e anotação do genoma de *Streptococcus agalactiae* GBS85147: uma abordagem comparativa. 178 f. Dissertação (Mestrado em Bioinformática) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
- AL-AHDAL, MN; ABOZAID, SM; AL-SHAMMARY, HF; BOHOL, MF; AL-THAWADI, SI; AL-JABERI, AA; et al. Characterization of *Enterococcus faecium* isolates and first report of vanB phenotype–vanA genotype incongruence in the Middle East. **Eur J Clin Microbiol**, 31(11):3223–29, 2012.
- ALATORRE-FERNÁNDEZ, P; et al. A polyclonal outbreak of bloodstream infections by *Enterococcus faecium* in patients with hematologic malignancies. **Am J Infect Control**, 2016.
- AMINOV, RI; GARRIGUES-JEANJEAN; MACKIE, RI. Molecular Ecology of Tetracycline Resistance: Development and Validation of Primers for Detection of Tetracycline Resistance Genes Encoding Ribosomal Protection Proteins. **Appl Environ Microb**, 67(1):22-32, 2001.
- ANDRADE, NJ; AJAO, DB; ZOTTOLA, EA. Growth and adherence on stainless steel by *Enterococcus faecium* cells. **J Food Protect**, 61:1454-1458, 1998.
- ARIAS, CA; MURRAY, BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nat Rev Microbiol**, 10(4):266–78, 2012.
- ARIAS, CA; MURRAY, BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nat Rev Microbiol**, 10: 266-278, 2012.
- ARIAS, CA; PANESSO, D; SINGH, KV; RICE, LB; MURRAY, BE. Cotransfer of antibiotic resistance genes and a *hylEfm*-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. **Antimicrob Agents chemoter**, 53: 4240-4246, 2009.
- ATELA, I; COLL, P; RELLO, J; QUINTANA, E; BARRIO, J; MARCH, F; SANCHEZ, F; BARRAQUER, P; BALLÚS, J; COTURA, A; PRATS, G. Serial surveillance cultures of skin and catheter hub specimens from critically ill patients with central venous catheter: molecular epidemiology of infection and implications for clinical management and research. **J Clin Microbiol**, 35: 1784-1790, 1997.
- BALDASSARRI, L; CRETÌ, R; MONTANARO, L; OREFICI, G; ARCIOLA, CR. Pathogenesis of implant infections by enterococci. **Int J Artif Organs**, 28(11):1101-9, 2005.

BALLOUX, F; BRONSTAD BRYNILDSRUD, O; VAN DORP, L; SHAW, LP; CHEN, H; HARRIS, KA; WANG, H; ELDHOLM, V. From Theory to Practice: Translating Whole-Genome Sequencing (WGS) into the Clinic. **Trends Microbiol**, S0966-842X(18):30176-8, 2018.

BATISTA, MDC. SIMBA: uma ferramenta Web para gerenciamento de montagens de genomas bacterianos. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Bioinformática da UFMG. Belo Horizonte (MG), 2015.

BAZET, C; et al. Enterococos resistentes a vancomicina: un problema emergente en Uruguay. **Revista Médica del Uruguay**, 21(2):151-158, 2005.

BEGLEY, M; HILL, C; GAHAN, CG. Bile salt hydrolase activity in probiotics. **Appl Environ Microb**, 72:1729–1738, 2006.

BENDER, JK; et al. Detection of a cfr (B) Variant in German *Enterococcus faecium* Clinical Isolates and the Impact on Linezolid Resistance in *Enterococcus* spp. **Plos One**, 11(11): 0167042, 2016.

BENTLEY, DR. Whole-genome re-sequencing. **Curr Opin Genet Dev**, 16: 545-552, 2006.

BIAVASCO, F; FOGLIA, G; PAOLETTI, C; ZANDRI, G; MAGI, G; GUAGLIANONE, E; SUNDSFJORD, A; PRUZZO, C; DONELLI, G; FACINELLI, B. VanA-type enterococci from humans, animals, and food: species distribution, population structure, Tn1546 typing and location, and virulence determinants. **Appl Environ Microb**, 73:3307-3319, 2007.

BIEDENBACH, DJ; BELL, JM; SADER, HS; FRITSCH, TR; JONES, RN; TURNIDGE, JD. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacterial isolates from the Asia-Pacific region and an in vitro evaluation of the bactericidal activity of daptomycin, vancomycin, and teicoplanin: a SENTRY Program Report (2003-2004). **Int J Antimicrob Agents**, 30:143-149, 2007.

BILLSTROM, H; LUND, B; SULLIVAN, A; NORD, CE. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. **Int J Antimicrob Agents**, 32:374–377, 2008.

BLASCHITZ, M; LEPUSCHITZ, S; WAGNER, L; ALLERBERGER, F; INDRA, A; RUPPITSCH, W; HUHULESCU, S. Draft genome sequence of a vancomycin-resistant and vancomycin-dependent *Enterococcus faecium* isolate. **Genome Announc**, 4(2):e00059-16, 2016.

BONTEN, MJ; WILLEMS, R; WEINSTEIN, RA. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? **Lancet Infect Dis**, 1:314-325, 2001.

BOUCHER, HW; TALBOT, GH; BRADLEY, JS; EDWARDS, JE; GILBERT, D; RICE, LB; SCHELD, M; SPELLBERG, B; BARTLETT, J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, 48:1–12, 2009.

BRILLIANTOVA, AN; KLJASOVA, GA; MIRANOVA, AV; TISHKOV, VI; NOVICHKOVA, GA; BOBRYNINA, VO; SIDORENKO, SV. Spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in two haematological centres in Russia. **Int J Antimicrob Agents**, 35:177-181, 2010.

BRINSTER, S; FURLAN, S; SERROR, P. C-terminal WxL domain mediates cell wall binding in *Enterococcus faecalis* and other gram-positive bacteria. **J Bacteriol**, 189:1244-1253, 2007.

BROOKS, GF; et al. Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg. 26 ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

BYERS, KE; ANGLIMM, AM; ANNESKI, CJ; FARR, BM. Duration of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus*. **Infect Cont Hosp Epidemiol**, 23(4):207-211, 2002.

CABEÇA, TK. Suscetibilidade de microrganismos relacionados com a contaminação de alimentos em biofilme artificial e em suspensão frente a desinfetantes. 105 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2006.

CAMARGO, ILBC; GILMORE, MS; DARINI, ALC. Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin resistant and vancomycin sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brazil. **Clin Microbiol Infec**, 12:1123–30, 2006.

CAPORASO, JG; et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME J**, 6(8): 1621-1624, 2012.

CARRARO, DM; KITAJIMA, JP. Sequenciamento e Bioinformática de Genomas Bacterianos. **Biotecnol Cienc Des**, 28:16-20, 2002.

CASCIOFERRO, S; TOTSIKA, M; SCHILLACI, D. Sortase A: an ideal target for anti-virulence drug development. **Microb Pathogenesis**, 77:105–112, 2014.

CASSENEGO, APV. Avaliação da colonização e resistência antimicrobiana de *Enterococcus* spp. isolados de “swabs” cloacais de frango de corte. 2010. 89f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CASTANHEIRA, M; SADER, HS; DESHPANDE, LM; FRITSCHKE, TR; JONES, RN. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrob Agents chemoter**, 52:570-3, 2008.

CDC: Centers for Disease Control and Prevention, Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. **Infect Cont Hosp Epidemiol**, 16:105-113, 1995.

CETINKAYA, Y; FALK, P; MAYHALL, CG. Vancomycin-resistant enterococci. **Clin Microbiol Rev**,13:686-707, 2000.

CHAN, MS; JOLLEY, K. *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus* GBS) MLST Database. Disponível em: <<https://pubmlst.org/sagalactiae/>>. Acesso em: julho de 2018.

CHANG, CM; et al. Characterization of vancomycin-resistant enterococci from hospitalised patients at a tertiary centre over a seven-year period. **J Hosp Infect**, 74:377–384, 2010.

CHARACKLIS, WG; MARSHALL, KC. In Biofilms. CHARACKLIS, WG and MARSHALL, KC; editor (eds). New York, NY, USA: Wiley, 1990.

CHENOWETH, C; SCHABERG, D. The epidemiology of enterococci. **Microbiol Infect Dis**, 9:80–89, 1990.

CHEVREUX, B; PFISTERER, T; DRESCHER, B; DRIESEL, AJ; MÜLLER, WEG; WETTER, T; SUHAI, S. Using the mira EST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. **Genome Res**, 14(6):1147–1159, 2004.

CLEWELL, DB. Sex pheromones and the plasmid encoded mating response in *Enterococcus faecalis*. In: Bacterial Conjugation. **New York: Plenum Press**, 349–367, 1993.

COOMBS, GW; DALEY, DA; THIN LEE, Y; PANG; PEARSON, JC; ROBINSON, JO; JOHNSON, PD; KOTSANAS, D; BELL, JM; TURNIDGE, JD; and Australian Group on Antimicrobial Resistance. Australian Group on Antimicrobial Resistance Australian Enterococcal Sepsis Outcome Programme annual report, 2014. **Commun Dis Intell Q Rep**, 40:E236-243, 2016.

CORTES-PEREZ, NG; DUMOULIN, R; GAUBERT, S; LACOUX, C; BUGLI, F; MARTIN, R; CHAT, S; PIQUAND, K, MEYLHEUC, T; LANGELLA, P; SANGUINETTI, M; BRUNELLA, P; RIGOTTIER-GOIS, L; CORTES-PEREZ, PSNG; et al. Overexpression of *Enterococcus faecalis* elr operon protects from phagocytosis. **BMC microbiol**, 15:112, 2015.

COSTERTON, JW; LEWANDOWSKI, Z; CALDWELL, DE; KORBER, DR; LAPPIN-SCOTT, HM. Microbial biofilms. **Annu Rev Microbiol**, 49(1):711–745, 1995.

COURVALIN, P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. **Clin Infect Dis**, 42(1):S25-S34, 2006.

CRUMP, JA; COLLIGNON, PJ. Intravascular catheter-associated infections. **Eur J Clin Microbiol**, 19:1-8, 2000.

DAHLEN, G; et al. Virulence factors and antibiotic susceptibility in enterococci isolated from oral mucosal and deep infections. **J Oral Microbiol**, 4, 2012.

DALLA COSTA, LM; REYNOLDS, PE; SOUZA, HAPHM; SOUZA, DC; PALEPOU, MFI; WOODFORD, N. Characterization of a Divergent vanD-Type Resistance

Element from the First Glycopeptide-Resistant Strain of *Enterococcus faecium* Isolated in Brazil. **Antimicrob Agents Chemot**, 44(123):444–3446, 2000.

DALLA COSTA, LM; SOUZA, DC; MARTINS, LT; ZANELLA, RC; BRANDILONE, MC; BOKERMANN, S; SADER, HS; SOUZA, HA. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: First Case in Brazil. **Braz J Infect Dis**, 2(3):160-163, 1998.

DALLA COSTA, LM; SOUZA, DC; MARTINS, LT; ZANELLA, RC; BRANDILONE, MC; BOKERMANN, S; SADER, HS; SOUZA, HA. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: First Case in Brazil. **Braz J Infect Dis**, 2:160-163, 1998.

DALTON, HM; GOODMAN, AE; MARSHALL, KC. Diversity in surface colonization behavior in marine bacteria. **J Ind Microbiol**, 17(3-4):228-234, 1996.

DANESE, PN. Antibiofilm approaches: prevention of catheter colonization. **Chem Biol**, 9:873-880, 2002.

D'AZEVEDO, PA; et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant Enterococci strains eight years apart from its first isolation in São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop SP**, 50(4):195-198, 2008.

DE KRAKER, ME; JARLIER, V; MONEN, JC; HEUER, OE; VAN DE SANDE, N; GRUNDMANN, H. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. **Clin Microbiol Infect**, 19:860-868, 2013.

DE MELLO, SS; VAN TYNE, D; DABUL, ANG; GILMORE, MS; CAMARGO, ILBC. High-quality draft genome sequence of the multidrug-resistant clinical isolate *Enterococcus faecium* VRE16. **Genome Announc**, 4(5):e00992-16, 2016.

DE PAEPE, M; GABORIAU-ROUTHIAU, V; RAINTEAU, D; RAKOTOBE, S; TADDEI, F; CERF-BENSUSSAN, N. Trade-off between bile resistance and nutritional competence drives *Escherichia coli* diversification in the mouse gut. **PLoS Genet**, 7(6):e1002107, 2011.

DELAMUTA, JRM; RIBEIRO, RA; GOMES, DF; SOUZA, RC; CHUEIRE, LMO; HUNGRIA, M. Genome sequence of Bradyrhizobium embrapense strain CNPSo 2833T, isolated from a root nodule of *Desmodium heterocarpon*. **Braz J Microbiol**, 4(8):9–10, 2017.

DESHPANDE, LM; et al. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Diagn Micr Infec Dis**, 58:163-170, 2007.

DI CICCIO, P; VERGARA, A; FESTINO, AR; PALUDI, D; ZANARDIA, E; GHIDINIA, S; IANIERI, A. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food Control**, 50:930–936, 2015.

DIAGRAMADOS, CA; ZIMMER, SM; KLEIN, M; JERNIGAN, JA. Comparison of mortality associated with vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible

enterococcal bloodstream infections: a meta-analysis. **Clin Infect Dis**, 41:327–333, 2005.

DOERNBERG, SB; LODISE, TP; THADEN, JT; MUNITA, JM; COSGROVE, SE; ARIAS, CA; BOUCHER, HW; COREY, GR; LOWY, FD; MURRAY, B; MILLER, LG; HOLLAND, TL. Gram-Positive Committee of the Antibacterial Resistance Leadership Group (ARLG). Gram-Positive Bacterial Infections: Research Priorities, Accomplishments, and Future Directions of the Antibacterial Resistance Leadership Group. **Clin Infect Dis**, 64(suppl1):S24-S29, 2017.

DONLAN, RM. Biofilms and device-associated infections. **Emerg Infect Dis**, 7:277–281, 2001.

DONLAN, RM; COSTERTON, JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, 15(2):167-193, 2002.

DUEHOLM, MS; PETERSEN, SV; SONDERKAER, M; LARSEN, P; CHRISTIANSEN, G; HEIN, KL; ENGHILD, JJ; NIELSEN, JL; NIELSEN, KL; NIELSEN, PH; et al. Functional amyloid in *Pseudomonas*. **Mol Microbiol**, 77:1009–1020, 2010.

DUMOULIN, R; CORTES - PEREZ, N; GAUBERT, S; DUHUTREL, P; BRINSTER, S; TORELLI, R; SANGUINETTI, M; POSTERARO, B; REPOILA, F; SERROR, P. The enterococcal Rgg - like regulator ElrR activates expression of the elrA operon. **J Bacteriol**, 195:3073–3083, 2013.

EATON, TJ; GASSON, MJ. A variant enterococcal surface protein Esp(fm) in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. **FEMS Microbiol Lett**, 216:269-275, 2002.

EL-METWALLY, S; HAMZA, T; ZAKARIA, M; HELMY, M. Next-generation sequence assembly: four stages of data processing and computational challenges. **PLoS Comput Biol**, 9:e1003345, 2013.

ELSNER, HA; SOBOTTKA, I; MACK, D; CLAUSSEN, M; LAUFS, R; WIRTH, R. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 19:39–42, 2000.

ENDO, EH; et al. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Res Microbiol**, 161(7):534-40, 2010.

ESTELLER, A. Physiology of bile secretion. **World J Gastroenterol**, 14(37):5641–5649, 2008.

FABRETTI, F; HUEBNER, J. Implant infections due to enterococci: role of capsular polysaccharides and biofilm. **Int J Artif Organs**, 28(11):1079-90, 2005.

FACKLAM, RR; CARVALHO, MGS; TEIXEIRA, LM. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci, 1-54, 2002. In GILMORE, MS; CLEWELL, DB; COURVALIN, P; DUNNY, GM. MURRAY, BE; RICE,

LB (ed.), The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. **American Society for Microbiology**, 2002.

FEDURCO, M; et al. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. **Nucleic Acids Res**, 34(3):22, 2006.

FEIL, EJ; et al. eBurst: inferring patterns of evolutionary descent among cluster of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. **J bacteriol**, 186(5):1518-1530, 2004.

FITCH, WM. Book review of DAYHOFF, MO. Atlas of Protein Sequence and Structure. **Syst Zool**, 22:196, 1972.

FLEISCHMANN, RD; ADAMS, MD; WHITE, O; CLAYTON, RA; KIRKNESS, EF; KERLAVAGE, AR; BULT, CJ; TOMB, JF; DOUGHERTY, BA; MERRICK, JM; et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* rd. **Science**, 269(5223):496–512, 1995.

FLEMMING, HC; NEU, TR; WOZNIAK, D. The EPS matrix: the “House of biofilm cells”. **J Bacteriol**, 189:7945 – 7947, 2007.

FOCHTMANN-FRANA, A; FREYSTÄTTER, C; VORSTANDLECHNER, V; BARTH, A; BOLLIGER, M; PRESTERL, E; IHRA, G; MUSCHITZ, G; MITTLBOECK, M; MAKRISTATHIS, A; RATH, T; RADTKE, C; FORSTNER, C. Incidence of risk factors for bloodstream infections in patients with major burns receiving intensive care: A retrospective single-center cohort study. **Burns**, 44(4):784-792, 2018.

FOSTER, TJ; HOOK, M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol**, 6:484-488, 1998.

FREITAS, AR; TEDIUM, C; NOVAIS, P; RUIZ-GARBAJOSA, G; WERNER, JA; LAVERDE-GOMEZ, et al. Global spread of the *hylEfm* colonization-virulence gene in megaplasmids of the *Enterococcus faecium* CC17 polyclonal subcluster. **Antimicrob Agents chemoter**, 45: 2660-2665, 2010.

FREITAS, MCS; et al. Prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus* fecal colonization among kidney transplant patients. **BMC Infect Dis**, 6(1):1, 2006.

FRIEDEN, TR; MUNSIF, SS; LOW, DE; ET AL. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in New York City. **Lancet**, 342:76–79, 1993.

FURTADO, GHC; MARTINS, ST; COUTINHO, AP; SOARES, GMM; WEY, SB; MEDEIROS, EAS. Incidência de *Enterococcus* resistente à vancomicina em hospital universitário no Brasil. **Rev Saude Publ**, 38(1):41-46, 2005.

GALLOWAY-PEÑA, JR; NALLAPAREDDY, SR; ARIAS, CA; ELIOPOULOS, GM; MURRAY, BE. Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. **J Infect Dis**, 200:1566–1573, 2009.

GAMA, BA. Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência de *Enterococcus* spp. Dissertação de Mestrado em Ciências, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 73p, 2008.

GAMBAROTTO, K; PLOY, MC; TURLURE, P; GRELAUD, C; MARTIN, C; BORDESSOULE, D; DENIS, F. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and nonhospitalized controls in a cattle-rearing area of France. **J Clin Microbiol**, 38:620–624, 2000.

GARCIA-HERNANDEZ, M; BERARDINI, TZ; CHEN, G; CRIST, D; DOYLE, A; HUALA, E; KNEE, E; LAMBRECHT, M; MILLER, N; MUELLER, LA; MUNDONI, S; REISER, L; RHEE, SY; SCHOLL, R; TACKLIND, J; WEEMS, DC; WU, Y; XU, I; YOON, D; ZHANG, P. TAIR: a resource for integrated Arabidopsis data. **Funct Integr Genomics**, 2:239–253, 2002.

GIACHETTO, PF; HIGA, RH. Bioinformática Aplicada na Agricultura. In: Embrapa Informática Agropecuária, Capítulo em livro técnico-científico. Capítulo 4, parte II, 2015.

GILMORE, KS; SRINIVAS, P; AKINS, DR; HATTER, KL; GILMORE, MS. Growth, development, and gene expression in a persistent *Streptococcus gordonii* biofilm. **Infect Immun**, 71:4759–4766, 2003.

GILMORE, MS. Enterococcal Virulence. In. GILMORE, MS. The Enterococci — Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance. **ASM Press**, 2002.

GOMES, L; MOREY, AT; SANTOS, JP; CARDOSO, JD; OLIVEIRA, CF; PERUGINI, M; YAMAUCHI, LM; OGATTA, S. Commensal and environmental vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated in hospital settings: Genotypic diversity, antimicrobial resistance and virulence traits. **Indian J Med Microbiol**, 32:345-7, 2014.

GOULD, CV; et al. Chloramphenicol resistance in vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: impact of prior fluoroquinolone use. **Infect Cont Hosp Epidemiol**, 25(02):138-145, 2004.

GRAYSON, ML; ELIOPOULOS, GM; WENNERSTEN, CB; et al. Increasing resistance to beta-lactam antibiotics among clinical isolates of *Enterococcus faecium*: a 22-year review at one institution. **Antimicrob Agents chemoter**, 35:2180–2184, 1991.

GRISTINA, AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. **Science**, 237:1588-1595, 1987.

GUZMAN, CA; PRUZZO, C; LIPIRA, G; CALEGARI, L. Role of adherence in pathogenesis of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection and endocarditis. **Infect Immun**, 57:1834–1838, 1989.

GUZMAN PRIETO, AM; VAN SCHAİK, W; ROGERS, MRC; COQUE, TM; BAQUERO, F; CORANDER, J; et al. Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: attack to the clones? **Front. Microbiol**, 7:788, 2016.

HAGEN, JB. The origins of bioinformatics. **Nat Rev Genet**, 1:231-236, 2000.

HALL, T. BioEdit: Biological sequence alignment editor for Win95/98/NT/2K/XP [Online], 2007. Acesso em 21 de junho de 2018, disponível em: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.

HALLGREN, A; CLAEISSON, C; SAEEDI, B; MONSTEIN, HJ; HANBERGER, H; NILSSON, LE. Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. **Int J Med Microbiol**, 299:323–332, 2009.

HAMADI, F; ASSERNE, F; ELABED, S; BENSOUA, S; MABROUKI, M; LATRACHE, H. Adhesion of *Staphylococcus aureus* on stainless steel treated with three types of milk. **Food Control**, 38:104–108, 2014.

HANG, W; MI, Z; YIN, X; FAN, H; AN, X; ZHANG, Z; et al. Characterization of *Enterococcus faecalis* Phage IME-EF1 and Its Endolysin. **PLoS ONE**, 8(11): e80435, 2013.

HANNIG, C; FOLLO, M; HELLWIG, E; AL-AHMAD, A. Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. **J Med Microbiol**, 59(1):1–7, 2010.

HARE, RF. *Francisella novicida* Pathogenicity Island Encoded Proteins Were Secreted during Infection of Macrophage-Like Cells. **PLoS ONE**, 9(8): e105773, 2014.

HAYDEN, MK. Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant enterococci. **Clin Infect Dis**, 31(4):1058–1065, 2000.

HEIKENS, E; BONTEN, MJ; WILLEMS, RJ. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. **J Bacteriol**, 189:8233–8240, 2007.

HEIKENS, E; LEENDERTSE, M; WIJNANDS, LM; VAN LUIT-ASBROEK, M; BONTEN, MJ; VAN DER POLL, T; WILLEMS, RJ. Enterococcal surface protein Esp is not essential for cell adhesion and intestinal colonization of *Enterococcus faecium* in mice. **BMC Microbiol**, 29:9:19, 2009.

HIDRON, AI; EDWARDS, JR; PATEL, J; HORAN, TC; SIEVERT, DM; POLLOCK, DA; FRIDKIN, SK; National Healthcare Safety Network Team; Participating National Healthcare Safety Network Facilities. NHSN annual update: 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. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 29:996-1011, 2008.

HIDRON, AI; 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. **Infect Cont Hosp Epidemiol**, 29(11):996-1011, 2008.

HOFMANN, AF; HAGEY, LR. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. **Cell Mol Life Sci**, 65(16):2461–2483, 2008.

HOLLENBECK, BL; RICE, LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. **Virulence**, 3(5):421-569, 2012.

HORNER, R; et al. Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. **J Bras Patol Med Lab**, 41(6):391-5, 2005.

HOSHUYAMA, T; MORIGUCHI, H; MURATANI, T; MATSUMOTO, T. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) outbreak at a university hospital in Kitakyushu, Japan: case-control studies. **J Infect Chemother**, 14:354–360, 2008.

HUANG, XC; QUESADA, MA; MATHIES, RA. DNA sequencing using capillary array electrophoresis. **Anal Chem**, 64:2149–2154, 1992.

HUSEMANN, P. Bioinformatic Approaches for Genome Finishing. Tese (Doutorado) — Bielefeld University, Germany, 2011.

IWEN, PC; KELLY, DM; LINDER, J; HINRICHS, SH; DOMINGUEZ, EA; RUPP, ME; PATIL, KD. Change in prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from blood cultures over an 8-year period. **Antimicrob Agents chemoter**, 41:494–495, 1997.

IZANO, EA; AMARANTE, MA; KHER, WB; KAPLAN, JB. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Appl Environ Microbiol**, 74:470-476, 2008.

JENSEN, LB; et al. Streptogramin resistance among *Enterococcus faecium* isolated from production animals in Denmark in 1997. **Microbial Drug Resistance**, 8(4):369-374, 2002.

JIN, Y; YIP, HK; SAMARANAYAKE, YH; YAU, JY; SAMARANAYAKE, LP. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. **J Clin Microbiol**, 41:2961-2967, 2003.

JOHNSON, AP. The pathogenicity of enterococci. **J Antimicrob Chemoth**, 33:1083–1089, 1994.

JONES, N; OHNSACK, JF; TAKAHASHI, S; OLIVER, KA; CHAN, MS; KUNST, F; et al. Multilocus sequence typing system for group B *Streptococcus*. **J Clin Microbiol**, 41:2530–2536, 2003.

JOYANES, P; PASCUAL, A; MARTINEZ-MARTINEZ, L; HEVIA, A; PEREA, EJ. In vitro adherence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* to urinary catheters. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 19:124–127, 2000.

KAFIL, HS; MOBAREZ, AM. Assessment of biofilm formation by enterococci isolates from urinary tract infections with different virulence profiles. **Journal of King Saud University-Science**, 27(4):312-317, 2015.

KANEHISA, M; BORK, P. Bioinformatics in post-sequencing era. **Nature Genetics**, 33:305-310, 2003.

KARLIN, S; CAMPBELL, AM; MRAZEK, J. Comparative DNA analysis across diverse genomes. **Annu Rev Genet**, 32:185-22, 1998.

KASPER, DL; et al. Harrison Medicina Interna. v.1, 19 ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2017.

KERBAUY, G; PERUGINI, MRE; YAMAUCHI, LM; YAMADA-OGATTA, SF. Vancomycin dependent *Enterococcus faecium* vanA: characterization of the first case isolated in a university hospital in Brazil. **Braz J Med Biol Res**, 44(3):253-257, 2011.

KHACHATRYAN, AR; HANCOCK, DD; BESSER, TE; et al. Role of calf-adapted *Escherichia coli* in maintenance of antimicrobial drug resistance in dairy calves. **Appl Environ Microbiol**, 70:752-757, 2004.

KHAN, S; SUNG, K; MARASA, B; MIN, S; KWEON, O; NAWAZ, M; CERNIGLIA, C. Draft Genome Sequence of Multidrug-Resistant *Enterococcus faecium* clinical Isolate VRE3, with a Sequence Type 16 Pattern and Novel Structural Arrangement of Tn1546. **Genome Announc**, 3(4): e00871-15, 2015.

KLIBI, N; SLIMEN, NB; IMEN FHOULA, I; LÓPEZ, M; BEN SLAMA, K; DAFFONCHIO, D; BOUDABOUS, A; TORRES, C; OUZAR, H. Genotypic Diversity, Antibiotic Resistance and Bacteriocin Production of Enterococci Isolated from Rhizospheres. **Microbes Environ**, 27(4):533–537, 2012

KING, JL; LARUE, BL; NOVROSKI, NM; STOLJAROVA, M; SEO, SB; ZENG, X; WARSHAUER, DH; DAVIS, CP; PARSON, W; SAJANTILA, A. High quality and high performance parallel sequencing mass of the human mitochondrial genome using the Illumina MiSeq. **Forensic Sci Int-Gen**, 12:128-135, 2014.

KLARE, I; KONSTABEL, C; MUELLER - BERTLING, S; et al. Spread of ampicillin/vancomycin - resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic - virulent clonal complex - 17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 24:815–825, 2005.

KOBAYASHI, N; ALAM, M; NISHIMOTO, Y; URASAWA, S; UEHARA, N; WATANABE, N. Distribution of aminoglycoside resistance genes in recent clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus avium*. **Epidemiol Infect**, 126(2):197-204, 2001.

KONEMAN, EW; ALLEN, SD; JANDA, WM; SCHRECKENBERGER, PC; WINN JR, WC. Diagnóstico microbiológico: Texto e atlas colorido. 5 ed. MEDSI, São Paulo, 1465p, 2001.

KOWALSKA-KROCHMAL, B; DWORNICZEK, E; DOLNA, I; BANIA, J; WAŁECKA, E; SENIUK, A; et al. Resistance patterns and occurrence of virulence determinants among GRE strains in southwestern Poland. **Adv Med Sci**, 56:304-10, 2011.

KRAFT, S; et al. Outcomes of therapy: vancomycin-resistant enterococcal bacteremia in hematology and bone marrow transplant patients. **Support Care Cancer**, 19(12):1969-1974, 2011.

KUO, AJ; SU, LH; SHU, JC; WANG, JH. National Surveillance on Vancomycin Resistant *Enterococcus faecium* in Taiwan: Emergence and Widespread of ST4 14 and a Tn 1546-Like Element with Simultaneous Insertion of IS 1251-like and 1S1678. **PLoS ONE**, 9:12, 2014.

KWON, KH; MOON, BY; HWANG, SY; PARK, YH. Detection of CC17 *Enterococcus faecium* in Dogs and a Comparison with Human Isolates. **Zoonoses Public Health**, 59:375–378, 2012.

LAM, MM; SEEMANN, T; BULACH, DM; GLADMAN, SL; CHEN, H; HARING, V; et al. Comparative Analysis of the First Complete *Enterococcus faecium* Genome. **J Bacteriol**, 194:2334–2341, 2012.

LANDER, ES; LINTON, LM; BIRREN, B; NUSBAUM, C; ZODY, C; BALDWIN, J; DEVON, K; DEWAR, K; DOYLE, M; FITZHUGH, W; FUNKE, R; GAGE, D; HARRIS, K; HEAFORD, A; HOWLAND, J; KANN, L; LEHOCZKY, J; LEVINE, R; MCEWAN, P; MCKERNAN, K; MELDRIM, J; MESIROV, JP; MIRANDA, C; MORRIS, W; NAYLOR, J; RAYMOND, C; ROSETTI, M; SANTOS, R; SHERIDAN, A; SOUGNEZ, C; et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, 409:860 – 921, 2001.

LEAVIS, H; TOP, J; SHANKAR, N; BORGAN, K; BONTEN, M; VAN EMBDEN, J; et al. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. **J Bacteriol**, 186(3):672–682, 2004.

LECLERCQ, R; DERLOT, E; DUVAL, J; COURVALIN, P. Plasmid-mediated vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. **New Engl J Med**, 319:157-161, 1988.

LECLERCQ, R; DUTKA-MALEN, S; DUVAL, J; COURVALIN, P. Vancomycin resistance gene vanC is specific to *Enterococcus gallinarum*. **Antimicrob Agents chemoter**, 36:2005–2008, 1992.

LEDLEY, RS. Digital Electronic Computers in Biomedical Science. **Science**, 3384(130):1225–1234, 1959.

LEE, T; PANG, S; ABRAHAM, S; COOMBS, GW. Antimicrobial Resistant CC17 *Enterococcus faecium*: The Past, the Present and the Future. **J Glob Antimicrob Resist**, S2213-7165(18)30163-2, 2018.

LEME, IL; FERREIRA, AJP. Enterococci. In: FERREIRA, AW; ÁVILA, SL. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2 ed. 132-146, 2001.

LEONG, KWC; COOLEY, LA; ANDERSON, TL; GAUTAM, SS; McEWAN, B; Belinda; WELLS A; WILSON, F; HUGHSON, L; O'TOOLE, RF. Emergence of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* at an Australian Hospital: A Whole Genome Sequencing Analysis. **Sci Rep-UK**, 8:6274, 2018.

LIU; et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. **J Biomed Biotechnol**, 2012:251364, 2012.

LOCCI, R; PETERS, G; PULVERER, G. Microbial colonization of prosthetic devices. I. microtopographical characteristics of intravenous catheters as detected by scanning electron microscopy. **Zentralbl Bacteriol**, 173:285-292, 1981.

LOMAN, NJ; CONSTANTINIDOU, C; CHAN, JZM; HALACHEV, M; SERGEANT, M; PENN, CW; ROBINSON, ER; PALLEN, MJ. High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. **Nature reviews Microbiology**, Nature Publishing Group, 10(9):599–606, 2012.

LUDWIG, W; KLENK, H. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In *Bergey's Manual of systematics Bacteriology*. Springer-Verlag Berlin, 2 ed. 49-65, 2001.

MACK, D; ROHDE, H; HARRIS, LG; DAVIES, AP; HORSTKOTTE, MA; KNOBLOCH, JK. Biofilm formation in medical device-related infection. **Int J Artif Organs**, 29(4):343-59, 2006.

MADIGAN, MT; MARTINKO, JM; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 10 ed. São Paulo: Prentice Hall, 144p, 2004.

MAKI, DG. Infections caused by intravascular device used for infusion therapy: pathogenesis, prevention and management. In: BISNO, AI; WALDOVOGEL, FA; editors. *Infections associated with indwelling medical devices*. 2 ed. Washington, DC: **ASM Press**, 155-212, 1994.

MAKI, DG; RINGER, M. Risk factors for infusion-related phlebitis with small peripheral venous catheters. A randomized controlled trial. **Ann Intern Med**, 114(10):845-854, 1991.

MAKI, DG; WEISE, CE; SARAFIN, HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. **N Engl J Med**, 296:1305- 1309, 1977.

MARDIS, ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends Genet**, 24(3):133-141, 2008.

MARQUES, SC; REZENDE, JGOS; ALVEZ, LAF; SILVA, BC; ALVES, E; ABREU, LR; PICCOLI, RH. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Braz J Microbiol**, 38:538-543, 2007.

MARRA, A; DIB-HAJJ, F; LAMB, L; KACZMAREK, F; SHANG, W; BECKIUS, G; MILLICI, AJ; MEDINA, I; GOOTZ, TD. Enterococcal virulence determinants may be

involved in resistance to clinical therapy. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 58:59–65, 2007.

MARRA, AR; CAMARGO, LF; PIGNATARI, AC; SUKIENNIK, T; et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **J Clin Microbiol**, 49:1866-1871, 2011.

MARTI, M; TROTONDA, MP; TORMO-MAS, MA; VERGARA-IRIGARAY, M; CHEUNG, AL; LASA, I; PENADES, JR. Extracellular proteases inhibit proteindependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Microbes Infect**, 12:55-64, 2010.

MARTINEZ, S; LOPEZ, M; BERNARDO, A. Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells. **Lett Appl Microbiol**, 37:475–481, 2003.

MAZAHERI, NFR; BARTON, MD; HEUZENROEDER, MW. Novel Bacteriophages in *Enterococcus* spp. **Current Microbiol**, 60(6):400–406, 2010.

MEIRA, QGS; BARBOSA, IM; ATHAYDE, AJAA; SIQUEIRA-JÚNIOR, JP; SOUZA, EL. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. **Food Cont**, 25:469–475, 2012.

MERINO, N; TOLEDO-ARANA, A; VERGARA-IRIGARAY, M; VALLE, J; SOLANO, C; CALVO, E; LOPEZ, JA; FOSTER, TJ; PENADES, JR; LASA, L. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol**, 191:832-43, 2009.

MERMEL, LA; McCORMICK, RD; SPRINGMAN, SR; MAKI, DG. The pathogenesis and epidemiology of catheter-related infection with pulmonary artery Swan-Ganz catheters: a prospective study utilizing molecular subtyping. **Am J Med**, 91:197-205, 1991.

MERRITT, ME; DONALDSON, JR. Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. **J Med Microbiol**, 58(12):1533–1541, 2009.

METALLIDIS, S; CHATZIDIMITRIOU, M; TSONA, A; BISIKLIS, A; LAZARAKI, G; KOUMENTAKI, E; GIKAS, A; ALEXIOU-DANIEL, S; NIKOLAIDIS, P. Vancomycin-resistant enterococci, colonizing the intestinal tract of patients in a university hospital in Greece. **Braz J Infect Dis**, 10:179-184, 2006.

METZKER, ML. Sequencing technologies — the next generation. **Nat Rev Genet**, 11(1):31–46, 2010.

MILLER, JR; KOREN, S; SUTTON, G. Assembly algorithms for next-generation sequencing data. **Genomics**, 95:315– 327, 2010.

MILLER, RV. Bacterial gene swapping in nature. **Sci Am**, 278:66-71, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil. Surto de Enterococo resistente à vancomicina em estabelecimentos de assistência à saúde. Informe Técnico 05/07, 2008.

MIZRACHI, E; HEFER, CA; RANIK, M; JOUBERT, F; MYBURG, AA. *De novo* assembled expressed gene catalog of a fast-growing *Eucalyptus* tree produced by Illumina mRNA-Seq. **BMC Genomics**, 11:681, 2010.

MOELLERING, RC. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. **Clin Infect Dis**, 14:1173–1178, 1992.

MOHAMED E; FARAG, N; KHARDORI, N. Efficacy of selected biocides in the decontamination of common nosocomial bacterial pathogens in biofilm and planktonic forms. **Comp Immunol Microb**, 47:60-71, 2016.

MOHAMED, JA; Huang, W; Nallapareddy, SR; Teng, F; Murray, BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Infect Immun**, 72:3658–3663, 2004.

MONNET, C; et al. The *Arthrobacter arilaitensis* Re117 genome sequence reveals its genetic adaptation to the surface of cheese. **PLoS One**, 5:e15489, 2010.

MONTEALEGRE, MC; SINGH, KV; SOMARAJAN, SR; YADAV, P; CHANG, C; SPENCER, R; SILLANPÄÄ, J; TON-THAT, H; MURRAY, BE. role of the Emp pilus subunits of *Enterococcus faecium* in biofilm formation, adherence to host extracellular matrix components, and experimental infection. **Infect Immun**, 22;84(5):1491-1500, 2016.

MORALES, M; MENDÉZ-ALVAREZ, S; MARTÍN-LÓPEZ, J-V; MARRERO, C; FREYTES, CO. Biofilm: the microbial bunker for intravascular catheter-related infection. **Support Care Cancer**, 12:701-707, 2004.

MOREIRA, CG; PALMER, K; WHITELEY, M; SIRCILI, MP; TRABULSI, LR; SPERANDIO, V; CASTRO, AFP; SPERANDIO, V. Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by Enteropathogenic *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, 188:3952-61, 2006.

MUNDY, LM; SAHM, DF; GILMORE, M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clin Microb Rev**, 13:513-522, 2000.

MURRAY, B. The life and times of the *Enterococcus*. **Clin Microbiol Rev**, 3:46-65, 1990.

MURRAY, BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. **N Engl J Med**, 342:710–721, 2000.

MURRAY, BE; WEINSTOCK, GM. Enterococci: new aspects of an old organism. **Proc Assoc Am Physicians**, 111:328–334, 1999.

MURRAY; PATRICK; ROSENTHAL; KEN, S; PFALLER; MICHAEL, A. Microbiologia médica. Elsevier Brasil, 2015.

NAILOR MD; SOBEL, JD. Antibiotics for Gram-positive bacterial infections: vancomycin, teicoplanin, quinupristin/dalfopristin, oxazolidinones, daptomycin, telavancin, and ceftaroline. **Med Clin North Am**, 95(4):723-42, 2011.

- NAKIB, M; et al. Comparison of the Diversilab system with multi-locus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis for the characterization of *Streptococcus agalactiae* invasive strains. **J Microbiol Meth**, 85(2):137-142, 2011.
- NAKIB, M; LONGO, M; TAZI, A; BILLOET, A; RAYMOND, J; TRIEU - CUOT, P; POYART, C. Comparison of the Diversilab®system with multi - locus sequence typing and pulsed - field gel electrophoresis for the characterization of *Streptococcus agalactiae* invasive strains. **J Microbiol Methods**, 85:137–142, 2011.
- NALLAPAREDDY, SR; WEINSTOCK, GM; MURRAY, BE. Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strainspecific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. **Mol Microbiol**, 47:1733-1747, 2003.
- NCBI: National Center for Biotechnology Information. *Enterococcus faecium*. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/871?>>, último acesso em: 11/07/2018, 2018.
- NEBREDA, T; OTEO, J; ALDEA, C; et al. Hospital dissemination of a clonal complex 17 vanB2-containing *Enterococcus faecium*. **J Antimicrob Chemother**, 59:806–807, 2007.
- NECIDOVA, L; STASTKOVA, Z; POSPISILOVA, M; JANSTOVA, B; STREJCEK, J; DUSKOVA, M; KARPISKOVA, R. Influence of soft cheese technology on the growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. **Czech J Food Sci**, 27:127–133, 2009.
- O'GRADY, NP. Applying the science to the prevention of catheter-related infections. **J Crit Care**, 17:114–121, 2002.
- OCHMAN, H; LAWRENCE, G; GROISMAN, EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, 405:299-304, 2000.
- OPPENHEIM, BA. Optimal management of central venous catheter related infections-what is the evidence? **J Infect**, 40:26-30, 2000.
- O'TOOLE, GA; KAPLAN, H; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annu Rev Microbiol**, 54:49-79, 2000.
- PALAVECINO, E. Puesta al día en enterococos-año 2001: Identificación de especies y estudio de susceptibilidad antimicrobiana. **Revista chilena de infectología**, 18(2):95-100, 2001.
- PALAZZO, ICV; PITONDO-SILVA, A; LEVY, CE; DA COSTA DARINI, AL. Changes in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing outbreaks in Brazil. **J Hosp Infect**, 79:70–74, 2011.
- PANCER, Z; COOPER, MD. The evolution of adaptive immunity. **Annu Rev Immunol**, 24:497-518, 2006.
- PANESSO, D; et al. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in South American hospitals. **J Clin Microbiol**, 48(5):1562-1569, 2010.

- PATTI, JM; ALLEN, BL; MCGAVIN, MJ; HÖÖK, M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Annu Rev Microbiol**, 48:585-617, 1994.
- PAULSEN, IT; BROWN, MH; SKURRAY, RA. Proton-dependent multidrug efflux systems. **Microbiol Rev**, 60: 575-608, 1996.
- PEETERS, E; NELIS, HJ; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **J Microbiol Methods**, 72:157–165, 2007.
- PENG, D; LI, X; LIU, P; LUO, M; CHEN, S; SU, K; ZHANG, Z; HE, Q; QIU, J; LI, Y. Epidemiology of pathogens and antimicrobial resistance of catheter-associated urinary tract infections in intensive care units: A systematic review and meta-analysis. **Am J Infect Control**, S0196-6553(18)30756-9, 2018.
- PERUGINI, MRE; SUGAHRA, VH; DIAS, JB; MAGALHÃES, GLG; PELISSON, M; MARRONI, FEC; YAMADA-OGATTA, SF; YAMAUCHI, LM; VESPERO, EC; OBARA, VY; GARBIN, RPB; RIBEIRO, MAG. Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.: clinical characteristics and risk factors. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, 36(1):s291-300, 2015
- PETREY, D; HONIG, B. Structural bioinformatics of the interactome. **Annu Rev Biophys**, 43:193–210, 2014.
- PFEIFFER, RR. Structural features of vancomycin. **Rev Infect Dis**, 3:205-209, 1981.
- PICIOREANU, C; et al. Effect of diffusive and convective substrate transport on biofilm structure formation: a two-dimensional modeling study. **Biotechnol Bioeng**, 69(5):504-515, 2000.
- PIDDOCK, LJV. Multidrug-resistance efflux pumps-not just resistance. **Nat Rev Microbiol**, 4:629-635, 2006.
- POLDERMAN, KH; GIRBES, AR. Central venous catheter use. Part 1: mechanical complications. **Intens Care Med**, 28(1):1-17, 2002.
- POTTER, A; CEOTTO, H; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M; SANTOS, KRN; NES, IF; BASTOS, MCF. The gene *bap*, involved in biofilm production, is present in *Staphylococcus* spp. strains from nosocomial infections. **J Microbiol**, 47:319- 326, 2009.
- QIN, X; GALLOWAY-PEÑA, JR; SILLANPÄÄ, J; ROH, JH; NALLAPAREDDY, SR; CHOWDHURY, S; et al. Complete genome sequence of *Enterococcus faecium* strain TX16 and comparative genomic analysis of *Enterococcus faecium* genomes. **BMC Microbiol**, 12:135, 2012.
- QIN, X; SINGH, KV; WEINSTOCK, GM; MURRAY, BE. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. **Infect Immun**, 68:2579–2586, 2000.

QU, IT; YANG, Q; SHEN, P; WET, ZQ; YU, YS. Novel vancomycin-resistance transposon, plasmid replicon types and virulence factors of vancomycin-resistant Enterococci in Zhejiang, China. **Microb Drug Resist**, 18(2):183-188, 2012.

RAAD, II. Catheter-related septicemia: risk reduction. *Infect Med*, 13:807-823, 1996.

RAAD, II. Intravascular-catheter-related infections. **Lancet**, 351:893-898, 1998.

RAAD, II; SABBAGH, MF; RAND, KH; SHERERTZ, RJ. Quantitative tip culture methods and the diagnosis of central venous catheter-related infections. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 15:13–20, 1992.

RAMAGE, G; MARTÍNEZ, JP; LÓPEZ-RIBOT, JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS Yeast Res**, 6(7):979-86, 2006.

RAMOS, RTJ. Desenvolvimento de uma suíte de aplicativos computacionais para suporte à montagem de genomas bacterianos a partir de leituras curtas. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFPA. Belém (PA), 2011.

RATHNAYAKE, IU; HARGREAVES, M; HUYGENS, F. Antibiotic resistance and virulence traits in clinical and environmental *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. **Syst Appl Microbiol**, 35:326–333, 2012.

RESENDE, M; CAIERÃO, J; PRATES, JG; NARVAEZ, GA; DIAS, CA; D'AZEVEDO, PA. Emergence of *vanA* vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a hospital in Porto Alegre, South Brazil. **J Infect Dev Ctries**, 8:160-167, 2014.

RICE, EW; BOCZEK, LA; JOHNSON, CH; MESSER, JW. Detection of intrinsic vancomycin resistant enterococci in animal and human feces. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 46(2):155-158, 2003.

RICE, LB; LAKTICOVÁ, V; CARIAS, LL; RUDIN, S; HUTTON, R; MARSHALL, SM. Transferable capacity for gastrointestinal colonization in *Enterococcus faecium* in a mouse model. **J Infect Dis**, 199(3):342–349, 2009.

RICHARDS, MJ; EDWARDS, JR; CULVER, DH; GAYNES, RP. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. **Infect Cont Hosp Epidemiol**, 21:510–515, 2000.

RICHARDS, VP; et al. Comparative genomics and the role of lateral gene transfer in the evolution of bovine adapted *Streptococcus agalactiae*. **Infect Genet Evol**, 11:1263–1275, 2011.

RIMONDINI, L; FINI, M; GIARDINO, R. The microbial infection of biomaterials: a challenge for clinicians and researchers. A short review. **J Appl Biomater Biomech**, 3:1–10, 2005.

ROHDE, H; BURANDT, EC; SIEMSEN, N; FROMMELT, L; BURDELSKI, C; WURSTER, S; SCHERPE, S; DAVIES, AP; HARRIS, LG; et al. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus*

epidermidis and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. **Biomaterials**, 28:1711–1720, 2007.

ROMERO, D; AGUILAR, C; LOSICK, R; KOLTER, R. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. **P Natl Acad Sci USA**, 107:2230–2234, 2010.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clin Infect Dis**, 52(9):1138-1143, 2011.

ROSSONI, EMM; GAYLARDE, CC. Comparison of sodium hypochlorite and peracet acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **Int J Food Microbiol**, 61(1):81-85, 2000.

ROTHBERG, JM; et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature**, 475(7356):348-352, 2011.

RUPP, ME; FEY, PD; LONGO, GM. Effect of LY33328 against vancomycin resistant *Enterococcus faecium* in a rat model central venous catheter-associated infection model. **J Antimicrob Chemother**, 47:705-707, 2001.

RUPP, ME; KARNATAK, R. Intravascular Catheter-Related Bloodstream Infections. **Infect Dis Clin North Am**, S0891-5520(18)30055-2, 2018.

RUZON, FI; PAULA, SB; KANOSHIKI, RL; SANTOS, JP; KERBAUY, G; KOBAYASHI, RKT; YAMAUCHI, LM; PERUGINI, MRE; YAMADA-OGATTA, SF. Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* vanA isolated from different sources at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. **J Microbiol**, 48:814–821, 2010.

SACRAMENTO, AG; ZANELLA, RC; ESPOSITO, F; COSTA, EAS; de ALMEIDA, LM; PIRES, C; de BRITO, AC; MAMIZUKA, EM; CERDEIRA, LT; LINCOPAN, N. Changed epidemiology during intra and interhospital spread of high-risk clones of *vanA*-containing *Enterococcus* in Brazilian hospitals. **Diagn Microbiol Infect Dis**, S0732-8893(17)30153-0, 2017.

SADER, HS; MOET, GJ; JONES, RN. Antimicrobial resistance among Gram-positive bacteria isolated in Latin American hospitals. **J Chemother**, 21(6):611-620, 2009.

SAIER, MH; PAULSEN, IT; SLIWINSKI, MK; PAO, SS; SKURRAY, RA; NIKAIDO, H. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. **FASEB J**, 12:265–274, 1998.

SALGADO, CD; FARR, BM. Outcomes associated with vancomycin-resistant enterococci: a meta-analysis. **Infect Cont Hosp Epidemiol**, 24:690–698, 2003.

SÁNCHEZ-DÍAZ, AM; et al. New Insights into the *Enterococcus faecium* and *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Host Interaction Mechanisms. **PloS one**, 11(7):e0159159, 2016.

SANGER, F. Sequences, sequences and sequences. **Annu Rev Bioch**, 57:1–28, 1988.

SANGER, F; NICKLEN, S; COULSON, R. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. **P Natl Acad Sci USA**, 74:5463-5467, 1977.

SCHINABECK, MK; GHANNOUM, MA. Catheter-related infections – diagnosis, treatment and prevention. **Clin Microbiol Newsl**, 25:113-118, 2003.

SCHLIEVERT, PM; CHUANG-SMITH, ON; PETERSON, ML; COOK, LC; DUNNY, GM. *Enterococcus faecalis* endocarditis severity in rabbits is reduced by IgG Fabs interfering with aggregation substance. **PLoS One**, 5(10):e13194, 2010.

SCHWARTZ, K; SYED, AK; STEPHENSON, RE; RICKARD, AH; BOLES, BR. Functional amyloids composed of phenol soluble modulins stabilize *Staphylococcus aureus* biofilms. **PLoS Pathog**, 8:e1002744, 2012.

SGHIR, A; GRAMET, G; SUAOU, A; VIOLAINE, R; POCHART, P; DORE, J. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. **Appl Environ Microbiol**, 66:2263–2266, 2000.

SHANKAR, V; BAGHDAYAN, AS; GILMORE, M. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Nature**, 417:746-750, 2002.

SHARIFI, Y; HASANI, A; GHOTASLOU, R; VARSHOCHI, M; HASANI, A; AGHAZADEH, M; MILANI, M. Survey of virulence determinants among vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from clinical specimens of hospitalized patients of northwest of Iran. **Open Microbiol J**, 6:34–39, 2012.

SHENDURE, J; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature biotechnol**, 26(10):1135-1145, 2008.

SHUMAN, EK; CHENOWETH, CE. Urinary Catheter-Associated Infections. **Infect Dis Clin North Am**, S0891-5520(18)30064-3, 2018.

SIEGEL, JD; RHINEHART, E; JACKSON, M; CHIARELLO, L. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. **Am J Infect Control**, 35:S165–193, 2007.

SIEVERT, DM; et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. **Infect Cont Hosp Epidemiol**, 34(01):1-14, 2013.

SILLANPAA, J; NALLAPAREDDY, SR; SINGH, KV; PRAKASH, VP; FOTHERGILL, T; TON-THAT, H; MURRAY, BE. Characterization of the ebp(fm) pilus-encoding operon of *Enterococcus faecium* and its role in biofilm formation and virulence in a murine model of urinary tract infection. **Virulence**, 1:236–246, 2010.

SILVA, L; SILVA, A; MARTINEZ, R; DARINL, A. Genetic features and molecular epidemiology of *Enterococcus faecium* isolated in two university hospitals in Brazil. **Diagn Micr Infec Dis**, 74: 267-271, 2012.

SIMNER, PJ; ADAM, H; BAXTER, M; MCCRACKEN, M; GOLDING, G; KARLOWSKY, JA; et al. Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in Canadian hospitals (CANWARD study, 2007 to 2013). **Antimicrob Agents chemoter**, 59:4315–4317, 2015.

SIMÕES, M; SIMÕES, LC; VIEIRA, MJ. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT-Food Sci Technol**, 43:573-583, 2010.

SINDE, E; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiol**, 17(4):439-447, 2000.

SOOD, S; MALHOTRA, M; DAS, BK; KAPIL, A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. **Indian J Med Res**, 128:111-121, 2008.

STOBBERINGH, E; VAN DEN, BA; LONDON, N; DRIESSEN, C; TOP, J; WILLEMS, R. Enterococci with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmers, turkey slaughterers, and (sub)urban residents in the south of the Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans? **Antimicrob Agents chemoter**, 43:2215–2221, 1999.

STOODLEY, LH; COSTERTON, JW; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature reviews**, 2:95-108, 2004.

SU, YA; SULAVIK, MC; HE, P; MAKINEN, KK; MAKINEN, PL; FIEDLER, S; WIRTH, R; CLEWELL, DB. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. **Infect Immun**, 59:415–420.

SULE P; et al. A combination of assays reveals biomass differences in biofilms formed by *Escherichia coli* mutants. **Lett Appl Microbiol**, 49:299–304, 2009.

SUN, J; SUNDSFJORD, A; SONG, X. *Enterococcus faecalis* from patients with chronic periodontitis: virulence and antimicrobial resistance traits and determinants. **Eur J Clin Microbiol**, 31:267-272, 2012.

SURYALETHA, K; NARENDRAKUMAR, L; JOHN, J; REGHUNATHAN, D; PRASANNAKUMAR, M; THOMAS, S. Genomic insights into biofilm-forming *Enterococcus faecalis* SK460 isolated from a chronic diabetic ulcer patient. **Genome Announc**, 6:e01463-17, 2018.

SUTTER, ST; FREI, R; DANGEL, M; GRATWOHL, A; BONTEN, M; WIDMER, AF. Not All Patients with Vancomycin-Resistant Enterococci Need To Be Isolated. **Clin Infect Dis**, 51(6):678-683, 2010.

SUZUKI, N; YONEDA, M; HATANO, Y; IWAMOTO, T; MASUO, Y; HIROFUJI, T. *Enterococcus faecium* WB2000 inhibits biofilm formation by oral cariogenic Streptococci. **Int J Dent**, 2011:834151, 2011.

TACCONELLI, E; CATALDO, MA. Vancomycin-resistant enterococci (VRE): transmission and control. **Int J Antimicrob Agents**, 31:99-106, 2008.

TANNOCK, GW; COOK, G. Enterococci as members of the intestinal microflora of humans. In GILMORE, MS (Ed.); *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance* (pp. 101-132). Washington, D.C, 2002.

TAXONOMY BROWSER. *Enterococcus faecalis* V583. NCBI. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=226185&lvl>>. Acesso em 06/07/2018.

TELFORD, JL; BAROCCHI, MA; MARGARIT, I; RAPPUOLI, R; GRANDI, G. Pili in gram-positive pathogens. **Nat Rev Microbiol**, 4:509–519, 2006.

TENDOLKAR, PM; BAGHDAYAN, AS; GILMORE, MS; SHANKAR, N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Infect Immun**, 72:6032–6039, 2004.

THOMPSON, KF; PATEL, S; WILLIAMS, L; TSAI, P; CONSTANTINE, R; BAKER, CS; MILLAR, C. The high coverage of the complete mitochondrial genome of the rare beaked gray whale (*Mesoplodon grayi*) using Illumina next-generation 61 sequencing. **Mitochondrial DNA**, 10.3109/19401736.2013.878908, 2012.

TIBA, MR; NOGUEIRA, GP; LEITE, DS. Estudo dos fatores de virulência associados à formação de biofilme e agrupamento filogenético em *Escherichia coli* 49 isoladas de pacientes com cistite. **Rev Soc Bras Med Tro**, 42(1):58-62, 2009.

TOLEDO-ARANA, A; VALLE, J; SOLANO, C; ARRIZUBIETA, MJ; CUCARELLA, C; LAMATA, M; AMORENA, B; LEIVA, J; PENADES, JR; LASA, I. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Appl Environ Microbiol**, 67:4538-4545, 2001.

TON-THAT, H; MARRAFFINI, LA; SCHNEEWIND, O. Sortases and pilin elements involved in pilus assembly of *Corynebacterium diphtheriae*. **Mol Microbiol**, 53:251–261, 2004.

TOP, J; WILLEMS, R; BONTEN, M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 52:297-308, 2008.

TOP, J; PAGANELLI, FL; ZHANG, X; VAN SCHAİK, W; LEAVIS, HL; VAN LUIT-ASBROEK, M; VAN DER POLL, T; LEENDERTSE, M; BONTEN, MJ; WILLEMS, RJ. The *Enterococcus faecium* enterococcal biofilm regulator, EbrB, regulates the *esp* operon and is implicated in biofilm formation and intestinal colonization. **PLoS One**, 31;8(5):e65224, 2013.

TORNIEPORTH, NG; ROBERTS, RB; JOHN, J; et al. Risk factors associated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection or colonization in 145 matched case patients and control patients. **Clin Infect Dis**, 23:767-772, 1996.

TREITMAN, AN; YARNOLS, PR; WARREN, J; NOSKIN, GA. Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002). **J Clin Microbiol**, 43:462-463, 2005.

TSIKRIKONIS, G; MANIATIS, AN; LABROU, M; et al. Differences in biofilm formation and virulence factors between clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin. **Microb Pathog**, 52:336–343, 2012.

TURCATTI, G; et al. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. **Nucleic Acids Res**, 36:e25, 2008.

URWIN, R; et al. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends Microbiol**, 11(10):479-487, 2003.

UTTLEY, AC; NAIDOO, CH; GEORGE, JRC. Vancomycin-resistant enterococci. **Lancet**, 1:57-58, 1998.

VADYVALOO, V; OTTO, M. Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical devices. **Int J Artif Organs**, 28(11):1069-78, 2005.

VALDEZATE, S; MIRANDA, C; NAVARRO, A; FREITAS, AR; CABRERA, JJ; CARRASCO, G; COQUE, TM; JIMENEZ-ROMANO, E; SAEZ-NIETO, JA. Clonal outbreak of ST17 multidrug-resistant *Enterococcus faecium* harbouring an Inc18-like: Tn1546 plasmid in a haemo-oncology ward of a Spanish hospital. **J Antimicrob Chemother**, 67:832–836, 2012.

VAN VEEN, HW; KONINGS, WN. Multidrug transporters from bacteria to man: similarities in structure and function. **Semin Cancer Biol**, 8:183–191, 1997.

VAN WAMEL, WJAP; HENDRICKX, MJ; BONTEN, J; TOP, G; POSTHUMA, RJ. Willems Growth condition-dependent Esp expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. **Infect Immun**, 75:924-931, 2007.

VANDECASTEELE, SJ; PEETERMANS, WE; MERCKX, R; RIJNDERS, BJ; VAN, EJ. Reliability of the ica, aap, and atIE genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. **Clin Microbiol Infect**, 9:114-119, 2003.

VANKERCKHOVEN, V; HUYS, G; VANCANNEYT, M; SNAUWAERT, C; SWINGS, J; KLARE, I; WITTE, W; VAN AUTGAERDEN, T; CHAPELLE, S; LAMMENS, C; GOOSSENS, H. Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. **Appl Environ Microb**, 74(14):4247-4255, 2008.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D; CABO, ML; IBUSQUIZA, PS; RODRÍGUEZ HERRERA, JJ. Biofilm-forming ability and resistance to industrial disinfectants of *Staphylococcus aureus* isolated from fishery products. **Food Control**, 39:8-16, 2014.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D; HABIMANA, O; HOLCK, A. Impact of food-related environmental factors on the adherence and biofilm formation of natural *Staphylococcus aureus* isolates. **Curr Microbiol**, 66:110-121, 2013.

VENGADESAN, K; NARAYANA, SV. Structural biology of Gram-positive bacterial adhesins. **Protein Sci**, 20(5):759-72, 2011.

VENTER, JC; ADAMS, MD; MYERS, EW; LI, PW; MURAL, RJ; SUTTON, GG; SMITH, HO; YANDELL, M; EVANS, CA; HOLT, RA; GOCAYNE, JD; AMANATIDES, P; BALLEW, RM; HUSON, DH; WORTMAN, JR; ZHANG, Q; KODIRA, CD; ZHENG, XH; CHEN, L; SKUPSKI, LM; SUBRAMANIAN, G; THOMAS, PD; ZHANG, J; MIKLOS, GLG; NELSON, C; BRODER, S; CLARK, AG; NADEAU, J; MCKUSICK, VA; ZINDER, N; et al. The Sequence of the Human Genome. **Science**, 291:1304-1351, 2001.

VERGIS, EN; SHANKAR, N; CHOW, JW; HAYDEN, MK; SNYDMAN, DR; ZERVOS, MJ; LINDEN, PK; WAGENER, MM; MUDER, RR. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. **Clin Infect Dis**, 35:570-575, 2002.

VON EIFF, C; HEILMANN, C; PETERS, G. News aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to Staphylococci. **Eur J Clin Microbiol, Infect Dis**, 18:843-846, 1999.

WANG, Z; FANG, B; CHEN, J; ZHANG, X; LUO, Z; HUANG, L; et al. *De novo* assembly and characterization of root transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of cSSR markers in sweet potato (*Ipomoea batatas*). **BMC Genomics**, 11:726, 2010.

WATERS, CM; ANTIPOORTA, MH; MURRAY, BE; DUNNY, GM. Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. **J Bacteriol**, 185: 3613–3623, 2003.

WEBB, GF; D'AGATA, EMC; MAGAL, P; RUAN, S. A model of antibiotic resistant bacterial epidemics in hospitals. **Proc Natl Acad Sci USA**, 102: 13343–13348, 2005.

WEI, W; QI, X; WANG, L; ZHANG, Y; HUA, W; LI, D; et al. Characterization of the sesame (*Sesamum indicum* L.) global transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers. **BMC Genomics**, 12:451, 2011.

WERNER, G; COQUE, TM; HAMMERUM, AM; HOPE, R; HRYNIEWICZ, W; JOHNSON, A; KLARE, I; KRISTINSSON, KG; LECLERCQ, R; LESTER, CH; LILLIE, M; NOVAIS, C; OLSSON-LILJEQUIST, B; PEIXE, LV; SADOWY, E; SIMONSEN, GS; TOP, J; VUOPIO-VARKILA, J; WILLEMS, RJ; WITTE, W; WOODFORD N. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. **Euro Surveill**, 13: 1-11, 2008.

WERNER, G; KLARE, I; FLEIGE, C; et al. Vancomycin-resistant vanB-type *Enterococcus faecium* isolates expressing varying levels of vancomycin resistance and being highly prevalent among neonatal patients in a single ICU. **Antimicrob Resist In**, 1:21–21, 2012.

WERNER, G; COQUE, TM; HAMMERUM, AM; HOPE, R; HRYNIEWICZ, W; JOHNSON, A; et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. **Euro Surveill**, 13:1-11, 2008.

- WILLEMS, RJ; HOMAN, W; TOP, J; VAN SANTEN-VERHEUVEL, M; TRIBE, D; MANZIOROS, X, et al. Variant esp gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. **Lancet**, 357(9259):853-855, 2001.
- WILLEMS, RJ; TOP, J; VAN SANTEN, M; ROBINSON, DA; COQUE, TM; BAQUERO, F; GRUNDMANN, H; BONTEN MJ. Global spread of vancomycin - resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. **Emerg Infect Dis**, 11:821-828, 2005.
- WILLEMS, RJL et al. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiol Rev**, 35(5):872-900, 2011.
- WILLEMS, RJL; BONTEN, MJM. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. **Curr Opin Infect Dis**, 20: 384-390, 2007.
- WILLIAMS, ST; FOSTER, PG; LITTLEWOOD, DTJ. The complete mitochondrial genome of a turbinid vetigastropod of MiSeq Illumina DNA sequencing and genomic steps toward a gastropod phylogeny solved. **Gene**, 533(1):38-47, 2014.
- WIRTANEN, G. et al. Biofilm risks. Handbook of hygiene control in the food industry, 46-68, 2005.
- WOJTYCZKA, RD; et al. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* strains from a hospital environment. **Int J Environ Res Public Health**, 11:4619-33, Maio 2014.
- WOODFORD, N; LIVERMORE, DM. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. **J Infect**, 2009; 59(1): 4-16, 2009.
- WORTH, LJ; SLAVIN, MA; VANKERCKHOVEN, V; GOOSSENS, H; GRABSCH, EA; THURSKY, K. A. Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* vanB: clonal distribution, prevalence and significance of esp and hyl in Australian patients with haematological disorders. **J Hosp Infect**, 68:137–144, 2008.
- XU, H; TIAN, R; CHEN, D; XIAO, F; NIE, ZY; HU, YJ; et al. Nosocomial spread of hospital-adapted CC17 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a tertiary-care hospital of Beijing, China. **Chin Med J**, 124(4):498–503, 2011.
- YI, M; ZHAO, Y; JIA, L; HE, M; KEBEBEW, M; STEPHENS, R. M. Performance comparison of SNP detection tools with illumina exome sequencing data—an assessment using both family pedigree information and sample-matched SNP array data. **Nucl Acids Res**, 42(12):1-14, 2014.
- ZHANG, H; FOUTS, DE; DEPEW, J; et al. Genetic modifications to temperate *Enterococcus faecalis* phage Ef11 that abolish the establishment of lysogeny and sensitivity to repressor, and increase host range and productivity of lytic infection. **Microbiology**, 159:1023-35, 2013.