

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Beatriz Oliveira de Farias

**VIGILÂNCIA GENÔMICA AMBIENTAL DE *Enterococcus faecium* RESISTENTES
À VANCOMICINA DISSEMINADOS POR ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE
EFLUENTES**

Rio de Janeiro

2022

Beatriz Oliveira de Farias

**VIGILÂNCIA GENÔMICA AMBIENTAL DE *Enterococcus faecium* RESISTENTES
À VANCOMICINA DISSEMINADOS POR ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE
EFLUENTES**

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do Certificado de conclusão do Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Tutor: Maysa Beatriz Mandetta Clementino

Preceptor: Kayo Cesar Bianco Fernandes

Rio de Janeiro

2022

Beatriz Oliveira de Farias

**VIGILÂNCIA GENÔMICA AMBIENTAL DE *Enterococcus faecium* RESISTENTES
À VANCOMICINA DISSEMINADOS POR ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE
EFLUENTES**

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do Certificado de conclusão do Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

(Titulação) Nome do componente da banca

Instituição a que pertence

(Doutor) Sergio Eduardo Longo Fracalanza

Universidade Federal do Rio de Janeiro

(Doutor) Rodolpho Mattos Albano

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

(Doutor) Maysa Beatriz Mandetta Clementino – (Tutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

(Doutor) Kayo Cesar Bianco Fernandes – (Preceptor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a todas as Forças Divinas que me guiaram até aqui, iluminando meu caminho e abençoando minha jornada.

Aos meus pais, por todo apoio e por acreditarem em mim, me ajudando a realizar meus sonhos e alcançar meus objetivos com muito amor e dedicação.

À minha irmã, Juliana, minha melhor amiga e quem acompanha de perto as minhas batalhas, sempre segurando na minha mão nos momentos difíceis e comemorando minhas vitórias.

Aos meus avós, João (*in memoriam*) e Zaira, que acreditaram no meu sucesso desde sempre.

A todos amigos que me acompanharam até aqui, tornando minha jornada mais leve e divertida. Especialmente, agradeço ao meu amigo Igor pela amizade que cultivamos nos últimos anos e pelas aventuras acadêmicas compartilhadas.

Ao Victor, que está ao meu lado me apoiando nessa etapa da minha vida e acredita nos meus sonhos e projetos de vida. Gratidão por todo acolhimento e carinho!

Aos meus amigos de laboratório: Kayo, Andressa, Mari, Aninha, Kay e Rafaela, que me ajudaram e tornaram meus dias de trabalho mais alegres. Sou grata por cada um de vocês!

A minha tutora Maysa, pelos ensinamentos, pela orientação e pela oportunidade.

Ao meu preceptor Kayo, que esteve ao meu lado em cada etapa desse trabalho me ensinando e orientando com muita dedicação e paciência.

A toda equipe do Laboratório de Microrganismos de Referência e do INCQS que contribuiu para este trabalho.

A Fundação Oswaldo Cruz, pela oportunidade e pelos recursos disponibilizados para realizar esse trabalho.

RESUMO

O surgimento de *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE_{fm}) carregando o gene *vanA* e múltiplos determinantes de resistência antimicrobiana é uma preocupação relevante de saúde pública. Este microrganismo é um patógeno oportunista responsável por infecções nosocomiais e se encontra amplamente distribuído no meio ambiente, assim como em Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs). As ETEs podem desempenhar um papel importante na disseminação da resistência antimicrobiana, transportando vários contaminantes ambientais emergentes, como genes de resistência aos antimicrobianos (ARGs). O presente estudo aborda uma investigação genômica de *E. faecium*, carregando o gene *vanA* recuperados de ETEs no Brasil. Foram avaliadas 16 amostras de cinco ETEs abastecidas com águas residuais de diferentes origens. O sequenciamento completo do genoma de oito isolados de *E. faecium* abrangendo *vanA* foi realizado utilizando a plataforma Illumina MiSeq. Todos esses isolados apresentaram perfil multirresistente e cinco cepas eram provenientes de efluentes tratados. A análise genômica apontou a presença de múltiplos genes de resistência aos antimicrobianos que podem conferir resistência aos fármacos utilizados na clínica médica, como aminoglicosídeos (*aph(3')-IIIa*, *ant(6')-Ia*), macrolídeos (*ermB*, *msrC*) e tetraciclinas (*tetM*, *tetL*), sendo alguns desses genes alocados em plasmídeos. Além disso, a análise de *Multilocus Sequence Typing* revelou que 75% (6/8) dos *E. faecium* pertenciam ao CC17, que está frequentemente associado a surtos hospitalares. Nesta análise, também foram detectados novos alelos e cinco STs diferentes, três previamente descritos (ST32, ST168, ST253) e dois novos (ST1893 e ST1894). Portanto, nossos dados revelam a presença de VRE_{fm} abrangendo diversos GRAs em ETEs, indicando a relevância de estudos sobre a disseminação da resistência antimicrobiana em águas residuais para fins de vigilância epidemiológica, uma vez que efluentes tratados são lançados em corpos hídricos receptores.

Palavras-chave: Enterococos resistentes à vancomicina (VRE). Resistência antimicrobiana. Sequenciamento completo de genoma. Águas residuais.

ABSTRACT

The emergence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE_{fm}) carrying *vanA* gene and multiple determinants of antimicrobial resistance is a relevant public health concern. It is an opportunistic pathogen responsible for nosocomial infections widely distributed in environment, including wastewater treatment plants (ETEs). ETEs might play an important role in antimicrobial resistance spreading by carrying various emerging environmental contaminants such as antibiotic resistance genes (ARGs). Our study addresses a genomic investigation of *E. faecium* harboring *vanA* gene from ETEs in Brazil. Sixteen samples from five ETEs supplied with sewage from different sources were evaluated. Here we present whole-genome sequencing of eight *vanA*-carrying *E. faecium* isolates performed on Illumina MiSeq platform. All these isolates showed a multiresistant profile and five strains were recovered from treated effluents. The genomic analysis pointed to the presence of multiple antimicrobial resistance genes (GRAs) that may confer resistance to antimicrobials widely used in clinical medicine, such as aminoglycosides (*aph(3')-IIIa*, *ant(6')-Ia*), macrolides (*ermB*, *msrC*) and tetracyclines (*tetM*, *tetL*), and some of them were allocated in plasmids. In addition, Multilocus Sequence Typing analysis revealed that 75% (6/8) *E. faecium* belonged to CC17, which is frequently associated with hospital outbreaks. In this analysis, it was also detected new allele and five different STs, three previously described (ST32, ST168, ST253) and two novels (ST1893 and ST1894). Therefore, the data of present study point to the environmental spread of VRE_{fm} harboring several GRAs in ETEs, indicating the relevance of studies on dissemination of antimicrobial resistance in wastewater for the purpose of epidemiological surveillance, since treated effluents are released into receiving water bodies.

Keywords: vancomycin-resistant enterococci (VRE). Antibiotic resistance. Whole-genome sequencing. Wastewater.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação do transposon Tn1546 de <i>Enterococcus faecium</i> , que carrega o gene <i>vanA</i> e codifica a resistência à vancomicina.....	25
Figura 2	Sequenciamento na plataforma Illumina.....	29
Figura 3	Gráfico demonstrando a resistência antimicrobiana fenotípica de <i>Enterococcus faecium</i> recuperados de Estações de Tratamento de Efluentes.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição da coleta e das estações de tratamento de efluentes selecionadas para este estudo.....	32
Tabela 2	Principais características das sequências genômicas obtidas neste estudo.	38
Tabela 3	Perfil de resistência, virulência e patogenicidade de <i>Enterococcus faecium</i> carreando o gene <i>vanA</i>	40
Tabela 4	Perfil MLST de isolados portadores do gene <i>vanA</i>	42

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC – American Type Culture Collection
BHI – Brain Heart Infusion
BRA – Bactérias Resistentes aos Antimicrobianos
CARD – Comprehensive Antibiotic Resistance Database
CC – Clonal Complex (Complexo Clonal)
CIM – Concentração Inibitória Mínima
DNA – Ácido desoxirribonucleico
ETE – Estação de Tratamento de Efluente
EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
GC – Guanina-Citosina
gDNA – DNA genômico
GRA – Genes de Resistência aos Antimicrobianos
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IS – Sequência de Inserção
MDR – Multidroga Resistente
mg – Miligrama
mL – Mililitros
MLST – Multilocus sequence types
MPE – Micropoluentes Emergentes
NaCl – Cloreto de Sódio
OMS – Organização Mundial da Saúde
ORF – Open Reading Frame
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
pH – Potencial de Hidrogênio
RAM – Resistência Antimicrobiana
RGI – Resistance Gene Identifier
RNA – Ácido ribonucleico
s – Segundos
ST – Sequence Typing (Tipo de Sequência)

TSA – Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

VISA – Vigilância Sanitária

VRE – Enterococos Resistentes a Vancomicina

VREfm – Enterococcus faecium Resistente à Vancomicina

WGS – Sequenciamento de Genoma Completo

XDR – Extensively Drug-resistant (Extensivamente Resistentes)

µm – Micrometros

°C – graus Celsius

µg – Microgramas

µM – Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Vigilância ambiental em saúde	13
1.2	Saneamento e saúde	14
1.2.1	Micropoluentes emergentes	15
1.3	Resistência antimicrobiana	17
1.3.1	Resistência antimicrobiana em ecossistemas aquáticos	18
1.4	Gênero <i>Enterococcus</i>	19
1.4.1	Relevância clínica	20
1.4.2	Resistência aos antimicrobianos	21
1.5	<i>Enterococcus faecium</i> resistente à vancomicina	23
1.5.1	Gene <i>vanA</i>	25
1.5.2	Disseminação ambiental da resistência à vancomicina	26
1.5.3	Detecção da resistência antimicrobiana	27
1.6	Sequenciamento Completo de Genoma	27
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivo geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	METODOLOGIA	32
3.1	Coleta e Amostragem	32
3.2	Isolamento e identificação fenotípica de <i>Enterococcus faecium</i> resistente à vancomicina	33
3.3	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	33
3.4	Detecção do gene <i>vanA</i>	33
3.5	Sequenciamento completo do genoma e análise de bioinformática	34
3.6	Disponibilidade de dados das sequências de genomas	35
4	RESULTADOS	36

4.1	Amostragem e identificação bacteriana.....	36
4.2	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	36
4.3	Detecção do gene <i>vanA</i>	37
4.4	Sequenciamento completo do genoma de <i>Enterococcus faecium</i> carreando o gene <i>vanA</i>	37
4.4.1	Perfil genômico de resistência antimicrobiana.....	38
4.4.2	Perfil genômico de virulência e patogenicidade.....	39
4.4.3	Elementos genéticos móveis	41
4.4.4	Relação Clonal	41
5	DISCUSSÃO	42
6	CONCLUSÕES.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50
	APÊNDICE A – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA MICROBIAL DRUG RESISTANCE	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vigilância ambiental em saúde

A Vigilância Sanitária (VISA) é definida pela Lei Orgânica da Saúde como um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde, abrangendo: o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo; e o controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde (BRASIL, 1990).

Atualmente, a VISA integra ações de um conceito mais amplo, denominado Vigilância em Saúde, que engloba ações de vigilância, promoção, prevenção e controle de doenças e agravos à saúde, devendo-se constituir em espaço de articulação de conhecimentos e técnicas. Atualmente, além da VISA, o conceito de Vigilância em Saúde inclui também: a vigilância e o controle das doenças transmissíveis; a vigilância das doenças e agravos não transmissíveis; a vigilância da situação de saúde, vigilância da saúde do trabalhador e a vigilância ambiental em saúde (BRASIL, 2010).

A Vigilância Ambiental em Saúde (VAS) tem como definição um conjunto de ações que proporciona o conhecimento e a detecção de mudanças nos fatores determinantes e condicionantes do meio ambiente que interferem na saúde humana, com a finalidade de identificar as medidas de prevenção e controle dos fatores de risco ambientais relacionados às doenças ou outros agravos à saúde. Desta forma, a VAS deve ser vista como um processo contínuo de coleta de dados e análise de informação sobre saúde e ambiente, com o intuito de orientar ações de controle dos fatores ambientais que interferem na saúde e contribuem para a ocorrência de doenças e agravos (BEZERRA, 2017).

A Vigilância Ambiental atua identificando os agravos presentes no ambiente e avaliando a relação destes com a comunidade atingida por seus efeitos, visando desenvolver metodologias para elaborar ações que minimizem seus impactos

adversos ou eliminem as fontes causadoras de perturbação. O desenvolvimento da VAS conta com alguns instrumentos e métodos de vigilância e controle, como: epidemiologia ambiental, avaliação e gerenciamento de risco, estudos e pesquisas, indicadores de saúde e ambiente, e Sistemas de Informação de VAS, que deve dispor, dentre outros sistemas, do Sistema de Informação de Vigilância em Saúde de Contaminantes Ambientais (CARVALHO, 2016).

1.2 Saneamento e saúde

As áreas de vigilância da qualidade da água, assim como a vigilância e controle de fatores biológicos e de contaminantes ambientais, estão englobados no âmbito da Vigilância Ambiental. Um dos aspectos mais desafiadores neste contexto refere-se ao saneamento, uma vez que este é um dos exemplos mais marcantes da interação entre saúde e ambiente. A política federal de saneamento básico possui suas diretrizes estabelecidas na Lei nº 11.445, de 05 de janeiro de 2007, sendo o saneamento compreendido em sua visão ampla por: serviços de abastecimento de água, esgotamento sanitário e tratamento dos efluentes, coleta e destinação final dos resíduos sólidos, drenagem urbana e controle de vetores, associados aos aspectos de saúde e do meio ambiente natural e construído (TEIXEIRA et al., 2020).

A proteção à saúde, uma das atribuições da VISA, é colocada invariavelmente como uma das consequências benéficas do saneamento (BEZERRA, 2017). Sabe-se, no entanto, que a construção de indicadores epidemiológicos para o saneamento pode ser afetada pela representatividade dos dados disponíveis. Apesar das relações entre recursos hídricos, saneamento e saúde serem consolidadas, no Brasil, estes setores são geridos por uma grande diversidade de órgãos federais, estaduais e municipais, o que dificulta a análise integrada de dados sobre qualidade e quantidade da água, o acesso da população a este recurso, bem como sobre sua condição de saúde (BARCELLOS; QUITÉRIO, 2006).

Os efeitos das intervenções de saneamento são geralmente positivos, por se constituírem em um serviço que assegura melhoria e bem-estar da população, de forma que a sua garantia representa uma importante estratégia na promoção da saúde mundial. No Brasil, a distribuição adequada do saneamento perpassa entraves

políticos e governamentais a fim de atender toda a população e o déficit no acesso aos serviços básicos atinge principalmente as populações mais carentes e em situações de vulnerabilidade econômica e social (SANTOS et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2020). A inexistência ou ineficácia de serviços de saneamento, por sua vez, favorece o agravamento de problemas de saúde e interfere na qualidade de vida da população, pois as águas residuais não tratadas, muitas vezes dispostas diretamente nos corpos hídricos, constituem veículos para disseminação de doenças e oferecem danos ao meio ambiente, como contaminação do solo e dos recursos hídricos disponíveis (CARVALHO, 2016).

O processo de tratamento de águas residuais é realizado em Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) e pode ser classificado em níveis de eficiência da redução da carga poluidora: preliminar, primário, secundário ou terciário. A maioria das estações alcança apenas o nível de tratamento secundário, que inclui a degradação biológica de compostos carbonáceos em reatores biológicos, uma vez que esse procedimento proporciona um reduzido nível de poluição por matéria orgânica e possibilita o lançamento do efluente diretamente no corpo hídrico receptor (BRANCO et al., 2021).

O tratamento de águas residuais é capaz de reduzir a quantidade de microrganismos em várias ordens de grandeza, mas grandes quantidades de bactérias ainda atingem os recipientes de água com os efluentes evacuados e comprometem a segurança microbiológica dos corpos d'água superficiais (GOTKOWSKA-PŁACHTA, 2021). Concomitantemente, uma questão que representa grande preocupação dentro desse contexto são os micropoluentes emergentes (MPEs), que compreendem uma ampla gama de compostos orgânicos naturais e sintéticos, incluindo produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais, detergentes, hormônios esteróides, resíduos de antimicrobianos, produtos químicos industriais, pesticidas e muitos outros contaminantes de preocupação emergente (WANDA et al., 2017).

1.2.1 Micropoluentes emergentes

As águas residuais de estações de tratamento de esgoto municipais e sistemas sépticos contêm uma variedade de MPEs. Em contrapartida, a maioria das ETEs são projetadas apenas para reduzir as cargas de nutrientes e patógenos, não para remover esses compostos (GUARDIAN et al., 2021). Desta forma, as ETEs constituem a principal rota de transferência de contaminantes emergentes a serem liberados no ecossistema, além de outras rotas menores (ABBOTT et al., 2020). Muitos desses compostos chegam ao final do tratamento do efluente devido à sua característica hidrofílica, degradação parcial, persistência e a introdução contínua no meio. Consequentemente, os MPEs chegam ao ambiente aquático onde o efluente tratado é direcionado, tornando-se uma ameaça à saúde e ao meio ambiente, podendo também comprometer a indústria de água potável que utiliza esse recurso hídrico.

A ocorrência de MPEs no ambiente aquático tem sido frequentemente associada a uma série de efeitos negativos, incluindo toxicidade a curto e longo prazo, efeitos de desregulação endócrina e agravo na resistência de microrganismos aos antimicrobianos (LUO et al., 2014). A onipresença desses compostos tem sido cada vez mais identificada em fontes de água superficiais e subterrâneas como resultado do influxo de efluentes de ETEs, sistemas de descarte de águas residuais no local, escoamento de lavagem de estradas, campos agrícolas e atividades recreativas (ELLIOTT et al., 2018; LUO et al., 2014; SUBEDI et al., 2015). Além disso, o aumento contínuo do uso de produtos químicos como os MPEs, que acabam alcançando corpos hídricos, oferece desafios às agências reguladoras em seus esforços para implementar e atualizar os critérios de qualidade da água (GUARDIAN et al., 2021).

Algumas resoluções nacionais regulamentam o lançamento de efluentes em níveis seguros e sustentáveis para o meio ambiente, como a Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) nº 430 de 13 de maio de 2011, que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. No entanto, os parâmetros relacionados aos MPEs, como resíduos de antimicrobianos, não estão presentes na legislação brasileira. Não há evidências da remoção total desses micropoluentes após o tratamento de afluentes, representando um risco para o ecossistema aquático e para a população.

Diante desse contexto, cabe ressaltar que a presença de resíduos de antimicrobianos em efluentes é um ponto problemático, uma vez que esses

compostos podem contribuir para seleção de bactérias resistentes aos antimicrobianos (BRA) e promover a disseminação desses microrganismos e seus determinantes de resistência no ambiente, aumentando assim a resistência antimicrobiana, que constitui um preocupante agravamento na saúde pública (BRANCO et al., 2021).

1.3 Resistência antimicrobiana

A ocorrência de patógenos resistentes aos antimicrobianos é considerada uma ameaça à saúde pública em todo o mundo. O aumento da resistência antimicrobiana (RAM) é um problema crescente e está associado a vários fatores, de forma que requer uma ação ampla e coordenada para conter ou diminuir o problema (RABELLO et al., 2020). Antes da pandemia de COVID-19, a resistência aos antimicrobianos constituía a crise de saúde mais urgente do mundo (GONZALEZ-ZORN, 2021). Estima-se que a RAM seja responsável por 25.000 mortes por ano na União Europeia e 700.000 mortes por ano em todo o mundo. Também foi previsto que até 2050, a RAM será responsável por mais mortes do que outros problemas de saúde graves, como o câncer (COMISSÃO EUROPEIA, 2017; O'NEILL, 2016).

A RAM constitui uma ameaça na progressão não apenas na saúde humana, mas também no âmbito animal e no meio ambiente. Considerando uma perspectiva de Saúde Única, na qual saúde humana, animal e o meio ambiente estão intimamente interligados, os impactos ambientais e as ações em setores da saúde humana e animal são contribuintes no processo de disseminação da RAM (HERNANDO-AMADO et al., 2020; MITCHELL et al., 2020).

Bactérias são microrganismos que possuem uma tendência natural a adquirir e disseminar determinantes de resistência aos antimicrobianos. No entanto, a exposição aos fármacos ou seus resíduos é um fator que contribui e acelera o processo de desenvolvimento da RAM. Esse fenômeno pode ocorrer por evolução vertical, onde há mutação de genes existentes, ou pela aquisição de genes de resistência aos antimicrobianos (GRA) por meio de elementos genéticos móveis (EGMs), como plasmídeos, transposons e fagos (HAMIWE et al., 2019). Esses determinantes de resistência são disseminados principalmente pela transferência horizontal de genes

(THG) mediada pelos EGMs, que pode ocorrer, inclusive, entre bactérias de diferentes espécies (AN et al., 2018).

A disseminação de GRAs é preocupante, uma vez que esses elementos podem ser compartilhados com bactérias patogênicas que causam infecções no homem e em animais. Considerando que a principal força motriz por trás da disseminação da RAM entre as bactérias ambientais e clínicas é a THG mediada por EGMs, tanto bactérias quanto seus determinantes de resistência devem ser considerados em sistemas de vigilância. Existem evidências de que a THG é um processo comum em locais com águas superficiais, águas residuais, solo e animais (CHECCUCCI et al., 2020; GOULIOURIS et al., 2019; TESFAYE et al., 2019; ZAHEER et al., 2020).

1.3.1 Resistência antimicrobiana em ecossistemas aquáticos

As BRA podem entrar e persistir no meio ambiente por meio de várias vias, sendo uma delas a descarga de águas residuais nos corpos hídricos (BENGTSSON-PALME; KRISTIANSSON; LARSSON, 2018). As águas residuais são tratadas para reduzir as concentrações de poluentes a níveis ambientalmente seguros. No entanto, vários compostos químicos e bactérias fecais patogênicas, incluindo bactérias resistentes e seus GRAs, alcançam corpos d'água superficiais por meio de efluentes. Esses poluentes influenciam na qualidade microbiológica e a segurança epidemiológica dos ecossistemas naturais (GOTKOWSKA-PŁACHTA, 2021). Portanto, as bactérias e seus metabólitos são evacuados com as águas residuais e perturbam o equilíbrio natural da microbiota que coloniza os sistemas aquáticos.

As ETEs, por sua vez, constituem uma peça-chave nesse contexto, pois reúnem BRA e GRAs, assim como resíduos de antimicrobianos, que favorecem a seleção de microrganismos resistentes, e podem ser consideradas ambientes favoráveis para troca de informações genéticas entre bactérias, incluindo EGMs e GRAs (ORAVCOVA et al., 2017). Deve-se considerar ainda que o efluente tratado pelas ETEs é direcionado a corpos hídricos receptores, que podem ser destinados ao tratamento e abastecimento de regiões urbanas e metropolitanas. Além disso, são utilizados em diversas atividades antropogênicas, como atividades recreativas ou de

reuso para agropecuária. Consequentemente, as BRA podem atingir o homem por meio da sua dispersão ambiental (HERNANDO-AMADO et al., 2020).

As ETEs são indicadas como ambientes ideais para investigar a epidemiologia da RAM a partir de uma perspectiva de Saúde Única e constituem possíveis pontos de controle para a disseminação ambiental da RAM (SANDERSON et al., 2020). Diante desse contexto, alguns microrganismos de relevância clínica e mecanismos de resistência importantes podem ser estudados a partir do ambiente aquático de ETEs.

Alguns patógenos se destacam no cenário preocupante instituído pela RAM. Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) listou patógenos prioritários que apresentam resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções causadas por esses microrganismos e dentre os microrganismos classificados como prioridade alta está *Enterococcus faecium*, um patógeno oportunista cujo gênero ao qual pertence inclui microrganismos que servem como importantes marcadores de qualidade da água (GOTKOWSKA-PŁACHTA, 2021; TACCONELLI et al., 2018).

1.4 Gênero *Enterococcus*

Enterococcus spp. é um gênero ubíquo, constituído de espécies de bactérias adaptadas a uma variedade de hospedeiros e ambientes, sendo amplamente encontrados em solo, água e alimentos. Apesar de constituírem a microbiota de humanos e animais, nas últimas décadas essas bactérias se destacaram como patógenos oportunistas emergentes pela capacidade de causar infecções nosocomiais graves, como endocardites, infecções no trato urinário e bacteremia (LEE et al., 2019; RAZA et al., 2018). Além disso, os enterococos também são microrganismos usados para monitorar a qualidade da água e detectar ameaças sanitárias e epidemiológicas em todo o mundo, pois atuam como indicadores indiretos dos riscos associados à disseminação de outros patógenos em ecossistemas aquáticos e à transmissão de doenças veiculadas pela água (GOTKOWSKA-PŁACHTA, 2021).

O gênero *Enterococcus* é composto por cerca de 40 espécies diferentes, sendo *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* as espécies mais comumente isoladas

de fezes humanas e amostras de infecções (HAMIWE et al., 2019). Outras espécies que também são detectadas incluem *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* e *E. raffinosu* (IWERIEBOR et al., 2015).

Os microrganismos pertencentes a este gênero são cocos Gram-positivos que, na análise microscópica, se apresentam aos pares ou em pequenas cadeias. Não apresentam enzima catalase, não formam esporos e são anaeróbios facultativos. Embora cresçam na presença de oxigênio, não possuem metabolismo respiratório, realizando metabolismo homofermentativo com a produção de ácido láctico como principal substância no final da via de consumo da glicose, sem a produção de gás. Enterococos também hidrolisam a esculina e são capazes de crescer na presença de azida (até 0,4%), sendo este um fator de seleção para esses microrganismos. Ademais, esses microrganismos crescem em condições muito variadas de temperatura (de 10 a 45 °C) e pH (pH 4.5–10.0), crescerem em altas concentrações de NaCl (6,5%) e apresentarem particular resistência à secagem e à bile (40 %) (LEE et al., 2019; MONTICELLI et al., 2018). Entre as bactérias não esporuladas, os enterococos são as mais termotolerantes conhecidas (SCHEIDEGGER, 2009).

Em relação às características genotípicas, enterococos apresentam um conteúdo de guanina-citosina (GC) baixo (cerca de 34 a 45%), um tamanho de genoma variando de 2,3 a 5,4 Mb com 2.154 a 5.107 genes previstos. O genoma cerne do gênero apresenta um número de genes variando de 605 a 1.037, dependendo dos dados e critérios utilizados para análise, enquanto o pangenoma é maior e reflete a natureza altamente plástica de seus genomas e adaptações de nicho particulares (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

1.4.1 Relevância clínica

Embora a maioria das espécies de *Enterococcus* spp. não seja considerada patogênica, *E. faecium* e *E. faecalis* têm se tornado cada vez mais importantes agentes etiológicos de infecções hospitalares, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (HAMIWE et al., 2019). Os enterococos são uma das principais causas de endocardites em ambiente hospitalar (SLIPCZUK et al., 2013) e a resistência que esses microrganismos apresentam em relação aos fármacos

utilizados no tratamento das infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS) é preocupante. A resistência a vancomicina tem sido a maior preocupação dentre essas bactérias, principalmente *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (VREfm). Essa espécie foi incluída no grupo “ESKAPE”, descrito originalmente por Rice (2008), que indica seis microrganismos de preocupação frequentemente associados a infecções hospitalares e que apresentam resistência significativa aos antimicrobianos disponíveis atualmente.

As infecções causadas por enterococos representam uma ameaça real à saúde humana, principalmente devido ao seu comportamento frente aos antimicrobianos de uso terapêutico. Os enterococos não são organismos altamente virulentos, e o sucesso de *E. faecalis* e *E. faecium* como patógenos no ambiente hospitalar está principalmente relacionado à sua capacidade de sobrevivência em um ambiente hostil e rico em antimicrobianos (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

1.4.2 Resistência aos antimicrobianos

Bactérias do gênero *Enterococcus* ganharam considerável importância como patógeno nosocomial particularmente pelas características de resistência intrínseca e adquirida aos antimicrobianos mais comumente administrados nos tratamentos das infecções graves causadas por Gram-positivos. A resistência a múltiplas drogas utilizadas no tratamento das infecções é comum, o que prolonga o tempo de hospitalização, aumenta o custo e o risco de falha do tratamento, ocasionando a morte de pacientes acometidos nessas enfermidades (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

A capacidade natural dos enterococos de adquirir, acumular e compartilhar elementos extracromossômicos que codificam características de virulência ou de resistência aos antimicrobianos contribui para o esclarecimento a respeito da importância desse patógeno oportunista (KILBAS; CIFTCI, 2018). Enterococos podem compartilhar genes por meio de EGMs e, conseqüentemente, esses microrganismos podem acumular e transferir GRAs para outras bactérias.

Enterococcus spp. são intrinsecamente resistentes a vários antimicrobianos, incluindo cefalosporinas e trimetoprim-sulfametoxazol, e apresentam resistência

moderada aos β -lactâmicos e aminoglicosídeos (ZAHEER et al., 2020). A resistência intrínseca mais significativa observada nesses microrganismos é a resistência aos aminoglicosídeos, resistência à ampicilina induzida por β -lactamases e aos glicopeptídeos (RAZA et al., 2018), uma vez que esses antimicrobianos apresentam uso terapêutico relevante.

Enterococos são intrinsecamente resistentes à maioria dos β -lactâmicos, sendo suscetíveis a um número limitado de penicilinas (ampicilina, mezlocilina, penicilina e piperacilina). A resistência a estas penicilinas é obtida por meio de dois mecanismos: produção de β -lactamases e expressão de uma proteína de ligação à penicilina de baixa afinidade (PBP), designada PBP4 em *E. faecalis* e PBP5 em *E. faecium*, sendo este segundo mecanismo o mais comum (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

Outro mecanismo intrínseco significativo de resistência aos antimicrobianos ocorre em relação às concentrações clinicamente alcançáveis de aminoglicosídeos, de forma que os fármacos dessa classe (principalmente estreptomicina e gentamicina) são úteis apenas para obter sinergismo bactericida em combinação com agentes ativos na parede celular desses microrganismos (penicilina ou vancomicina). A resistência intrínseca moderada (CIM, 62-500 $\mu\text{g/ml}$) devido a uma baixa permeabilidade celular, que pode ser resolvida pela adição de penicilina que facilita a entrada dos aminoglicosídeos na célula (GARRIDO, 2014). A resistência de alto nível aos aminoglicosídeos (CIM > 500 $\mu\text{g/ml}$ a gentamicina e >1.000 $\mu\text{g/ml}$ para estreptomicina) é frequentemente mediada por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, como fosfotransferases (APHs), acetiltransferases (AACs) e nucleotidiltransferases (ANTs). É importante ressaltar que esses mecanismos de resistência abolem a atividade bactericida sinérgica dos aminoglicosídeos em combinação com agentes ativos na parede celular que são importantes no tratamento de infecções enterocócicas graves (BROOKS et al., 2014).

A resistência adquirida aos macrolídeos é frequentemente associada a aquisição dos genes *erm*, e ocorre pela modificação do alvo de ação desses fármacos (subunidade 23S do RNA ribossomal) por meio de mutações específicas. Além disso, outros mecanismos de resistência a esta classe podem ser encontrados em enterococos, incluindo bombas de efluxo, que removem moléculas dos antimicrobianos de dentro da célula bacteriana, e menos frequentemente pode ocorrer a hidrólise do anel lactona da molécula do fármaco (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

As fluoroquinolonas têm atividade moderada contra enterococos, por mais que essa resistência seja comum em cepas clínicas de *E. faecium*. Ciprofloxacina e levofloxacina, por exemplo, tem seu uso restrito ao tratamento de infecções do trato urinário por cepas suscetíveis. A resistência de alto nível é frequentemente associada a mutações em *gyrA* e *parC* (ESFAHANI et al., 2020).

Entre os mecanismos de resistência já elucidados, o mais importante está relacionado aos glicopeptídeos, principalmente a vancomicina, por serem os fármacos de escolha no tratamento de infecções graves causadas por Gram positivos, como endocardite. O principal mecanismo de resistência aos glicopeptídeos envolve uma menor afinidade dessas moléculas aos precursores de peptidoglicano das bactérias que são o alvo terapêutico, permitindo a síntese da parede celular apesar da exposição ao antimicrobiano (RAZA et al., 2018).

1.5 *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina

Os primeiros relatos de Enterococos Resistentes a Vancomicina (VRE) foram reportados na Inglaterra e na França em 1988 e, desde então, têm sido relatados em várias partes do mundo. No Brasil, as infecções por VRE foram descritas pela primeira vez em 1998 e, embora nunca se tornem verdadeiramente endêmicas, geralmente ressurgem em surtos esporádicos (PILLONETTO et al., 2021; RESENDE et al., 2014; ZANELLA et al., 1999).

As opções de tratamento para o VRE incluem tigeciclina, linezolid, daptomicina, quinipristindalfopristina, platensimicina, nitrofurantoína e fosfomicina com alguns relatos de resistência. Modificações na estrutura da vancomicina também mostraram grande promessa no tratamento do VRE (RAZA et al., 2018). No entanto, é válido ressaltar que uma das maiores preocupações em relação ao VRE é resistência a múltiplos antimicrobianos que pode estar presente nesses microrganismos, o que não é raro e torna as opções terapêuticas para o tratamento de infecções muito limitadas ou inexistentes.

Enterococcus faecium se destaca em relação aos demais patógenos oportunistas do gênero ao qual pertence pela sua capacidade de adquirir e expressar

genes de resistência antimicrobiana com mais frequência (LEE et al., 2019). *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina (VREfm) se tornaram uma preocupação global, pois os surtos causados por esses microrganismos resistentes não apenas incorrem em custos significativos para os sistemas de saúde, mas também colocam pacientes vulneráveis em maior risco de adquirir infecções fatais (GALLOWAY-PEÑA et al., 2009).

A vancomicina é um antimicrobiano da classe dos glicopeptídeos, que atua interferindo na síntese da parede celular de bactérias Gram-positivas ao interagirem com o grupo D-Alanil-D-Alanina das cadeias pentapeptídicas dos precursores do peptidoglicano, que constitui um elemento essencial da parede celular bacteriana. Em condições normais, a síntese do peptidoglicano em *Enterococcus* spp. é realizada por uma enzima ligase que une duas moléculas de D-Alanina para formar D-Ala-D-Ala. O UDP-N-acetilmuramilpentapeptídeo forma-se pela adição de D-Ala-D-Ala ao UDP-N-acetilmuramil-tripeptídeo. Através da transglicosilação, o pentapeptídeo formado é incorporado no peptidoglicano por meio das pontes cruzadas da transpeptidação, com a finalidade de fortalecer a camada de peptidoglicano (BROOKS et al., 2014; RAZA et al., 2018).

Desde seu primeiro uso, em 1958, a vancomicina tem sido usada no tratamento de infecções bacterianas Gram-positivas. Os enterococos tornam-se resistentes a este fármaco por meio da aquisição de genes através do plasmídeo ou transposons, dificultando o tratamento de infecções causadas por essas bactérias (RAZA et al., 2018). A resistência ocorre devido à alteração na porção terminal do peptidoglicano, que leva à diminuição da afinidade do antimicrobiano pelo sítio de ação. De acordo com o padrão de resistência apresentado, existem vários genótipos e fenótipos, cuja base da resistência resulta na produção de precursores de peptidoglicanos cuja porção terminal é diferente de D-alanil-D-alanina, o principal alvo da vancomicina (BROOKS et al., 2014).

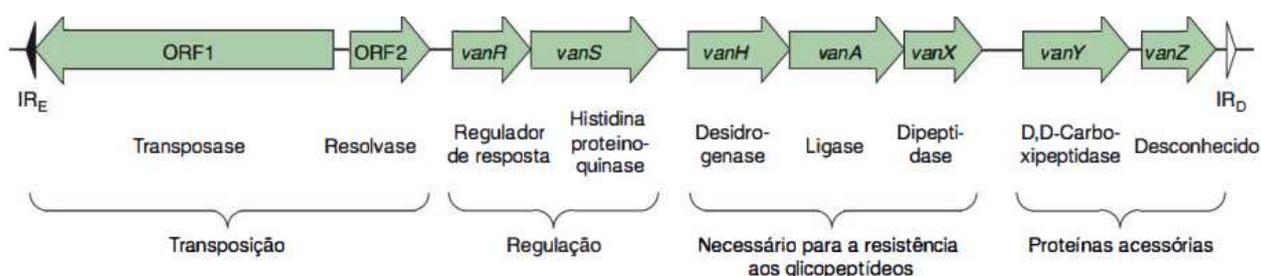
Existem duas classificações feitas para avaliar a resistência à vancomicina em enterococos: fenotípica e genotípica. Até o momento, a classificação genotípica é baseada em nove tipos de genes (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanF*, *vanG*, *vanM*, *vanN*) que conferem resistência de nível alto a moderado à vancomicina e à teicoplanina (glicopeptídeo que representa uma peça importante na caracterização do fenótipo de resistência a vancomicina) (RAZA et al., 2018).

Entre esses genes, os fenótipos expressos *vanA* e *vanB* são os mais prevalentes no VRE, causando infecções em humanos. O fenótipo de *vanA* é o mais relevante, pois confere alta resistência à vancomicina (CIM > 64 µg / mL) e teicoplanina (CIM > 16 µg / mL). O fenótipo de *vanB* exibe resistência induzida vancomicina, porém susceptibilidade à teicoplanina. As cepas com *vanC* exibem resistência intermediária a moderada à vancomicina, sendo este fenótipo constitutivo nas espécies isoladas em menor frequência como *Enterococcus gallinarum* (*vanC-1*) e o *Enterococcus casseliflavus* (*vanC-2* e *vanc-3*) (BROOKS et al., 2014; IWERIEBOR et al., 2015).

1.5.1 Gene *vanA*

O determinante da resistência à vancomicina mais estudado é o operon *vanHAX*, um sistema de genes agrupados em um plasmídeo autotransferível. O agrupamento de genes associados ao *vanA* é transportado por plasmídeo e codificado por um transposon de 10,8 kb identificado como Tn1546 (Figura 1), que torna o gene transferível (SIMJEE et al., 2002).

Figura 1. Representação do transposon Tn1546 de *Enterococcus faecium*, que carrega o gene *vanA* e codifica a resistência à vancomicina.



Nota: ORF1 e ORF2 constituem as fases de leitura aberta, associadas transposição do transposon. IRE e IRO indicam as repetições invertidas à esquerda e à direita do transposon, respectivamente.

Fonte: BROOKS et al., 2014.

O gene *vanA* codifica uma enzima ligase necessária para a síntese de D-Ala-D-Lac, que é um substrato alterado utilizado para a composição da parede celular da bactéria. A vancomicina apresenta baixa afinidade pelo D-Ala-D-Lac em comparação ao produto dipeptídeo normal D-Ala-D-Ala (SOOD et al., 2008). Enquanto isso, o gene *vanH* codifica uma desidrogenase que reduz o piruvato a D-Lac, criando assim um pool do substrato alterado para síntese de D-Ala-D-Lac (AHMED; BAPTISTE, 2018).

O gene *vanX*, por sua vez, hidrolisa D-Ala-D-Ala para reduzir sua incorporação em moléculas precursoras da parede celular. Além disso, também existem genes com importante função regulatória para a expressão do operon *vanHAX*. O gene *vanS* é uma histidina quinase ligada à membrana que atua detectando a presença de vancomicina e teicoplanina e sinaliza para *vanR*, um regulador da resposta citoplasmática, que atua como um ativador transcricional responsável pela síntese de genes *vanHAX* (HILL et al., 2010). Desta forma, nota-se que o gene *vanA* não é responsável por conferir resistência sozinho, mas existem outros genes que regulam e expressam a resistência.

1.5.2 Disseminação ambiental da resistência à vancomicina

A estratégia de prevenção e controle do VREfm em ambiente hospitalar inclui a limitação do uso excessivo ou inadequado de vancomicina, evitar hospitalizações desnecessárias, treinamento da equipe do hospital para triagem e notificação imediata do VREfm e empregar limpeza ambiental sem toque para impedir a transmissão de pessoa para pessoa (RAZA et al., 2018). No entanto, a disseminação desse microrganismo no meio ambiente constitui um problema mais complexo. A exposição de enterococos à vancomicina pode ocorrer pela presença de resíduos de antimicrobianos no ambiente. Essa exposição contínua aos fármacos é um fator que contribui para acelerar o processo da RAM. Além disso, a disseminação de VREfm pode ocorrer por vias que indiretamente afetam o homem, tornam-se uma preocupação para saúde pública (ZAHEER et al., 2020).

Tanto enterococos quanto antimicrobianos são excretados na urina e nas fezes de humanos e animais e, em nações desenvolvidas urbanizadas, a maior parte desses resíduos é transportada e tratada em ETEs antes de serem despejadas em águas superficiais (SANDERSON et al., 2020). Diversos estudos relatam a presença de VREfm em ETEs e águas residuais ao redor do mundo, alertando sobre o aspecto problemático que esses dados representam no contexto da RAM (EKWANZALA et al., 2020; GOULIOURIS et al., 2019; IWERIEBOR et al., 2015; ORAVCOVA et al., 2017). Os três fenótipos mais comumente relatados nesses ambientes são atribuídos aos genes *vanA*, *vanB* e *vanC* (GOULIOURIS et al., 2019). No entanto, no Brasil não há

dados disponíveis na literatura sobre a presença desses microrganismos em ETEs e efluentes.

1.5.3 Detecção da resistência antimicrobiana

A detecção de VREfm e da resistência antimicrobiana que esses microrganismos apresentam pode ser realizada por métodos fenotípicos, como Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (TSA), e métodos genotípicos, que incluem a detecção de genes de resistência por técnicas de biologia molecular, principalmente pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Atualmente, uma técnica útil para o entendimento abrangente da resistência antimicrobiana em isolados bacterianos é o sequenciamento do genoma completo (WGS), que pode revelar informações relacionadas a THG e aos EGMs, como plasmídeos, fagos, ilhas genômicas e recombinação homóloga (TYSON et al., 2018). Assim, o estudo genético detalhado do genoma da VREfm torna-se um importante aliado para o conhecimento sobre a dinâmica da resistência antimicrobiana.

1.6 Sequenciamento Completo de Genoma

As tecnologias genômicas oferecem a promessa de melhorias substanciais no desempenho de estudos relacionados à caracterização de microrganismos e microbiotas. Dentro do contexto da RAM, o sequenciamento de genoma completo (*Whole Genome Sequencing* – WGS) de bactérias transformou a compreensão global da resistência antimicrobiana, gerando novos insights na genética subjacente à resistência, e vem sendo inserido como uma ferramenta muito útil para melhor compreensão da resistência de microrganismos de preocupação para saúde pública (KÖSER; ELLINGTON; PEACOCK, 2014; TYSON et al., 2018).

Uma das vantagens relacionadas às técnicas genômicas é a rápida obtenção de resultados. Por exemplo, caracterizar a resistência antimicrobiana usando métodos atuais baseados em cultura pode levar aproximadamente de uma a três semanas, em

comparação com as propostas de menos de 12 horas usando tecnologias genômicas (ADU-OPPONG; GASPARRINI; DANTAS, 2017).

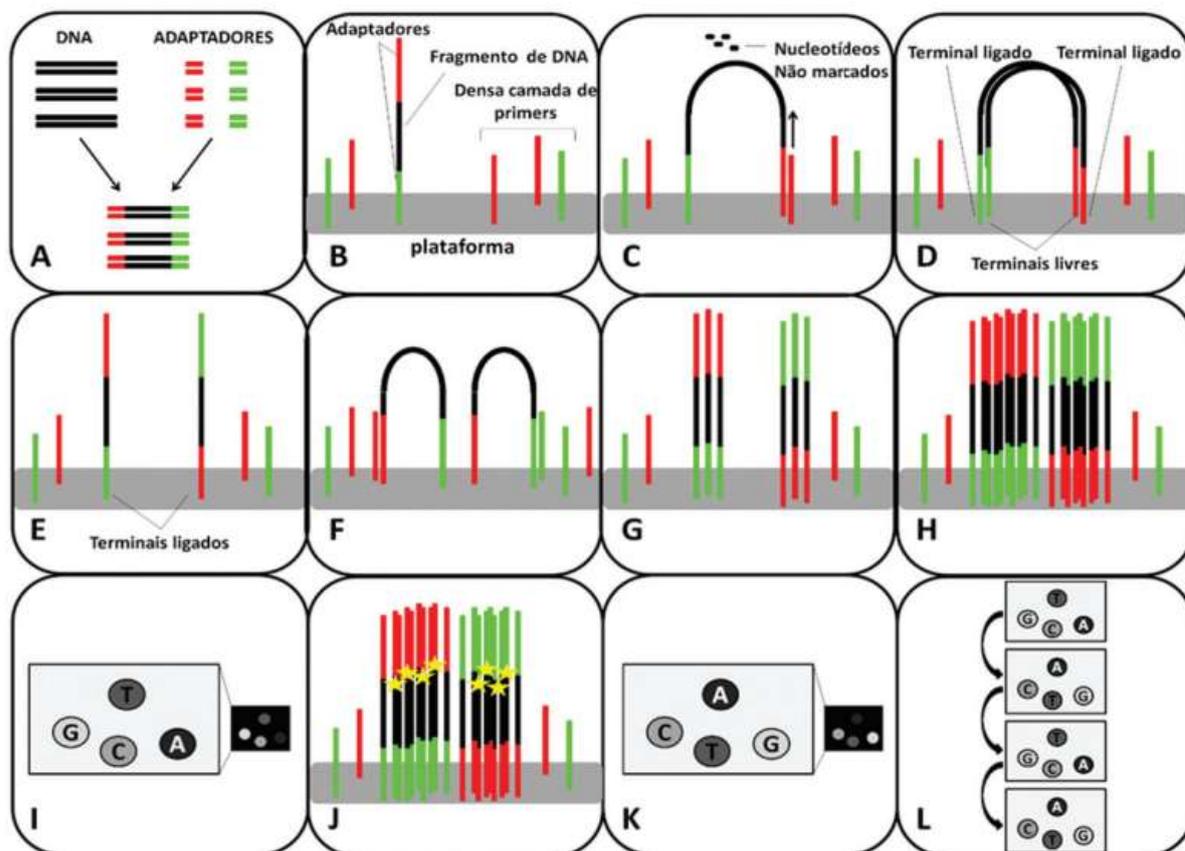
O sequenciamento genômico é uma técnica que permite identificar a sequência correta de nucleotídeos de uma molécula de DNA ou RNA, visando conhecer a informação genética contida nesta estrutura. As novas tecnologias de sequenciamento, denominadas de tecnologias de sequenciamento de nova geração, começaram a ser comercializadas em 2005 e estão evoluindo rapidamente (DE CARVALHO; DA SILVA, 2010). Atualmente existem diversas tecnologias voltadas para o sequenciamento do DNA em larga escala, sendo as mais utilizadas: o método Polony (SHENDURE et al., 2005) utilizado no sequenciador SOLID (Applied Biosystems) e o método de amplificação em ponte (BENNETT, 2004) utilizado no sequenciador *Genome Analyser* (Illumina-Solexa). Todas essas tecnologias promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida, permitindo a obtenção de genomas completos de bactérias e outros microrganismos de interesse científico e tecnológico.

No contexto clínico, a ferramenta de WGS tem o potencial de reduzir a exposição a drogas ineficazes e a evolução da resistência, reduzindo o diagnóstico para dias em vez de semanas. Ademais, o WGS também tem demonstrado ser uma ferramenta eficaz no monitoramento de microrganismos em diversos ambientes, inclusive em ecossistemas aquáticos e ETEs (SANDERSON et al., 2020; TYSON et al., 2018; ZAHEER et al., 2020).

Um dos sequenciadores mais utilizados para obter o WGS de bactérias é o da plataforma Illumina, um sequenciador que se baseia no conceito de sequenciamento por síntese. Para obtenção do sequenciamento de genoma completo nessa tecnologia, é necessária a construção de uma biblioteca de sequenciamento especial. A biblioteca é construída a partir da fragmentação aleatória do DNA da amostra, seguida da incorporação de adaptadores (pequenos fragmentos dupla-fita de DNA com sequência previamente conhecida) que se ligam às terminações 5' e 3' dos fragmentos oriundos da amostra (Figura 2-A). Além disso, os adaptadores adicionados possuem a presença de marcadores que permitem a distinção de amostras pelo sequenciador. Estas bibliotecas podem ser de dois tipos: paired-end, que proporciona o sequenciamento nas duas extremidades de reads com tamanho

entre 200 e 500 nucleotídeos; e mate-pair que também pode sequenciar as duas extremidades de reads maiores (de 2000 a 5000 nucleotídeos) (DE CARVALHO; DA SILVA, 2010; MOREIRA, 2015).

Figura 3. Sequenciamento na plataforma Illumina. (A) Ocorre a construção da biblioteca, em que DNA é fragmentado aleatoriamente e ligado a adaptadores A e B em ambas as extremidades. (B) Os fragmentos são colocados em uma placa de vidro (*flow cell*) onde está aderida uma densa camada de oligonucleotídeos complementares aos adaptadores contidos nas extremidades dos fragmentos, de maneira que os fragmentos possam então se ligarem à placa. (C) Ocorre a incorporação de nucleotídeos não marcados com fluorescência até que toda a extensão do fragmento seja amplificada. (D) O processo de amplificação "em ponte" é iniciado, evidenciando dois adaptadores presos a placa e outros dois livres. (E) Ocorre a desnaturação no ciclo e a "ponte" é desfeita mediante elevação de temperatura. (F) Um novo ciclo de amplificação se inicia e os adaptadores livres se ligam a adaptadores complementares na placa. (G) Clusters são formados, com milhares de fragmentos idênticos ligados à *flow cell*. (H) Com os clusters já formados, são adicionados didesoxinucleotídeos terminadores reversíveis contendo fluoróforos, junto com a enzima DNA polimerase, que fará a incorporação do didesoxinucleotídeo apropriado. A incidência de um feixe de raios laser excita os fluoróforos proporcionando emissão de luz que difere em função da base incorporada. Com isso, em (I) observa-se o registro da imagem correspondendo a incorporação do primeiro didesoxinucleotídeo. (J) Ocorrem sucessivos ciclos de incorporação dos didesoxinucleotídeos marcados e a incidência de raios laser que ocasiona a emissão de luz. (K) Ocorre um novo registro da imagem, que é captada pelo equipamento. (L) A leitura é feita de forma sequencial, o que permite a montagem da sequência completa de cada cluster.



Fonte: MOREIRA, 2005.

A partir da obtenção da biblioteca de sequenciamento, ocorre um procedimento de amplificação, no qual a biblioteca preparada é adicionada à uma superfície, denominada *flow cell*, que contém uma camada de oligonucleotídeos imobilizados e complementares aos adaptadores contidos nos fragmentos da amostra (Figura 2-B). Em seguida, os fragmentos são amplificados pela técnica de amplificação “em ponte”, que permite a formação de aglomerados (clusters) de fragmentos do tipo fita simples (Figura 2-C, D E, F). A etapa de amplificação consiste em vários ciclos de PCR de fase sólida, permitindo a formação de diversos clusters contendo cerca de 1000 cópias de um mesmo fragmento de fita simples (CARVALHO, 2016; MOREIRA, 2015).

O sequenciamento por síntese ocorre a partir da formação de clusters (Figura 2-G). Uma mistura para as reações de sequenciamento é aplicada à *flow cell*, contendo os quatro didesoxinucleotídeos necessários para reação, encontrados como terminadores reversíveis marcados com fluoróforo, além dos iniciadores e da enzima DNA polimerase (Figura 2-H). A alta densidade dos clusters de sequenciamento possibilita que o sinal de fluorescência gerado com a incorporação de cada um dos nucleotídeos terminadores tenha uma intensidade suficiente para garantir sua detecção exata. Após a incorporação de cada nucleotídeo no fragmento em síntese, um laser é aplicado à superfície, excitando o fluoróforo do nucleotídeo terminador e a leitura do sinal de fluorescência é realizada pelo equipamento (Figura 2-I). Em seguida, ocorre uma etapa de lavagem para remoção dos reagentes excedentes e remoção do terminal 3' bloqueado e do fluoróforo do nucleotídeo incorporado no ciclo anterior para que a reação de sequenciamento prossiga (Figura 2-J). A leitura das bases é feita pela análise sequencial das imagens capturadas em cada ciclo de sequenciamento (Figura 2-K, L) (CARVALHO, 2016; DE CARVALHO; DA SILVA, 2010). Dessa forma, são realizados diversos ciclos de síntese consecutivamente e as sequências de milhões de clusters presentes na placa são determinadas simultaneamente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a análise genômica da resistência antimicrobiana de *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina recuperados de amostras de águas residuais oriundas de Estações de Tratamento de Efluentes.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina de amostras de águas residuais de ETEs;
- Verificar fenotipicamente a susceptibilidade aos antimicrobianos dos microrganismos identificados como *Enterococcus faecium* que forem recuperados das amostras;
- Detectar a presença do gene *vanA* em isolados VREfm;
- Obter a sequência completa do genoma de *Enterococcus faecium* carreando o gene *vanA* e, a partir disso, analisar o perfil genotípico de resistência, virulência e patogenicidade desses microrganismos, assim como a relação clonal entre eles.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta e Amostragem

Foram selecionadas cinco ETEs para este estudo, das quais foram coletadas amostras de efluentes (500 mL) em diferentes etapas do tratamento, incluindo o efluente tratado. Dentre as ETEs selecionadas, há uma que recebe esgoto misto, uma que recebe esgoto doméstico, duas recebem esgoto industrial e uma recebe esgoto hospitalar. Quatro dessas ETEs estão localizadas no Rio de Janeiro e outra está localizada em Brasília. As amostras foram coletadas em recipientes de vidro estéreis e transportadas para o laboratório para análise microbiológica. As amostras foram mantidas sob refrigeração e processadas em até 24 horas após a coleta.

As amostras da ETE 1 e ETE 2 foram obtidas em cinco pontos ao longo do tratamento. No entanto, nas restantes ETEs, não foi possível ter acesso a todos os pontos do processo de tratamento. Portanto, na ETE 3, ETE 4 e ETE 5 foram coletadas apenas amostras de esgoto bruto e tratado. A descrição correspondente aos pontos de coleta de amostras ao longo do processo de tratamento em cada ETE e o período em que a amostragem foi realizada estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Descrição da coleta e das estações de tratamento de efluentes selecionadas para este estudo.

Estações de tratamento de efluentes	Localização	Origem do resíduo	Pontos de coleta	Período da coleta
ETE 1	Rio de Janeiro, Brasil	Industrial	Cinco diferentes pontos ao longo do tratamento	Maio, 2019
ETE 2		Industrial		Fevereiro, 2020
ETE 3		Hospitalar	Esgoto bruto e tratado	Outubro, 2020
ETE 4		Misto		Outubro, 2020
ETE 5	Doméstico	Outubro, 2020		

3.2 Isolamento e identificação fenotípica de *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina

As amostras foram concentradas por filtração através de um filtro de nitrocelulose (0,22 µm). Para pré-selecionar cepas resistentes à vancomicina, os filtros foram colocados assepticamente em tubos contendo 5 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) com 4 mg/mL de vancomicina e incubados a 37 °C por 24-48 horas. Um tubo com caldo BHI sem vancomicina também foi inoculado e incubado para cada amostra como controle positivo do crescimento bacteriano. A concentração de antimicrobiano utilizada foi estabelecida de acordo com os valores de breakpoints clínicos definidos pelo EUCAST (2020). A partir dos tubos que apresentaram crescimento, os inóculos foram transferidos para placas BHI que também foram incubadas a 37 °C por 24-48 horas. Foi realizada a coloração de Gram utilizando colônias puras do crescimento bacteriano em placa. As bactérias Gram-positivas foram submetidas ao VITEK 2 Compact (bioMérieux) para identificação fenotípica. Apenas isolados identificados como *Enterococcus faecium* foram considerados para este estudo.

3.3 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi analisada usando o sistema VITEK 2 Compact. A partir da Concentração Inibitória Mínima obtida, os pontos de corte foram definidos de acordo com os critérios preconizados pelo EUCAST (2020) para *Enterococcus faecium*. Os isolados foram classificados como multirresistentes (MDR), extensivamente resistentes (XDR) e não-MDR de acordo com Magiorakos et al. (2012).

3.4 Detecção do gene *vanA*

A extração do DNA genômico (gDNA) foi realizada utilizando o PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A

detecção do gene *vanA* foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O volume final da mistura de reação foi de 25 µL, nas seguintes condições: 1µM de cada primer (A1+ 5'-GGGAAAACGACAATTGC-3' e A2-5'-GTACAATGCGGCCGTTA-3') (DUTKA-MALEN; EVERS; COURVALIN, 1995) e 1X GotTaq G2 Mastermix (Promega). A amplificação foi realizada com o seguinte perfil de ciclo térmico: 95 °C a 3 minutos; 35 ciclos de amplificação consistindo em 95 °C a 45 s, 54 °C a 45 s e 72 °C a 45 s; e 10 min a 72°C para a extensão final. O gDNA das cepas de referência *Enterococcus faecium* CBRVS 00653 (ATCC 51559) e *Enterococcus faecalis* CBRVS 00654 (ATCC 51575) foram utilizados como controle positivo e controle negativo, respectivamente. Os fragmentos de PCR foram sequenciados com o Kit de Sequenciamento de Ciclo BigDye™ Terminator v3.1 (ThermoFisher Scientific, EUA) e analisados no SeqStudio Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific, EUA). As pesquisas de similaridade de nucleotídeos foram realizadas online com BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) contra GenBank (NCBI) e software Resistance Gene Identifier (RGI) contra CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) (ALCOCK et al., 2020).

3.5 Sequenciamento completo do genoma e análise de bioinformática

Enterococcus faecium carreadores do gene *vanA* foram selecionados para o sequenciamento completo do genoma. A biblioteca foi preparada com o Kit de Preparação de Biblioteca de DNA Nextera XT (Illumina Inc, EUA) e o sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina MiSeq disponível no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) (Rede Genômica da Fiocruz). A ferramenta FastQC (ANDREWS, 2010) foi utilizada para avaliar a qualidade das leituras geradas. Os nucleotídeos ambíguos e as sequências do adaptador foram “trimados” usando Prinseq (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011). A montagem de sequências de alta qualidade foi realizada utilizando Unicycler (WICK et al., 2017). A qualidade dos genomas montados foi avaliada usando QUAST 2.0 (GUREVICH et al., 2013).

A ferramenta PubMLST (JOLLEY; BRAY; MAIDEN, 2018) foi utilizada para determinar os tipos de sequência multilocus (MLST) dos genomas montados. A presença de genes de resistência antimicrobiana, genes de fatores de virulência,

plasmídeos e elementos genéticos móveis foi investigada nos genomas montados. A avaliação genômica da resistência antimicrobiana foi realizada usando o RGI/CARD (ALCOCK et al., 2020) para investigar a presença de genes de resistência adquiridos e ResFinder (BORTOLAIA et al., 2020; ZANKARI et al., 2017) para avaliar mutações que induzem resistência. Os plasmídeos foram avaliados usando PlasmidFinder v2.1 (CARATTOLI et al., 2014) e ViralVerify (ANTIPOV et al., 2020). Elementos genéticos móveis (transposons e sequências de inserção) também foram avaliados usando MobileElementFinder v1.0.3 (JOHANSSON et al., 2021). Para verificar os fatores de patogenicidade e virulência (VFs), foram utilizados PathogenFinder v1.1 (COSENTINO et al., 2013) e VirulenceFinder 2.0 (JOENSEN et al., 2014), respectivamente.

3.6 Disponibilidade de dados das sequências de genomas

O conjunto de sequências dos genomas obtidos nesse trabalho foram depositados no GenBank sob o BioProject PRJNA708321.

4 RESULTADOS

4.1 Amostragem e identificação bacteriana

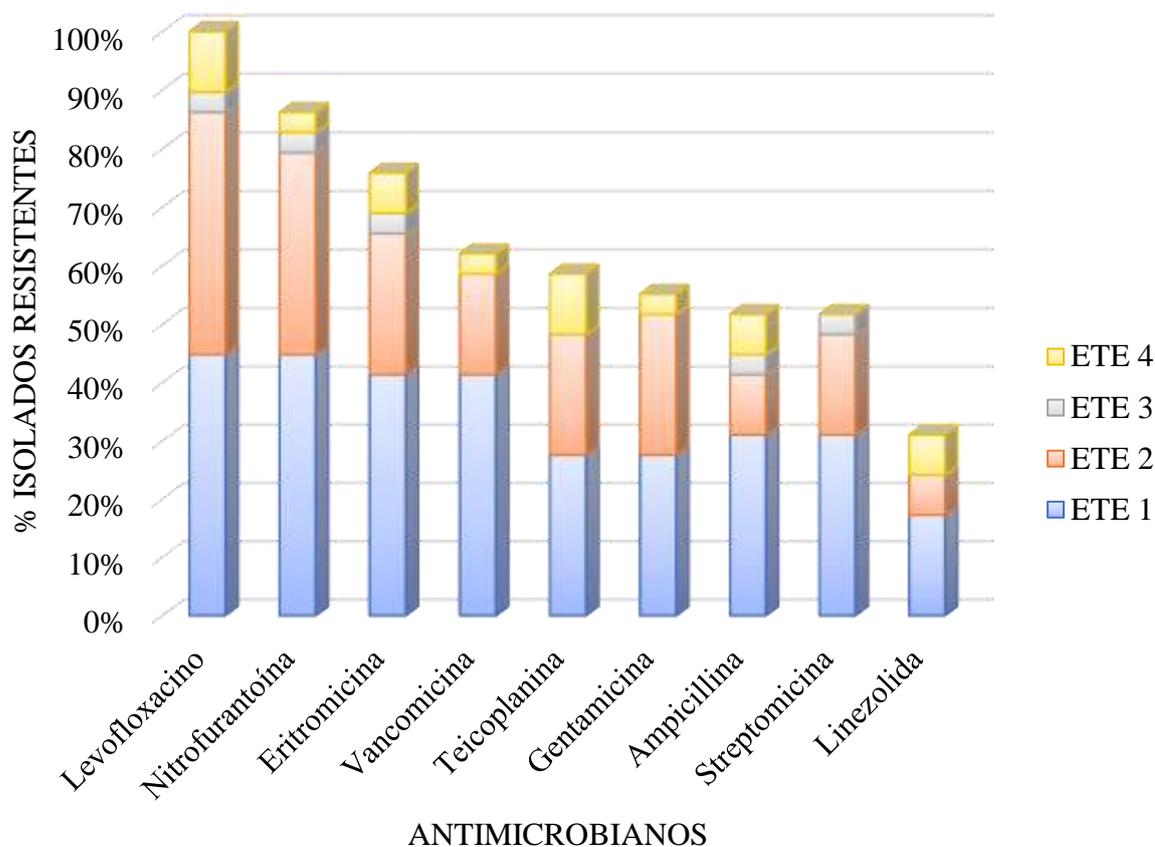
Foram obtidas 16 amostras de efluente das ETEs selecionadas, a partir das quais o isolamento microbiano foi feito. Todos os isolados Gram-positivos (n=67) foram identificados fenotipicamente por Vitek 2, resultando em 46 *Enterococcus* spp. dos quais 63% (29/46) foram identificados como *Enterococcus faecium*. Destes isolados de *E. faecium*, 44,8% (13/29) eram da ETE 1, 41,4% (12/29) da ETE 2, 3,4% (1/29) da ETE 3 e 10,4% (3/29) da ETE 4. Nenhum isolado de *E. faecium* foi recuperado da ETE 5. Entre os isolados recuperados, 41,4% (12/29) foram obtidos de efluentes tratados.

4.2 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

A suscetibilidade antimicrobiana foi verificada utilizando o Vitek 2 e verificou-se a resistência a 10 antimicrobianos de diferentes classes (Figura 3). Todos os isolados foram sensíveis à tigeciclina. Foi observado que 86,2% (25/29) dos isolados foram classificados como perfil MDR, dois como XDR e dois como não-MDR, sendo estes últimos resistentes apenas a levofloxacina e nitrofurantoína.

A expressão da resistência à vancomicina foi observada em 18 dos 29 isolados identificados como *E. faecium*. Destes, 12 (66,7%) expressaram o fenótipo *vanA* (alto nível de resistência à vancomicina e teicoplanina), sendo estes recuperados das seguintes estações de tratamento: ETE 1 (8/12), ETE 2 (3/12) e ETE 4 (1/12). Não foram recuperados isolados resistentes à vancomicina da ETE 3.

Figura 3 – Gráfico demonstrando a resistência antimicrobiana fenotípica de *Enterococcus faecium* recuperados de Estações de Tratamento de Efluentes.



4.3 Detecção do gene *vanA*

A reação de PCR para detectar o gene *vanA* revelou oito cepas de *E. faecium* (27,5%; 8/29) portadoras deste gene. Dentre estes, cinco eram de efluente tratado: dois da ETE 1, dois da ETE 2 e um da ETE 4. Os outros três isolados da ETE 1 e ETE 2 foram recuperados de pontos intermediários durante o tratamento do efluente. Todos os isolados positivos para presença de gene demonstraram perfil fenotípico de resistência MDR e apenas metade deles (4/8) expressou o fenótipo *vanA*.

4.4 Sequenciamento completo do genoma de *Enterococcus faecium* carreando o gene *vanA*

Oito cepas foram submetidas ao WGS (Tabela 2). Os parâmetros de sequenciamento para esses isolados estão descritos na Tabela 3. Os genomas de *E. faecium* apresentaram um baixo conteúdo GC variando de 37,7% a 38% e o comprimento médio dos genomas foi de 2,77 Mb, com 2755 a 3113 genes previstos.

Tabela 2 – Principais características das sequências genômicas obtidas neste estudo.

Isolados	Tamanho	Conteúdo GC (%)	N50	Número de contigs	Número de	
					sequências de codificação	Número de RNAs
P6398	2,792,885	37.9	72400	159	2877	60
P6406	2,786,665	38.0	114521	85	2784	61
P6407	2,933,145	37.8	13034	444	3113	19
P6727	2,690,730	37.8	161184	100	2755	60
P6739	2,704,300	38.0	160271	82	2774	61
P6745	2,686,823	37.8	196596	100	2758	59
P6756	2,691,472	37.8	161185	104	2764	60
P6875	2,906,800	37.7	40761	220	2994	58

4.4.1 Perfil genômico de resistência antimicrobiana

A resistência aos glicopeptídeos foi representada pelo cluster de genes de resistência à vancomicina *vanHAX*, além de três isolados da ETE 1 também apresentarem *vanG* (*vanRG*). Genes de resistência aos aminoglicosídeos foram encontrados em todos os isolados. Cinco isolados apresentaram genes capazes de fornecer alto nível de resistência aos aminoglicosídeos, como *aph(3')-IIIa* e *ant(6')-Ia*. O gene de resistência a macrolídeos *erm(B)* foi encontrado em cinco isolados, dos quais três estavam em plasmídeos. Bomba de efluxo de macrolídeos, como *msrC*, foi encontrada em todos os isolados, assim como *efrA* e *efrB*, que codificam duas

subunidades da bomba de efluxo EfrAB, também relacionadas a resistência à múltiplas drogas.

O gene *IsaA* estava presente em todos os isolados. Ele codifica uma bomba de efluxo ABC e confere resistência à clindamicina, quinupristina-dalfopristina e dalfopristina. Além disso, o gene *tet(M)* foi encontrado em três isolados e *tet(L)* em dois isolados, conferindo resistência às tetraciclinas. Mutações cromossômicas nos genes *gyrA* e *parC* foram detectadas em um isolado da ETE 4, atribuindo o fenótipo de resistência ao ácido nalidíxico e ciprofloxacino. Mutações no gene *pbp5* estiveram presentes em todos os isolados, possivelmente conferindo resistência à ampicilina (Tabela 3).

4.4.2 Perfil genômico de virulência e patogenicidade

Todos os isolados apresentaram o gene correspondente ao fator de aderência *efaAfm*. Além disso, sete isolados apresentaram outro fator de aderência, com a presença do gene *acm*. O gene *hylEfm* foi detectado em uma cepa da ETE 4. De acordo com as análises do PathogenFinder, sete isolados foram previstos como patógenos humanos com probabilidade variando de 0,582 a 0,869, indicando a presença de proteínas patogênicas. Apenas um isolado da ETE 2 não foi previsto o como um patógeno, com uma probabilidade de 0,489 (Tabela 3).

Tabela 3 – Perfil de resistência, virulência e patogenicidade de *Enterococcus faecium* carregando o gene *vanA*.

Isolado	ETE	MIC		Genes de resistência antimicrobiana						Genes de Virulência			Probabilidade de ser um patógeno humano
		VAN	TEI	Aminoglicosídeos	Macrolídeos	Tetraciclina	β-lactâmicos	Fluoroquinolonas	Resistência à múltiplas drogas	<i>acm</i>	<i>efaAfm</i>	<i>hylEfm</i>	
P6398	1	8	<0,5	<i>AAC(6')-li</i> , <i>APH(3')-IIIa*</i> , <i>ANT(6)-Ia*</i>	<i>msrC</i> , <i>efmA</i> , <i>erm(B)</i>	<i>tet(M)</i> , <i>tet(L)*</i>	<i>pbp5</i>	-	<i>efrA</i> , <i>efrB</i>	+	+	-	0.856
P6406	1	>32	>32	<i>AAC(6')-li</i> , <i>ANT(6)-Ia</i> , <i>ANT(9)-Ia*</i>	<i>msrC</i> , <i>efmA</i> , <i>erm(B)*</i>	<i>tet(M)</i> , <i>tet(L)*</i>	<i>pbp5</i>	-	<i>efrA</i> , <i>efrB</i>	-	+	-	0.582
P6407	1	>32	>32	<i>AAC(6')-li</i> , <i>APH(3')-IIIa</i> , <i>ANT(6)-Ia*</i> , <i>ANT(9)-Ia*</i>	<i>msrC</i> , <i>efmA</i> , <i>erm(B)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>pbp5</i>	-	<i>efrA</i> , <i>efrB</i>	+	+	-	0.748
P6727	2	8	>32	<i>AAC(6')-li</i>	<i>msrC</i> , <i>efmA</i>	-	<i>pbp5</i>	-	<i>IsaA</i> , <i>efrA</i> , <i>efrB</i>	+	+	-	0.869
P6739	2	ND	<0,5	<i>AAC(6')-li</i> , <i>ANT(6)-Ia*</i> , <i>ANT(9)-Ia*</i>	<i>msrC</i> , <i>efmA</i> , <i>erm(B)*</i>	-	<i>pbp5</i>	-	<i>IsaA</i> , <i>efrA</i> , <i>efrB</i>	+	+	-	0.489
P6745	2	8	>32	<i>AAC(6')-li</i>	<i>msrC</i> , <i>efmA</i>	-	<i>pbp5</i>	-	<i>IsaA</i> , <i>efrA</i> , <i>efrB</i>	+	+	-	0.869
P6756	2	8	<0,5	<i>AAC(6')-li</i>	<i>msrC</i> , <i>efmA</i>	-	<i>pbp5</i>	-	<i>IsaA</i> , <i>efrA</i> , <i>efrB</i>	+	+	-	0.869
P6875	4	ND	>32	<i>AAC(6')-li</i> , <i>APH(3')-IIIa</i> , <i>aad(6)</i>	<i>msrC</i> , <i>efmA</i> , <i>erm(B)*</i>	-	<i>pbp5</i>	<i>gyrA</i> , <i>parC</i>	<i>IsaA</i> , <i>efrA</i> , <i>efrB</i>	+	+	+	0.799

VAN, Vancomicina; TEI, Teicoplanina; ND, Não determinado; *Genes encontrados em plasmídeos.

4.4.3 Elementos genéticos móveis

As áreas conservadas dos plasmídeos rep foram observadas em todos os isolados, com 11 plasmídeos diferentes, dentre os quais rep2 [orf1 (pRE25)] foi o mais frequente, presente em seis cepas, seguido por repUS15 [repA (pNB2354p1)] que estava presente em cinco estirpes. Os plasmídeos rep1 [repE (pIP816)] e rep1 [repE (pAMBeta)] estavam presentes em quatro isolados. Em menor grau, repUS43 [CDS12738 (DOP1)] foi encontrado em dois isolados, assim como rep17 [CDS29 (pRUM)] e rep1 [repE (pKL0018)]. Além disso, outros plasmídeos foram encontrados em apenas um isolado: repUS12 [rep (pUB110)], rep11c [repA (pJS33)], rep14a [CDS2 (pEFNP1)] e rep18brepA (pEF418). O isolado P6398, da ETE 1, apresentou o maior número de plasmídeos (n=8), seguido por três isolados (P6407, P6739, P6875) que apresentaram cinco plasmídeos. As sequências de inserção (IS) encontradas nos isolados foram predominantemente das famílias IS3, IS6, IS30, IS200 / IS605, IS256, IS982 e ISL3. Apenas um isolado da ETE 2 não apresentou nenhuma IS.

4.4.4 Relação Clonal

A análise de MLST dos oito isolados portadores do gene *vanA* revelou um novo alelo e cinco tipos de sequência (STs) diferentes, três descritos anteriormente (ST32, ST168, ST253) e dois novos (ST1893 e ST1894). O novo alelo "*gyd*" também foi descrito em um novo ST. Vale destacar que todos os STs pertencem ao complexo clonal (CC) 17, com exceção de dois. Outros STs não foram atribuídos a nenhum complexo clonal de acordo com o banco de dados PubMLST (Tabela 4).

Tabela 4 – Perfil MLST de isolados portadores do gene *vanA*.

Isolado	Genes de alelos MLST							ST	CC
	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>		
P6398	14	5	1	1	1	1	1	168	
P6407	14	5	1	1	1	1	1	168	
P6727	3	3	1	2	1	1	1	32	17
P6745	3	3	1	2	1	1	1	32	
P6756	3	3	1	2	1	1	1	32	
P6875	9	2	1	44	1	1	1	1893	
P6406	3	7	3	35	1	1	1	253	ND
P6739	35	3	25	2	78	1	1	1894	

Cinza claro indica os dois novos STs descritos neste estudo; Cinza escuro representa o novo alelo descrito; ST, *sequence type*; CC, *clonal complex*; ND, não definido.

5 DISCUSSÃO

Os enterococos são microrganismos comensais da microbiota humana e animal, sendo excretados nas fezes e na urina. Em sua maioria, esses resíduos são transportados e tratados em ETEs antes de serem lançados em águas superficiais (SANDERSON et al., 2020). Assim, os isolados obtidos a partir de amostras de águas residuais provavelmente refletem a presença na microbiota humana. Portanto, do ponto de vista da Saúde Única, as ETEs podem ser consideradas locais úteis de vigilância, pois são uma rica fonte de bactérias fecais e, portanto, permitem o monitoramento da microbiota fecal de grandes populações (ZAHEER et al., 2020). Gouliouris et al. (2019) descrevem a associação de linhagens VREfm circulantes em hospitais que também estão presentes em efluentes, por exemplo.

As ETEs também podem ser consideradas como pontos críticos para disseminação ambiental da resistência antimicrobiana e ambientes ideais para investigar a epidemiologia da resistência antimicrobiana (SANDERSON et al., 2020), uma vez que cepas multirresistentes, incluindo VRE, são cada vez mais identificadas em águas residuais (EKWANZALA et al., 2020; SADOWY; LUCZKIEWICZ, 2014; VARELA et al., 2013).

Enterococcus faecium, por sua vez, é uma espécie complexa do ponto de vista da saúde pública devido à sua associação com infecções nosocomiais. Vários relatos

de surtos hospitalares causados por VRE estão associados a esta espécie (HUGHES et al., 2019; RESENDE et al., 2014; SACRAMENTO et al., 2017). A ampla distribuição e capacidade de sobrevivência desses microrganismos no meio ambiente também causa preocupações, principalmente quando este é portador de múltiplos GRAs que podem ser compartilhados com outras bactérias e que conferem resistência aos antimicrobianos que são utilizados nos serviços de saúde humana e animal (ZAHEER et al., 2020).

No presente estudo, cepas de *E. faecium* foram isoladas de ETEs que recebem efluentes hospitalares, industriais, domésticos e mistos. A distribuição dos microrganismos recuperados e considerados para o estudo foi bastante variada e pode ter sido influenciada por diversos fatores, como a microbiota ambiental de cada ETE. Surpreendentemente, nenhum isolado foi obtido do efluente hospitalar. A maioria dos isolados (86,2%; 25/29) foi obtida de efluente industrial (ETE 1 e ETE 2). Uma das razões para o maior número de isolados dessas ETEs é possivelmente o maior número de pontos de coleta, visto que a amostragem foi obtida a partir de toda a ETE, o que não foi possível reproduzir em todos os locais de coleta.

Os resultados da análise de resistência aos antimicrobianos demonstrou que um número significativo de isolados de *E. faecium* (25/29) apresentou perfil MDR, o que significa que ocorreu resistência a mais de três classes de antimicrobianos. Esses dados demonstram a ampla resistência dessas bactérias às variadas classes farmacológicas de antimicrobianos atualmente disponíveis, o que é alarmante, pois as infecções humanas causadas por cepas de enterococos MDR, especialmente considerando cepas resistentes à vancomicina, constituem o principal desafio para o tratamento médico devido às opções terapêuticas limitadas (FREITAS et al., 2021).

Nossos resultados mostraram que dos 18 isolados caracterizados como VRE, 12 tinham o fenótipo *vanA*, mas apenas 8 apresentavam o gene *vanA*. Isso pode estar relacionado com a presença de outros genes de resistência à vancomicina, como *vanM*, que compartilham o mesmo fenótipo (AHMED; BAPTISTE, 2018; SABENÇA et al., 2020). Além disso, os genes de resistência podem não ser expressos, pois a suscetibilidade aos antibióticos está frequentemente relacionada ao metabolismo bacteriano e aos reguladores metabólicos que modulam esse fenótipo (CORONA; MARTINEZ, 2013). Vale ressaltar que 5 desses 8 isolados foram recuperados de efluentes tratados, o que é preocupante, visto que esse é o produto das ETEs que é

direcionado para ambientes aquáticos. Portanto, esses dados indicam a importância de estudos genotípicos envolvendo genes de resistência antimicrobiana que podem ser transferidos para outras bactérias potencialmente patogênicas para humanos e animais, mesmo quando a resistência não é detectada fenotipicamente.

Considerando a importância de VREfm abrigar o cluster *vanHAX*, o determinante de resistência a glicopeptídeos mais prevalente em ambientes clínicos e associado a muitas falhas no tratamento do VRE, o foco do nosso estudo foi obter o WGS desses isolados que desempenham um importante protagonismo no cenário de resistência antimicrobiana.

A presença do cluster de genes *vanHAX* em nossos oito genomas analisados está relacionada ao transposon Tn1546, conforme era esperado, visto que este elemento está frequentemente associado à resistência à vancomicina entre os enterococos (FREITAS et al., 2013). Esse elemento também é frequentemente transportado por plasmídeos autotransferíveis, sendo responsáveis por sua disseminação (FOUCAULT et al., 2010). Plasmídeos descritos como possíveis carreadores de *vanA*, como repUS15 repA (pNB2354p1) e rep17 [CDS29 (pRUM)], também foram observados em alguns desses isolados analisados em nosso estudo, tornando-se importantes contribuintes para a disseminação da resistência aos glicopeptídeos (CLEWELL et al., 2014; DELPECH; ALLENDE; AND SPARO, 2019; FREITAS et al., 2013; ROSVOLL et al., 2010).

O gene *erm(B)*, que confere resistência a macrolídeos, foi encontrado em cinco de nossos isolados, inclusive em plasmídeos. A resistência aos macrolídeos em enterococos é mais frequentemente associada a uma modificação do alvo ribossômico por 23S rRNA metilases codificadas pelos genes da metilase resistente à eritromicina (*erm*), proporcionando resistência cruzada ao grupo de antibióticos macrolídeos, lincosamida, estreptogramina (PORTILLO et al., 2000; ZALIPOUR; ESFAHANI; HAVAEI, 2019). A disseminação dos genes *erm* pertencentes à classe *erm(B)* é responsável pela maior parte da resistência causada pela metilação ribossômica em enterococos (LECLERCQ, 2002). Além disso, a presença de *vanA* e de Tn1546 concomitantemente ao *erm(B)*, como ocorreu em alguns isolados do nosso estudo, já foi associada a este gene de resistência a macrolídeos em *Staphylococcus aureus*, possivelmente originado de *E. faecium* (WAN et al., 2016), sinalizando a transferência de GRAs e sua disseminação entre bactérias.

Outro mecanismo de resistência aos macrolídeos, conferido pelo gene *msrC*, e esperado para *E. faecium* esteve presente em todos os nossos isolados. Esse gene codifica uma bomba de efluxo que é uma proteína da subfamília cromossômica ABC-F que confere resistência à eritromicina e outros macrolídeos, bem como aos antibióticos estreptogramina B (BEUKERS et al., 2017; EKWANZALA et al., 2020).

Genes de resistência aos aminoglicosídeos foram encontrados em quantidades significativas em nossos isolados. O gene *aph(3')-IIIa*, encontrado em três dos oito isolados, codifica a enzima aminoglicosídeo fosfotransferase APH(3')-IIIa, conferindo alto nível de resistência à estreptomicina e canamicina em enterococos (LI et al., 2015; PADMASINI; PADMARAJ; RAMESH, 2014). O gene *ant(6')-Ia* também foi encontrado em nossos isolados e está associado a alto nível de resistência aos aminoglicosídeos (HLA) (LI et al., 2015). Enterococos são intrinsecamente resistentes aos aminoglicosídeos, mesmo que apresentando baixo nível de resistência, e a presença do gene *aac(6')-II* em todos os nossos isolados não é surpreendente, uma vez que *E. faecium* produz uma 6'-N-aminoglicosídeo acetiltransferase cromossomicamente codificada, pela qual esse gene é responsável por codificar (COSTA et al., 1993; GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019). No entanto, atualmente, HLA mediado pela aquisição de genes codificadores de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos está se tornando mais frequente.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que alguns desses genes de resistência aos aminoglicosídeos foram encontrados em plasmídeos (Tabela 3). É relevante destacar que elementos genéticos móveis, como rep2 [orf1 (pRE25)], rep18b [repA (pEF418)] e repUS15 [repA (pNB2354p1)], encontrados em nosso estudo, são descritos como importantes determinantes para a transferência horizontal de resistência antimicrobiana em enterococos (CLEWELL et al., 2014; DELPECH; ALLENDE; AND SPARO, 2019; EKWANZALA et al., 2020).

Três dos nossos oito isolados apresentaram o gene *tet(M)*, que atua por meio da ligação das proteínas de proteção ribossomal, codificadas pelo gene, ao ribossomo (JIA; LI; WANG, 2014). O gene *tet(M)* é amplamente distribuído entre as bactérias e isso provavelmente se deve à associação dele com elementos conjugativos (AGERSØ; PEDERSEN; AARESTRUP, 2006). Além disso, esse tem sido um dos genes de resistência à tetraciclina mais estudados em bactérias Gram-positivas e o mais prevalente em enterococos (SANTIAGO-RODRIGUEZ et al., 2013). Dois de

nossos isolados também apresentaram o gene *tet(L)*, que confere resistência por meio dos mecanismos de exportação do fármaco para fora da célula (TATSING FOKA; ATEBA, 2019).

A mutação encontrada em *gyrA* e *parC* presente em um de nossos isolados já foi relatada em *E. faecium* e confere resistência à ciprofloxacina (BRISSE et al., 1999; EL AMIN; JALAL; WRETLIND, 1999; GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019). No entanto, é importante ressaltar que *efrA* e *efrB* também foram encontrados neste isolado e esses genes codificam subunidades de EfrAB, que é uma bomba de efluxo de múltiplas drogas e que contribui para a extrusão de fluoroquinolonas em enterococos (ESFAHANI et al., 2020).

Mutações em *pbp5* também foram encontradas nos isolados analisados e estão frequentemente relacionadas à diminuição da suscetibilidade à ampicilina e outros β -lactâmicos em *E. faecium* (LEIMANIS et al., 2006; MONTEALEGRE et al., 2017). Também vale ressaltar que o gene *pbp5* pode ser transferível como parte de grandes regiões cromossômicas e sua transferência horizontal pode ser relevante para cepas clínicas adquirirem resistência aos β -lactâmicos (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

No presente estudo, foi demonstrada a presença de genes de virulência em enterococos multirresistentes. O gene *efaAfm* esteve presente em todos os nossos isolados, sendo responsável pela codificação das adesinas da parede celular. Existem muitos relatos de *efaAfm* em amostras clínicas, ambientais, e de animais (ISEPPI et al., 2020; SOHEILI et al., 2014; TREMBLAY et al., 2013; ZAHEER et al., 2020). Assim como o gene *efaAfm*, o gene *acm* também está envolvido na adesão de *E. faecium* e foi encontrado em todos os genomas isolados analisados, exceto em um. Ambos os genes *acm* e *efaAfm* foram relatados em isolados clínicos no Brasil (DA SILVA et al., 2012; MARCHI et al., 2018). Esses genes provavelmente desempenham um papel na adaptação dos enterococos tanto no trato digestivo humano quanto nas ETARs, tornando-se genes ubíquos (CASADEVALL; PIROFSKI, 2001).

O gene *hylEfm*, encontrado em um de nossos isolados, codifica uma hidrolase de glicosídeo que parece facilitar a colonização intestinal e a invasão peritoneal. Este fator de virulência, no entanto, apresenta uma perspectiva preocupante, uma vez que tem sido documentado um aumento no número de cepas de *E. faecium* pertencentes ao CC17 portadoras do gene *hylEfm* em hospitais de diferentes países (ARIAS et al.,

2009; FREITAS et al., 2010). O aumento da resistência antimicrobiana está frequentemente associado à diminuição da virulência e aptidão, embora isso varie de acordo com o gênero e a espécie da bactéria (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013). *Enterococcus* spp. são comumente considerados microrganismos de baixa virulência e muitos determinantes da virulência de *E. faecium* ainda são desconhecidos, embora possam contribuir para aumentar a capacidade desses microrganismos em causar infecção (BILLSTRÖM et al., 2008; STRATEVA et al., 2016).

O uso da ferramenta de MLST na vigilância pode sinalizar o surgimento de novos STs ou CC de *E. faecium* em uma área geográfica (LEE et al., 2019). Em nosso estudo, seis cepas pertencentes ao CC17 foram relatadas entre os isolados analisados. Este dado é relevante porque a maioria dos isolados multirresistentes dessa espécie que estão associados a surtos hospitalares pertencem ao CC17, a maioria dos quais são resistentes a ciprofloxacina e ampicilina, e contêm genes de virulência (GALLOWAY-PEÑA et al., 2009; SPARO; DELPECH; ALLENDE, 2018).

No meio ambiente, as águas residuais são frequentemente relatadas como reservatório para *E. faecium* CC17 (LEE et al., 2019). Assim, Leclercq et al. (2013) relataram em seu estudo a associação entre *E. faecium* pertencente ao CC17 de um centro médico e sua respectiva ETE, demonstrando que não houve diferenças significativas nas proporções desse microrganismo entre a entrada e o efluente da ETE e, portanto, que o tratamento de águas residuais não resulta em uma remoção específica dele. Além disso, o estudo de Freitas et al. (2011) descreve o compartilhamento entre clones CC17 entre animais e humanos, revelando a importância de rotas alternativas para a disseminação de bactérias comensais e oportunistas. Assim, a presença de cepas pertencentes ao CC17 no ambiente e nos animais deve ser considerada um fator relevante para a saúde global.

No Brasil, dados sobre *E. faecium* em águas residuais e seu potencial de disseminação de resistência antimicrobiana em ambientes aquáticos são escassos, uma vez que os estudos relacionados a esta espécie são mais direcionados a amostras clínicas e alimentares (CAMARGO et al., 2014; ROSA et al., 2014; SACRAMENTO et al., 2017).

Até onde sabemos, nenhum estudo genômico de *Enterococcus faecium* recuperado de ETEs revelou a presença de isolados pertencentes a CC17 no Brasil.

Considerando que este CC está associado a linhagens hospitalares amplamente disseminadas e responsáveis por infecções em humanos, nossos dados apontam para a disseminação ambiental desse microrganismo carregando múltiplos GRAs, como genes de resistência à vancomicina e HLA. Alguns desses isolados estavam, inclusive, presentes em águas residuais tratadas.

O risco para a saúde humana decorrente do lançamento de VREfm no meio ambiente é incerto, mas o fato de alguns grupos da população estarem mais expostos aos efluentes, principalmente quando ocorre o reuso e o reaproveitamento de recursos hídricos, é significativo (ADEGOKE et al., 2018). Além disso, a disseminação da resistência antimicrobiana entre possíveis patógenos para humanos e animais também é um ponto crítico para a saúde global, alertando para a importância do nosso estudo de microrganismos resistentes em ETEs.

Os resultados demonstrados no presente estudo podem contribuir com dados enriquecedores para o escasso cenário que o Brasil apresenta a respeito do tema proposto, além de indicar a relevância de estudos futuros sobre a disseminação de *E. faecium* multidroga-resistente em águas residuais e outros ambientes aquáticos, principalmente para fins de vigilância epidemiológica. Ademais, a análise de WGS provou ser uma ferramenta útil para estudar fatores de resistência, virulência e patogenicidade antimicrobianos, bem como linhagens com relevância clínica de ambientes aquáticos.

6 CONCLUSÕES

- A presença de *E. faecium* foi predominante no isolamento de *Enterococcus* spp. provenientes de amostras de águas residuais, sendo equivalente a 63% (29/46) dos isolados recuperados, demonstrando a ampla disseminação deste patógeno oportunista no ambiente aquático de ETEs;
- Dentre os isolados de *E. faecium* recuperados neste estudo, 86,2% são oriundos de ETEs que recebem esgoto bruto industrial, demonstrando que essas estações podem atuar como reservatórios para este microrganismo e podem ser consideradas locais úteis de vigilância;
- Isolados de *E. faecium* multidroga resistentes foram recuperados de amostras do afluente e do efluente das ETEs, demonstrando sua relevância como bioindicador de resistência aos antimicrobianos;
- A presença do gene *vanA* foi detectada em 27,5% (8/29) dos isolados de *E. faecium*, sendo todos estes identificados com perfil de resistência MDR, o que é alarmante visto que esse perfil pode dificultar significativamente o tratamento de infecções causadas por esses microrganismos;
- Os dados genômicos obtidos demonstram a coexistência de múltiplos GRAs em cepas de *E. faecium* carreando *vanA*, inclusive alguns genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos e aos β -lactâmicos, que são antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções em humanos;
- Todos os genomas analisados apresentavam plasmídeos e alguns dos genes de resistência encontrados estavam alocados nesses elementos genéticos móveis, indicando a possibilidade da disseminação da resistência antimicrobiana pela transferência horizontal dos genes;
- Seis cepas de *E. faecium* multidroga-resistentes carreando *vanA* foram atribuídas ao CC17, que está frequentemente associado a surtos hospitalares, indicando que águas residuais e ETEs podem servir como reservatório para esses microrganismos e seus determinantes de resistência antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, Timothy; KOR-BICAKCI, Gokce; ISLAM, Mohammad S.; ESKICIOGLU, Cigdem. A review on the fate of legacy and alternative antimicrobials and their metabolites during wastewater and sludge treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 23, p. 1–52, 2020.
- ADEGOKE, Anthony A.; AMOAH, Isaac D.; STENSTRÖM, Thor A.; VERBYLA, Matthew E.; MIHELICIC, James R. Epidemiological evidence and health risks associated with agricultural reuse of partially treated and untreated wastewater: A review. **Frontiers in Public Health**, [S. l.], v. 6, n. DEC, p. 1–20, 2018.
- ADU-OPPONG, Boahemaa; GASPARRINI, Andrew J.; DANTAS, Gautam. Genomic and functional techniques to mine the microbiome for novel antimicrobials and antimicrobial resistance genes. **Ann N Y Acad Sci**, [S. l.], v. 1388, n. 1, p. 42–58, 2017.
- AGERSØ, Yvonne; PEDERSEN, Anders Gorm; AARESTRUP, Frank Møller. Identification of Tn5397-like and Tn916-like transposons and diversity of the tetracycline resistance gene tet(M) in enterococci from humans, pigs and poultry. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 57, n. 5, p. 832–839, 2006.
- AHMED, Mohamed O.; BAPTISTE, Keith E. Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. **Microbial Drug Resistance**, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 590–606, 2018.
- ALCOCK, Brian P. et al. CARD 2020: Antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 48, n. D1, p. D517–D525, 2020.
- AN, Xin Li; CHEN, Qing Lin; ZHU, Dong; ZHU, Yong Guan; GILLINGS, Michael R.; SU, Jian Qiang. Impact of wastewater treatment on the prevalence of integrons and the genetic diversity of integron gene cassettes. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 84, n. 9, p. 1–15, 2018.
- ANDREWS, Simon. **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data**. [S. l.], 2010. Disponível em: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Acesso em: 21 jan. 2022.
- ANTIPOV, Dmitry; RAIKO, Mikhail; LAPIDUS, Alla; PEVZNER, Pavel A. Metaviral SPAdes: Assembly of viruses from metagenomic data. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 36, n. 14, p. 4126–4129, 2020.
- ARIAS, Cesar A.; PANESSO, Diana; SINGH, Kavindra V.; RICE, Louis B.; MURRAY, Barbara E. Cotransfer of antibiotic resistance genes and a hylEfm -containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 53, n. 10, p. 4240–4246, 2009.
- BARCELLOS, C.; QUITÉRIO, L.A. Environmental surveillance in health in Brazil's Unified Health System. **Rev Saude Publica**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 107–7, 2006.
- BECEIRO, Alejandro; TOMÁS, María; BOU, Germán. Antimicrobial resistance and

virulence: A successful or deleterious association in the bacterial world? **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 185–230, 2013.

BENGTSSON-PALME, Johan; KRISTIANSSON, Erik; LARSSON, D. G. Joaki. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 68–80, 2018.

BENNETT, Simon. Solexa Ltd. **Pharmacogenomics**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 433–438, 2004.

BEUKERS, Alicia G.; ZAHEER, Rahat; GOJI, Noriko; AMOAKO, Kingsley K.; CHAVES, Alexandre V.; WARD, Michael P.; MCALLISTER, Tim A. Comparative genomics of *Enterococcus* spp. isolated from bovine feces. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–18, 2017.

BEZERRA, Anselmo César Vasconcelos. Vigilância em saúde ambiental no brasil: Heranças e desafios. **Saude e Sociedade**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 1044–1057, 2017.

BILLSTRÖM, Hanna; LUND, Bodil; SULLIVAN, Åsa; NORD, Carl Erik. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S. l.], v. 32, n. 5, p. 374–377, 2008.

BORTOLAIA, Valeria et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 75, n. 12, p. 3491–3500, 2020.

BRANCO, Neusa Maria Castelo; PEREIRA, Mararlene Ulberg; FERREIRA, Rosana Gomes; SPISSO, Bernardete Ferraz; ALBERT, André Luís Mazzei; ROMÃO, Célia Maria Carvalho Pereira Araujo. Ocorrência de antimicrobianos em águas superficiais e residuais do Município do Rio de Janeiro: uma questão de vulnerabilidade ambiental e de saúde pública. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 10, e415101019000, 2021.

BRASIL. Lei 8.080 de 19 de setembro de 1990, Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 20 set.1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes Nacionais da Vigilância em Saúde**. Brasília, 2010.

BRISSE, Sylvain; FLUIT, Ad C.; WAGNER, Ulrich; HEISIG, Peter; MILATOVIC, Dana; VERHOEF, Jan; SCHEURING, Sybille; KÖHRER, Karl; SCHMITZ, Franz Josef. Association of alterations in *parC* and *gyrA* proteins with resistance of clinical isolates of *Enterococcus faecium* to nine different fluoroquinolones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 43, n. 10, p. 2513–2516, 1999.

BROOKS, Geo *et al.* **Jawetz, Melnick e Adelberg MICROBIOLOGIA MÉDICA**. 26.ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

CAMARGO, Carlos Henrique; BRUDER-NASCIMENTO, Ariane; LEE, Sarah Hwa In; JÚNIOR, Ary Fernandes; KANENO, Ramon; RALL, Vera Lúcia Mores. Prevalence and phenotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated from food in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 45, n. 1, p. 111–115, 2014.

CARATTOLI, Alessandra; ZANKARI, Ea; GARCÍA-FERNÁNDEZ, Aurora; LARSEN,

Mette Voldby; LUND, Ole; VILLA, Laura; AARESTRUP, Frank Mølær; HASMAN, Henrik. In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 58, n. 7, p. 3895–3903, 2014.

CARVALHO, D. O. S. **Caracterização do metagenoma e do resistoma microbiano de efluente hospitalar e de suas possíveis implicações na vigilância ambiental em saúde**. 2016. 122 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

CASADEVALL, Arturo; PIROFSKI, Liise anne. Host-pathogen interactions: The attributes of virulence. **Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 184, n. 3, p. 337–344, 2001.

CHECCUCCI, Alice; TREVISI, Paolo; LUISE, Diana; MODESTO, Monica; BLASIOLI, Sonia; BRASCHI, Ilaria; MATTARELLI, Paola. Exploring the Animal Waste Resistome: The Spread of Antimicrobial Resistance Genes Through the Use of Livestock Manure. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 11, n. July, p. 1–9, 2020.

CLEWELL, Don B.; WEAVER, Keith E.; DUNNY, Gary M.; COQUE, Teresa M.; FRANCA, Maria Victoria; HAYES, Finbarr. Extrachromosomal and Mobile Elements in Enterococci: Transmission, Maintenance, and Epidemiology. **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**, [S. l.], p. 1–112, 2014.

COMISSÃO EUROPEIA, . **A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR)**. Bruxelas, 2017. p. 24.

CORONA, Fernando; MARTINEZ, Jose L. Phenotypic resistance to antibiotics. **Antibiotics**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 237–255, 2013.

COSENTINO, Salvatore; VOLDBY LARSEN, Mette; MØLLER AARESTRUP, Frank; LUND, Ole. PathogenFinder - Distinguishing Friend from Foe Using Bacterial Whole Genome Sequence Data. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 10, 2013.

COSTA, Y.; GALIMAND, M.; LECLERCQ, R.; DUVAL, J.; COURVALIN, P. Characterization of the chromosomal aac(6')-II gene specific for *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 37, n. 9, p. 1896–1903, 1993.

DA SILVA, Leila Priscilla Pinheiro; PITONDO-SILVA, André; MARTINEZ, Roberto; DA COSTA DARINI, Ana Lúcia. Genetic features and molecular epidemiology of *Enterococcus faecium* isolated in two university hospitals in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [S. l.], v. 74, n. 3, p. 267–271, 2012.

DE CARVALHO, Mayra Costa da Cruz Gallo; DA SILVA, Danielle Cristina Gregorio. Next generation DNA sequencing and its applications in plant genomics. **Ciencia Rural**, [S. l.], v. 40, n. 3, p. 735–744, 2010.

DELPECH, Gastón; ALLENDE, Leonardo García; AND SPARO, Mónica. Mobile Genetic Elements in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Population. In: KIRMUSAOGLU, S.; BHARDWAJ, S. B. **Pathogenic Bacteria**. [S.l.]: IntechOpen, 2019. n. 88389. Disponível em: 10.5772/intechopen.88389. Acesso em: 21 jan. 2022.

DUTKA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Erratum: Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR (Journal of Clinical Microbiology (1995) 33:1 (25)). **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 1434, 1995.

EKWANZALA, Mutshiene Deogratias; DEWAR, John Barr; KAMIKA, Ilunga; MOMBA, Maggy Ndombo Benteke. Comparative genomics of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. revealed common resistome determinants from hospital wastewater to aquatic environments. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 719, p. 137275, 2020.

EL AMIN, Nagwa; JALAL, Shah; WRETLIND, Bengt. Alterations in *gyrA* and *parC* associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 43, n. 4, p. 947–949, 1999.

ELLIOTT, Sarah M.; ERICKSON, Melinda L.; KRALL, Aliesha L.; ADAMS, Byron A. Concentrations of pharmaceuticals and other micropollutants in groundwater downgradient from large on-site wastewater discharges. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. 1–17, 2018.

ESFAHANI, Sarvenaz; AHMADRAJABI, Roya; MOLLAEI, Hamidreza; SAFFARI, Fereshteh. Co-occurrence of type II topoisomerase mutations and efflux expression in high fluoroquinolone resistant *Enterococcus faecalis* isolated from urinary tract infections. **Infection and Drug Resistance**, [S. l.], v. 13, p. 553–559, 2020.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0. [S.l.], 2020. 110p.

FOUCAULT, Marie Laure; DEPARDIEU, Florence; COURVALIN, Patrice; GRILLOT-COURVALIN, Catherine. Inducible expression eliminates the fitness cost of vancomycin resistance in enterococci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 107, n. 39, p. 16964–16969, 2010.

FREITAS, Ana R. et al. Global spread of the *hylEfm* colonization-virulence gene in megaplasmids of the *Enterococcus faecium* CC17 polyclonal subcluster. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 54, n. 6, p. 2660–2665, 2010.

FREITAS, Ana R. et al. Human and swine hosts share vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* CC17 and CC5 and *Enterococcus faecalis* CC2 clonal clusters harboring Tn1546 on indistinguishable plasmids. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 49, n. 3, p. 925–931, 2011.

FREITAS, Ana R.; NOVAIS, Carla; TEDIM, Ana P.; FRANCA, María Victoria; BAQUERO, Fernando; PEIXE, Luísa; COQUE, Teresa M. Microevolutionary Events Involving Narrow Host Plasmids Influence Local Fixation of Vancomycin-Resistance in *Enterococcus* Populations. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 3, 2013.

FREITAS, Ana R.; PEREIRA, Ana P.; NOVAIS, Carla; PEIXE, Luísa. Multidrug-resistant high-risk *Enterococcus faecium* clones: can we really define them? **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S. l.], v. 57, n. 1, 2021.

GALLOWAY-PEÑA, Jessica R.; NALLAPAREDDY, Sreedhar R.; ARIAS, Cesar A.; GEORGE, M.; MURRAY, Barbara E. Analysis of Clonality and Antibiotic Resistance among Early Clinical Isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. **J Infect**

Dis. [S. I.], v. 200, n. 10, p. 1566–1573, 2009.

GARCÍA-SOLACHE, Mónica; RICE, Louis B. The enterococcus: A model of adaptability to its environment. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. I.], v. 32, n. 2, p. 1–28, 2019.

GARRIDO, Antonio Marin. Antimicrobial Resistance in Enterococci. **Journal of Infectious Diseases and Therapy**, [S. I.], v. 02, n. 04, 2014.

GONZALEZ-ZORN, Bruno. Antibiotic use in the COVID-19 crisis in Spain. **Clinical Microbiology and Infection**. [S. I.], n. 27, p. 646–647, 2021.

GOTKOWSKA-PŁACHTA, Anna. The prevalence of virulent and multidrug-resistant enterococci in river water and in treated and untreated municipal and hospital wastewater. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S. I.], v. 18, n. 2, p. 1–19, 2021.

GOULIOURIS, Theodore *et al.* Detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* hospital-adapted lineages in municipal wastewater treatment plants indicates widespread distribution and release into the environment. **Genome Research**, [S. I.], v. 29, n. 4, p. 626–634, 2019.

GUARDIAN, Mary Grace E.; HE, Ping; BERMUDEZ, Alysson; DUAN, Shuiwang; KAUSHAL, Sujay S.; ROSENFELDT, Erik; AGA, Diana S. Optimized suspect screening approach for a comprehensive assessment of the impact of best management practices in reducing micropollutants transport in the Potomac River watershed. **Water Research X**, [S. I.], v. 11, n. 100088, p. 1-10, 2021.

GUREVICH, Alexey; SAVELIEV, Vladislav; VYAHHI, Nikolay; TESLER, Glenn. QUASt: Quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, [S. I.], v. 29, n. 8, p. 1072–1075, 2013.

HAMIWE, Thabo; KOCK, Marleen M.; MAGWIRA, Cliff A.; ANTIABONG, John F.; EHLERS, Marthie M. Occurrence of enterococci harbouring clinically important antibiotic resistance genes in the aquatic environment in Gauteng, South Africa. **Environmental Pollution**, [S. I.], v. 245, p. 1041–1049, 2019.

HERNANDO-AMADO, Sara; COQUE, Teresa M.; BAQUERO, Fernando; MARTÍNEZ, José L. Antibiotic Resistance: Moving From Individual Health Norms to Social Norms in One Health and Global Health. **Frontiers in Microbiology**, [S. I.], v. 11, n. August, p. 1–20, 2020.

HILL, Craig M.; KRAUSE, Kevin M.; LEWIS, Stacey R.; BLAIS, Johanne; BENTON, Bret M.; MAMMEN, Mathai; HUMPHREY, Patrick P.; KINANA, Alfred; JANC, James W. Specificity of induction of the *vanA* and *vanB* operons in vancomycin-resistant enterococci by telavancin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. I.], v. 54, n. 7, p. 2814–2818, 2010.

HUGHES, Angus; BALLARD, Susan; SULLIVAN, Sheena; MARSHALL, Caroline. An outbreak of *vanA* vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a hospital with endemic *vanB* VRE. **Infection, Disease and Health**, [S. I.], v. 24, n. 2, p. 82–91, 2019.

ISEPPI, Ramona; DI CERBO, Alessandro; MESSI, Patrizia; SABIA, Carla. Antibiotic Resistance and Virulence Traits in Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) and

Extended-Spectrum -Lactamase/AmpC-producing (ESBL/AmpC) Enterobacteriaceae from Humans and Pets. **Antibiotics**, [S. l.], v. 9, n. 152, p. 1–14, 2020.

IWERIEBOR, Benson Chuks; GAQAVU, Sisipho; OBI, Larry Chikwelu; NWODO, Uchechukwu U.; OKOH, Anthony I. Antibiotic susceptibilities of enterococcus species isolated from hospital and domestic wastewater effluents in Alice, eastern cape province of South Africa. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 4231–4246, 2015.

JIA, Wei; LI, Gang; WANG, Wen. Prevalence and antimicrobial resistance of Enterococcus species: A hospital-based study in China. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 3424–3442, 2014.

JOENSEN, Katrine Grimstrup; SCHEUTZ, Flemming; LUND, Ole; HASMAN, Henrik; KAAS, Rolf S.; NIELSEN, Eva M.; AARESTRUP, Frank M. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic Escherichia coli. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 52, n. 5, p. 1501–1510, 2014.

JOHANSSON, Markus H. K.; BORTOLAIA, Valeria; TANSIRICHAIIYA, Supathap; AARESTRUP, Frank M.; ROBERTS, Adam P.; PETERSEN, Thomas N. Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in Salmonella enterica using a newly developed web tool: MobileElementFinder. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, [S. l.], v. 76, n. 1, p. 101–109, 2021.

JOLLEY, Keith A.; BRAY, James E.; MAIDEN, Martin C. J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. **Wellcome Open Research**, [S. l.], v. 3, n. 0, p. 1–20, 2018.

KILBAS, Imdat; CIFTCI, Ihsan Hakki. Antimicrobial resistance of Enterococcus isolates in Turkey: A meta-analysis of current studies. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [S. l.], v. 12, p. 26–30, 2018.

KÖSER, Claudio U.; ELLINGTON, Matthew J.; PEACOCK, Sharon J. Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. **Trends in Genetics**, [S. l.], v. 30, n. 9, p. 401–407, 2014.

LECLERCQ, Roland. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 482–492, 2002.

LECLERCQ, Roland; OBERLÉ, Kenny; GALOPIN, Sébastien; CATTOIR, Vincent; BUDZINSKI, Héléne; PETIT, Fabienne. Changes in enterococcal populations and related antibiotic resistance along a medical center-wastewater treatment plant-river Continuum. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 79, n. 7, p. 2428–2434, 2013.

LEE, Terence; PANG, Stanley; ABRAHAM, Sam; COOMBS, Geoffrey W. Antimicrobial-resistant CC17 Enterococcus faecium: The past, the present and the future. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [S. l.], v. 16, p. 36–47, 2019.

LEIMANIS, S.; HOYEZ, N.; HUBERT, S.; LASCHET, M.; SAUVAGE, Eric; BRASSEUR, R.; COYETTE, J. PBP5 complementation of a PBP3 deficiency in Enterococcus hirae. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 188, n. 17, p. 6298–6307,

2006.

LI, Wanxiang; LI, Jing; WEI, Quhao; HU, Qingfeng; LIN, Xiaowei; CHEN, Mengquan; LI, Jing; LV, Huoyang. Characterization of aminoglycoside resistance and virulence Genes among *Enterococcus* spp. Isolated from a hospital in China. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 3014–3025, 2015.

LUO, Yunlong; GUO, Wenshan; NGO, Huu Hao; NGHIEM, Long Duc; HAI, Faisal Ibney; ZHANG, Jian; LIANG, Shuang; WANG, Xiaochang C. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 473–474, p. 619–641, 2014.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.

MARCHI, A. P. et al. Vancomycin-resistant enterococci isolates colonizing and infecting haematology patients: clonality, and virulence and resistance profile. **Journal of Hospital Infection**, [S. l.], v. 99, n. 3, p. 346–355, 2018.

MITCHELL, Marisa E. V.; ALDERS, Robyn; UNGER, Fred; NGUYEN-VIET, Hung; LE, Trang Thi Huyen; TORIBIO, Jenny Ann. The challenges of investigating antimicrobial resistance in Vietnam - What benefits does a One Health approach offer the animal and human health sectors? **BMC Public Health**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 1–12, 2020.

MONTEALEGRE, Maria Camila; ROH, Jung Hyeob; RAE, Meredith; DAVLIEVA, Milya G.; SINGH, Kavindra V.; SHAMOO, Yousif; MURRAYA, Barbara E. Differential Penicillin-Binding Protein 5 (PBP5) Levels in the *Enterococcus faecium* Clades with Different Levels of Ampicillin Resistance. [S. l.], v. 61, n. 1, p. 1–10, 2017.

MONTICELLI, Jacopo; KNEZEVICH, Anna; LUZZATI, Roberto; DI BELLA, Stefano. Clinical management of non-faecium non-faecalis vancomycin-resistant enterococci infection. Focus on *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus/flavescens*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 237–246, 2018.

MOREIRA, Leandro Marcio (org.). **Ciências Genômicas: Fundamentos e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2015.

O'NEILL, JIM. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **Review on Antimicrobial Resistance**. Reino Unido, 2016.

ORAVCOVA, Veronika; MIHALCIN, Matus; ZAKOVA, Jana; POSPISILOVA, Lucie; MASARIKOVA, Martina; LITERAK, Ivan. Vancomycin-resistant enterococci with vanA gene in treated municipal wastewater and their association with human hospital strains. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 609, p. 633–643, 2017.

PADMASINI, Elango; PADMARAJ, R.; RAMESH, S. Srivani. High level aminoglycoside resistance and distribution of aminoglycoside resistant genes among clinical isolates of *Enterococcus* species in Chennai, India. **The Scientific World Journal**, [S. l.], v. 2014, p. 1–6, 2014.

PILLONETTO, Marcelo et al. The Experience of Implementing a National Antimicrobial Resistance Surveillance System in Brazil. **Frontiers in Public Health**, [S. l.], v. 8, n. January, p. 1–20, 2021.

PORTILLO, Aránzazu; RUIZ-LARREA, Fernanda; ZARAZAGA, Myriam; ALONSO, Ana; MARTINEZ, Jose Luis; TORRES, Carmen. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 967–971, 2000.

RABELLO, Renata F.; BONELLI, Raquel R.; PENNA, Bruno A.; ALBUQUERQUE, Julia P.; SOUZA, Rossiane M.; CERQUEIRA, Aloysio M. F. Antimicrobial resistance in farm animals in Brazil: An update overview. **Animals**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 1–43, 2020.

RAZA, Taskeen; ULLAH, Sidra Rahmat; MEHMOOD, Khalid; ANDLEEB, Saadia. Vancomycin resistant enterococci: A brief review. **Journal of the Pakistan Medical Association**, [S. l.], v. 68, n. 5, p. 768–772, 2018.

RESENDE, Mariah; CAIERÃO, Juliana; GIL PRATES, Juliana; AZAMBUJA NARVAEZ, Gabriel; CÍCERO DIAS, Armídio Gomes; D'AZEVEDO, Pedro Alves. Emergence of vanA vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a hospital in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 160–167, 2014.

RICE, Louis B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. **Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 197, n. 8, p. 1079–1081, 2008.

ROSA, Regis G.; SCHWARZBOLD, Alexandre V.; SANTOS, Rodrigo P. Do.; TURRA, Eduardo E.; MACHADO, Denise P.; GOLDANI, Luciano Z. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia in a tertiary care hospital: Epidemiology, antimicrobial susceptibility, and outcome. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2014, 2014.

ROSVOLL, Torill C. S.; PEDERSEN, Torunn; SLETVOLD, Hege; JOHNSEN, Pål J.; SOLLID, Johanna E.; SIMONSEN, Gunnar S.; JENSEN, Lars B.; NIELSEN, Kaare M.; SUNDSFJORD, Arnfinn. PCR-based plasmid typing in *Enterococcus faecium* strains reveals widely distributed pRE25-, pRUM-, pIP501- and pHT β -related replicons associated with glycopeptide resistance and stabilizing toxin-antitoxin systems. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, [S. l.], v. 58, n. 2, p. 254–268, 2010.

SABENÇA, Carolina et al. Next-Generation Sequencing and MALDI Mass Spectrometry in the Study of Multiresistant Processed Meat Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE). **Biology**. [S. l.], v. 9, n. 5, p. 1–17, 2020.

SACRAMENTO, Andrey G. et al. Changed epidemiology during intra and interhospital spread of high-risk clones of vanA-containing *Enterococcus* in Brazilian hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [S. l.], v. 88, n. 4, p. 348–351, 2017.

SADOWY, Ewa; LUCZKIEWICZ, Aneta. Drug-resistant and hospital-associated *Enterococcus faecium* from wastewater, riverine estuary and anthropogenically impacted marine catchment basin. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 14, n. 1, 2014.

SANDERSON, Haley; ORTEGA-POLO, Rodrigo; ZAHEER, Rahat; GOJI, Noriko; AMOAKO, Kingsley K.; BROWN, R. Stephen; MAJURY, Anna; LISS, Steven N.; MCALLISTER, Tim A. Comparative genomics of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. isolated from wastewater treatment plants. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 1–17, 2020.

SANTIAGO-RODRIGUEZ, Tasha M.; RIVERA, Jessica I.; CORADIN, Mariel; TORANZOS, Gary A. Antibiotic-resistance and virulence genes in *Enterococcus* isolated from tropical recreational waters. **Journal of Water and Health**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 387–396, 2013.

SANTOS, Fernanda Flores Silva Dos; FILHO, José Daltro; MACHADO, Celestina Tojal; VASCONCELOS, Jailde Fontes; FEITOSA, Flávia Regina Sobral. O desenvolvimento do saneamento básico no Brasil e as consequências para a saúde pública. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 241–251, 2018.

SCHEIDEGGER, E. M. D. **Identificação de espécies de *Enterococcus* isoladas de queijo Minas tipo frescal através da análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição de parte do gene 16 rRNA amplificado pela PCR**. 2009. 83f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária)– Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

SCHMIEDER, Robert; EDWARDS, Robert. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 27, n. 6, p. 863–864, 2011.

SHENDURE, Jay et al. Molecular biology: Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. **Science**, [S. l.], v. 309, n. 5741, p. 1728–1732, 2005.

SIMJEE, S.; WHITE, D. G.; MCDERMOTT, P. F.; WAGNER, D. D.; ZERVOS, M. J.; DONABEDIAN, S. M.; ENGLISH, L. L.; HAYES, J. R.; WALKER, R. D. Characterization of Tn1546 in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from canine urinary tract infections: Evidence of gene exchange between human and animal enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 40, n. 12, p. 4659–4665, 2002.

SLIPCZUK, Leandro; CODOLosa, J. Nicolas; DAVILA, Carlos D.; ROMERO-CORRAL, Abel; YUN, Jeong; PRESSMAN, Gregg S.; FIGUEREDO, Vincent M. Infective endocarditis epidemiology over five decades: A systematic review. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 12, 2013.

SOHEILI, Sara; GHAFourIAN, Sobhan; SEKAWI, Zamberi; NEELA, Vasanthakumari; SADEGHIFARD, Nourkhoda; RAMLI, Ramliza; HAMAT, Rukman Awang. Wide distribution of virulence genes among *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* clinical isolates. **Scientific World Journal**, [S. l.], v. 2014, 2014.

SOOD, Seema; MALHOTRA, Meenakshi; DAS, B. K.; KAPIL, Arti. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. **Indian Journal of Medical Research**, [S. l.], v. 128, n. 2, p. 111–121, 2008.

SPARO, Mónica; DELPECH, Gaston; ALLENDE, Natalia García. Impact on public health of the spread of high-level resistance to gentamicin and vancomycin in enterococci. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 9, n. December, p. 1–10, 2018.

STRATEVA, Tanya; ATANASOVA, Daniela; SAVOV, Encho; PETROVA, Guergana;

MITOV, Ivan. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 127–133, 2016.

SUBEDI, Bikram; CODRU, Neculai; DZIEWULSKI, David M.; WILSON, Lloyd R.; XUE, Jingchuan; YUN, Sehun; BRAUN-HOWLAND, Ellen; MINIHANE, Christine; KANNAN, Kurunthachalam. A pilot study on the assessment of trace organic contaminants including pharmaceuticals and personal care products from on-site wastewater treatment systems along Skaneateles Lake in New York State, USA. **Water Research**, [S. l.], v. 72, p. 28–39, 2015.

TACCONELLI, Evelina et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 318–327, 2018.

TATSING FOKA, Frank Eric; ATEBA, Collins Njie. Detection of virulence genes in multidrug resistant enterococci isolated from feedlots dairy and beef cattle: Implications for human health and food safety. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2019, 2019.

TEIXEIRA, Phelipe Austriaco; FANTINATTI, Maria; GONÇALVES, Monique Pinto; SILVA, Joziene Santos. Parasitoses intestinais e saneamento básico no Brasil: estudo de revisão integrativa. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 6, n. 5, p. 22867–22890, 2020.

TESFAYE, Hemen; ALEMAYEHU, Haile; DESTA, Adey F.; EGUALE, Tadesse. Antimicrobial susceptibility profile of selected Enterobacteriaceae in wastewater samples from health facilities, abattoir, downstream rivers and a WWTP in Addis Ababa, Ethiopia. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–11, 2019.

TREMBLAY, Cindy Love; CHARLEBOIS, Audrey; MASSON, Luke; ARCHAMBAULT, Marie. Characterization of hospital-associated lineages of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* from clinical cases in dogs and humans. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 4, n. AUG, 2013.

TYSON, Gregory H.; SABO, Jonathan L.; RICE-TRUJILLO, Crystal; HERNANDEZ, Jacqueline; MCDERMOTT, Patrick F. Whole-genome sequencing based characterization of antimicrobial resistance in *Enterococcus*. **Pathogens and disease**, [S. l.], v. 76, n. 2, p. 1–5, 2018.

VARELA, Ana Rita; FERRO, Giovanna; VREDENBURG, Jana; YANIK, Melike; VIEIRA, Lucas; RIZZO, Luigi; LAMEIRAS, Catarina; MANAIA, Célia M. Vancomycin resistant enterococci: From the hospital effluent to the urban wastewater treatment plant. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 450–451, p. 155–161, 2013.

WAN, Tsai wen; HUNG, Wei chun; TSAI, Jui chang; LIN, Yu tzu; LEE, Hao; HSUEH, Po ren; LEE, Tai fen; TENG, Lee jene. Novel Structure of *Enterococcus faecium*-Originated ermB-Positive Tn1546-Like Element in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, [S. l.], v. 60, n. 10, p. 6108–6114, 2016.

WANDA, Elijah M. M.; NYONI, Hlengilizwe; MAMBA, Bhekie B.; MSAGATI, Titus A. M. Occurrence of emerging micropollutants in water systems in Gauteng, Mpumalanga, and North West provinces, South Africa. **International Journal of**

Environmental Research and Public Health, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 8–20, 2017.

WICK, Ryan R.; JUDD, Louise M.; GORRIE, Claire L.; HOLT, Kathryn E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLoS Computational Biology**, [S. l.], v. 13, n. 6, p. 1–22, 2017.

ZAHEER, Rahat et al. Surveillance of Enterococcus spp. reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One-Health continuum. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–16, 2020.

ZALIPOUR, Mehrdad; ESFAHANI, Bahram Nasr; HAVAEI, Seyed Asghar. Phenotypic and genotypic characterization of glycopeptide, aminoglycoside and macrolide resistance among clinical isolates of Enterococcus faecalis: A multicenter based study. **BMC Research Notes**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–8, 2019.

ZANELLA, Rosemeire C.; VALDETARO, Fabio; LOVGREN, Marguerite; TYRREL, Gregory J.; BOKERMANN, Sérgio; ALMEIDA, Samanta C. G.; VIEIRA, Vera S. D.; BRANDILEONE, Maria Cristina C. First confirmed case of a vancomycin-resistant Enterococcus faecium with vanA phenotype from Brazil: Isolation from a meningitis case in Sao Paulo. **Microbial Drug Resistance**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 159–162, 1999.

ZANKARI, Ea; ALLESØE, Rosa; JOENSEN, Katrine G.; CAVACO, Lina M.; LUND, Ole; AARESTRUP, Frank M. PointFinder: A novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 72, n. 10, p. 2764–2768, 2017.

**APÊNDICE A – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA MICROBIAL DRUG
RESISTANCE**